

**ANLIS – “Dr. Carlos G. Malbrán”
Instituto Nacional de Producción de Biológicos
Departamento de Reactivos de Diagnóstico
Servicio Antígenos y Antisueros**

“Serotipificación molecular de *Shigella flexneri* mediante un sistema de PCR múltiples basado en los genes modificantes del antígeno O”

Tesis para optar al título de Magíster en Microbiología Molecular
de la Universidad Nacional de General San Martín

Autora Claudia A. van der Ploeg

Director Ariel D. Rogé

Co-Director Guido A. König

CIUDAD AUTONOMA DE BUENOS AIRES

2015

SÍNTESIS

La shigelosis es una enfermedad aguda gastrointestinal que afecta mayoritariamente a los países en desarrollo, en los cuales *S. flexneri* es la especie predominante. La vigilancia epidemiológica de dicha afección es trascendental para reconocer brotes, determinar prevalencia de serotipos y conocer la diseminación microbiana en tiempo y espacio. La tipificación mediante el uso de antisueros específicos para los diferentes antígenos somáticos es considerada como el método "*gold standard*" y, desde hace varias décadas, es el único parámetro utilizado para clasificar *Shigella* a nivel mundial. La serotipificación tiene como desventajas la existencia de cepas rugosas y la cantidad y alto costo de los antisueros que se requieren para llevarla a cabo. Se desarrollaron métodos moleculares basados en los genes cromosómicos *wzx* y *wzy* (codifican para los antígenos O), obteniéndose resultados concordantes entre la serotipificación tradicional y la identificación molecular para los distintos serotipos de *S. dysenteriae*, *S. boydii* y *S. sonnei*, pero no para *S. flexneri* (con la excepción del serotipo 6). En *S. flexneri*, las diferencias en el antígeno O entre los serotipos se deben a la presencia de genes aportados por bacteriófagos. El propósito de este trabajo fue desarrollar un método de tipificación a nivel molecular que mediante la identificación de los genes responsables de la síntesis del antígeno O de *S. flexneri* permita obtener resultados que se correlacionen con los obtenidos mediante el uso de los antisueros. Se diseñaron PCR

múltiples incluyendo iniciadores para los genes *gtrB*, *gtrI*, *gtrII*, *gtrIV*, *gtrV*, *gtrX*, *gtrC*, *oac*, *wzx*, *rfc* y *lpt-O* que permitieron la identificación de los 19 serotipos descritos actualmente para *S. flexneri*. El objetivo fue logrado ya que en las cepas evaluadas obtuvimos completa concordancia entre los resultados de ambas metodologías (PCR múltiples y aglutinación en lámina). El desarrollo de métodos de tipificación a nivel genético contribuye a la vigilancia epidemiológica de *S. flexneri*.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que en alguna forma han contribuido a la realización de este trabajo.

A la Dra. Mirta A. Carlomagno, por su incentivo permanente para la realización de esta tesis.

A mi director MsMM Lic. Ariel D. Rogé, no sólo por su dirección y orientación en la realización de esta Tesis sino también por el tiempo dedicado, su constante estímulo y su infinita paciencia.

Al Dr. Guido A. König, por su incondicional, desinteresada e imprescindible ayuda para comenzar en este camino de la Biología Molecular.

Al personal del Instituto de Biotecnología del INTA, principalmente a las Dras. Flavia Zanetti y Gabriela Calamante por hacerme sentir siempre bienvenida.

A todas mis compañeras del Servicio Antígenos y Antisueros, por las horas de trabajo compartidas, por ayudarme en las dificultades del día a día y aconsejarme y apoyarme en lo académico y en lo personal. Y muy especialmente a Ximena L. Bordagorría por su incondicional e imprescindible colaboración, y a Alejandra N. Grasso y Rita O. Forneri por su extraordinaria capacidad de sacarme una sonrisa aún en los peores momentos.

A mi familia, pero muy especialmente a mis padres y a Luis, mi compañero de vida, por su comprensión y apoyo incondicional en absolutamente todo lo que me propongo y a mis hijos, Malena y Ezekiel, dos hermosas personitas que me hacen crecer con ellos día a día.

A todos mi reconocimiento.

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ADN	ácido desoxirribonucleico
antígeno O	antígeno somático
cepas R	cepas rugosas
cepas S	cepas lisas
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
LNR	Laboratorio Nacional de Referencia
LPS	lipopolisacárido
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMN	leucocitos polimorfonucleares
RMN	resonancia magnética nuclear
RNDyPBTA	Red Nacional de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria
rpm	revoluciones por minuto
Ta	temperatura de hibridación (annealing en inglés)
Tm	temperatura de fusión (melting en inglés)

TSA	agar tripticasa soja
TSI	Triple Sugar Iron
UFC	unidades formadoras de colonias
Und-PP	undecaprenol pirofosfato

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Generalidades de <i>Shigella</i>	1
I.2. Shigelosis	2
I.2.1. Transmisión. Dosis infectiva	2
I.2.2. Aspectos clínicos de la enfermedad	3
I.2.3. Patogénesis	4
I.2.4. Diagnóstico y tratamiento	6
I.2.5. Prevalencia en el mundo y en Argentina	7
I.3. Lipopolisacárido (LPS) y antígeno O	10
I.3.1. Composición del LPS	10
I.3.2. Biosíntesis del LPS	12
I.3.2.1. Síntesis de la estructura basal	12
I.3.2.2. Síntesis del antígeno O	13
I.3.2.3. Transición S-R	13
I.4. <i>S. flexneri</i>	14
I.4.1. Antígeno O	14
I.4.2. Serotipos y estructuras	14
I.4.3. Acerca de los bacteriófagos	17
I.4.4. Actualizaciones en la serología de <i>S. flexneri</i>	19
I.4.4.1. <i>S. flexneri</i> 1d, 7a y 7b: nuevos serotipos generados por la inserción de fagos	20
I.4.4.2. <i>S. flexneri</i> 4av, Xv e Yv: nuevos serotipos generados por la adquisición de plásmidos	21
I.4.4.3. Patrones de acetilación y factor grupal 9 (FG 9)	22
I.4.5. Serotipos circulantes	22
I.5. Métodos epidemiológicos	24
I.5.1. Serotipificación y métodos moleculares	24

I.5.2. Consideraciones acerca de las PCR múltiples	25
I.6. Hipótesis	28
I.7. Objetivos	29
I.7.1. Objetivo general	29
I.7.2. Objetivos particulares	29
II. MATERIALES Y MÉTODOS	30
II.1. Diseño <i>de novo</i> de iniciadores	30
II.1.1. Análisis de secuencias	30
II.1.2. Diseño <i>in silico</i> de iniciadores	31
II.2. Evaluación de los iniciadores descritos en la literatura	33
II.3. Cepas utilizadas	34
II.4. Crecimiento bacteriano. Preparación de suspensión antigénica y extracción del ADN	35
II.5. Ensayos serológicos	35
II.6. Amplificación del ADN (PCR)	35
II.7. Visualización de los productos de PCR	36
II.8. PCR múltiple para la determinación de los serotipos 1, 2, 4, 5 y 6 de <i>S. flexneri</i>	37
II.8.1. Determinación de la temperatura de hibridación óptima para llevar a cabo cada una de las PCR simples	37
II.8.2. Determinación de la selectividad de cada una de las PCR simples	37
II.8.3. Determinación de la temperatura de hibridación óptima para llevar a cabo la PCR múltiple	38
II.8.4. Determinación de la concentración óptima de los iniciadores para llevar a cabo la PCR múltiple	38
II.8.5. Evaluación con el total de los serotipos, de las condiciones óptimas determinadas para realizar la PCR múltiple	39
II.8.6. Determinación del tiempo de hibridación óptimo para llevar a cabo la PCR múltiple	39

II.9. PCR múltiple para la determinación del serotipo 7 y de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de <i>S. flexneri</i>	39
II.9.1. Determinación de las condiciones óptimas para la determinación de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de <i>S. flexneri</i>	39
II.9.2. Determinación de las condiciones óptimas para la incorporación del serotipo 7 en la PCR múltiple para la determinación de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de <i>S. flexneri</i>	40
II.10. Secuenciación de genes	40
III. RESULTADOS	41
III.1. Evaluación de los iniciadores	41
III.1.1. Iniciadores diseñados <i>de novo</i>	41
III.1.2. Iniciadores descritos en la literatura	45
III.1.3. Iniciadores diseñados <i>de novo</i> vs descritos en la literatura	45
III.2. Ajuste de la PCR múltiple para la determinación de los serotipos 1, 2, 4, 5 y 6 de <i>S. flexneri</i>	47
III.2.1. Determinación de la temperatura de hibridación óptima para llevar a cabo cada una de las PCR simples	47
III.2.2. Determinación de la selectividad de cada una de las PCR simples	48
III.2.3. Determinación de la temperatura de hibridación óptima para llevar a cabo la PCR múltiple	49
III.2.4. Determinación de la concentración óptima de los iniciadores para llevar a cabo la PCR múltiple	51
III.2.5. Evaluación con el total de los serotipos, de las condiciones óptimas determinadas para realizar la PCR múltiple	52
III.2.6. Determinación del tiempo de hibridación óptimo para llevar a cabo la PCR múltiple	53
III.3. PCR múltiple para la determinación del serotipo 7 y de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de <i>S. flexneri</i>	54
III.3.1. Análisis de las condiciones óptimas para la determinación de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de <i>S. flexneri</i>	54

III.3.2. Determinación de las condiciones óptimas para la incorporación del serotipo 7 en la PCR múltiple para la determinación de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de <i>S. flexneri</i>	57
III.4. Secuenciación de genes	58
III.5. Síntesis de la información mínima necesaria para la realización de las respectivas PCR múltiples	61
III.6. Análisis comparativo entre los resultados de tipificación obtenidos con la serología convencional y con las PCR múltiples	61
IV. DISCUSIÓN	65
V. CONCLUSIONES	73
VI. TRABAJOS FUTUROS	74
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
VIII. ANEXOS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Reacciones bioquímicas características de las especies de <i>Shigella</i>	1
Tabla I.2. Número anual de episodios de diarrea por <i>Shigella</i> en niños menores de 4 años en países en desarrollo.....	8
Tabla I.3. Mortalidad anual estimada por grupos etáreos, debidas a shigelosis en países en desarrollo.....	8
Tabla I.4. Número anual de casos de diarreas agudas en la Argentina.....	9
Tabla I.5. Frecuencia (%) anual de diarreas causadas por los principales grupos bacterianos.....	9
Tabla I.6. Distribución de los serogrupos de <i>Shigella</i> en Argentina en el período 2007-2010.....	10
Tabla I.7. Serotipos de <i>S. flexneri</i> aceptados por el Subcomité de taxonomía de <i>Enterobacteriaceae</i>	15
Tabla I.8. Estructura molecular de los determinantes antigénicos de <i>S. flexneri</i>	15
Tabla I.9. Longitud de los genes <i>gtrA</i> , <i>gtrB</i> y <i>gtr_{type}</i>	18
Tabla I.10. Distribución de serotipos de <i>S. flexneri</i> en el período 2007-10...23	
Tabla I.11. Parámetros críticos de la PCR y su potencial importancia.....	26
Tabla II.1. Organismo, gen y número de acceso correspondiente de las secuencias a analizar.....	30

Tabla II.2. Detalle de los iniciadores diseñados de <i>novo</i>	32
Tabla II.3. Detalle de los iniciadores descritos en la literatura.....	33
Tabla II.4. Detalle y cantidad de los cultivos utilizados.....	34
Tabla II.5. Condiciones generales de amplificación.....	36
Tabla II.6. Condiciones de amplificación utilizadas para determinar la temperatura de hibridación óptima en las PCR simples.....	37
Tabla II.7. Controles utilizados en cada PCR simple.....	38
Tabla III.1. Propiedades fisicoquímicas de los iniciadores diseñados de <i>novo</i>	43
Tabla III.2. Propiedades fisicoquímicas de los iniciadores descritos en la literatura.....	45
Tabla III.3. Energía libre (kcal/mol) necesaria para la formación de heterodímeros entre los iniciadores a utilizar en la PCR múltiple de serotipos.....	46
Tabla III.4. Energía libre (kcal/mol) necesaria para la formación de heterodímeros entre los iniciadores a utilizar en la PCR múltiple para la determinación de los antígenos de grupo y del serotipo 7.....	46
Tabla III.5. Posibles temperaturas para la amplificación.....	48
Tabla III.6. Detalle de los factores grupales en los serotipos evaluados.....	56
Tabla III.7. Datos de interés para la identificación de los serotipos mediante la PCR múltiple correspondiente	62

Tabla III.8. Datos de interés para la identificación de los antígenos de grupo mediante la PCR múltiple correspondiente62

Tabla III.9. Tabla comparativa entre los resultados de la aglutinación vs los de la amplificación.....63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Representación esquemática de la ruptura, invasión y destrucción inflamatoria de la barrera intestinal	4
Figura I.2. Composición de la membrana en las bacterias Gram negativas	10
Figura I.3A. Esquema del LPS de una bacteria Gram negativa	11
Figura I.3B. Esquema del polisacárido de <i>S. flexneri</i>	12
Figura I.4. Esquema de la composición química de los diferentes serotipos de <i>S. flexneri</i>	16
Figura I.5. Organización de los genes de modificación del antígeno O	17
Figura I.6. Esquema de la composición química del serotipo <i>S. flexneri</i> 1d	20
Figura I.7. Esquema de la composición química de los serotipos <i>S. flexneri</i> 7a y 7b	21
Figura I.8. Esquema de la composición química de los serotipos monofosforilados Xv, Yv y 4av de <i>S. flexneri</i>	21
Figura III.1. Esquema de los sitios de unión de los iniciadores diseñados para la amplificación de los serotipos 1, 2, 4 y 5 de <i>S. flexneri</i>	41
Figura III.2. Alineamiento del extremo final de los genes <i>gtrB</i> y del comienzo de los <i>gtr_{type}</i> con cada uno de los iniciadores	42
Figura III.3. Resultado de la búsqueda en BLASTn con la secuencia correspondiente al iniciador SF.....	44
Figura III.4 Gradiente de temperatura para la amplificación de los serotipos <i>S. flexneri</i> 1, 2, 4 y 5.....	47

Figura III.5. Gradiente de temperatura para la amplificación de <i>S. flexneri</i> 6	47
Figura III.6. Resultados de la PCR múltiple realizada a 57°C	49
Figura III.7. Resultados de la PCR múltiple realizada a 55°C	50
Figura III.8. Resultados de la PCR múltiple realizada a 53°C	50
Figura III.9. Resultados de la amplificación variando las concentraciones de los iniciadores	51
Figura III.10. Resultados de la PCR múltiple con todos los serotipos descriptos	53
Figura III.11. Resultados obtenidos con los diferentes tiempos de hibridación	53
Figura III.12. PCR múltiple realizada a 55°C y durante 1,5 minutos como condiciones de hibridación	54
Figura III.13. Amplificaciones obtenidas con la PCR múltiple para factores grupales	55
Figura III.14. Amplificaciones obtenidas en la PCR múltiple para factores de grupo y serotipo 7	57
Figura III.15. Alineamiento de los serotipos 4a y 4b secuenciados frente a las secuencia del GenBank	59
Figura III.16. Identidad de los serotipos secuenciados con las secuencias del GenBank	60

Figura III.17. Identidad en la zona de hibridación entre los serotipos secuenciados y los iniciadores específicos61

Figura III.18. Asignación del serotipo con el patrón de bandas obtenidas con ambas PCR múltiples64

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades de *Shigella*

Los organismos del género *Shigella* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, no productores de gas e inmóviles; son típicamente no fermentadores de lactosa y lisina decarboxilasa, acetato, mucato y citrato de Christensen negativos. Excepciones son *S. flexneri* 6, *S. boydii* 13 y *S. boydii* 14 que pueden producir gas a partir de glucosa, así como *S. sonnei* que fermenta lentamente la lactosa y puede ser mucato positivo (Edwards y Ewing, 1986).

A diferencia de otros microorganismos de importancia médica y sanitaria dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, *Shigella* se clasifica solo en base a su antígeno somático (antígeno O) ya que carece de antígenos flagelares (antígenos H) y capsulares (antígenos K).

De acuerdo a características serológicas y bioquímicas *Shigella* se divide en cuatro especies o serogrupos. En la tabla I.1. se pueden observar las reacciones bioquímicas consideradas para la diferenciación entre las especies de *Shigella*.

Tabla I.1. Reacciones bioquímicas características de las especies de *Shigella*

	Fermentación del manitol	Decarboxilación de la ornitina
<i>S. dysenteriae</i>	-	-
<i>S. flexneri</i>	+ ^{*1}	-
<i>S. boydii</i>	+	- ^{*2}
<i>S. sonnei</i>	+	+

- Más del 90% de reacciones negativas

+ Más del 90% de reacciones positivas

*1 Algunos serotipos de *S. flexneri* no fermentan el manitol

*2 *S. boydii* 13 decarboxila la ornitina.

(Fuente: Edwards P. y Ewing W. 1986)

Además, debido a diferencias en el antígeno O, cada una de las especies se divide en serotipos. *S. dysenteriae* (serogrupo A) abarca los serotipos 1 al 15, *S. flexneri* (serogrupo B) abarca 13 serotipos, *S. boydii* (serogrupo C) abarca los serotipos 1 al 20 y *S. sonnei* (serogrupo D) tiene un único serotipo (van der Ploeg y col., 2010).

La serotipificación es el parámetro mundialmente utilizado para clasificar *Shigella*. Debido a la alta incidencia de *S. flexneri* en los países en desarrollo, a la variedad de antígenos presentes en esta especie y a ciertas dificultades en dicha metodología, se vuelve muy importante el desarrollo de técnicas moleculares alternativas para realizar la tipificación a nivel molecular.

I.2. Shigelosis

Es una enfermedad aguda gastrointestinal que afecta principalmente a los niños menores de 5 años e implica un grave problema de salud pública a nivel mundial en términos sanitarios y económicos. Representa un importante problema de salud principalmente en los países en desarrollo, pues la diseminación y severidad de la infección se ven allí potenciadas debido a pobres condiciones sanitarias, malnutrición, alto costo de los antibióticos y aumento de la resistencia a los mismos (Nie y col., 2006; Clemens y col., 1999).

Un aspecto clave en el combate de la enfermedad es la vigilancia epidemiológica, ya sea a largo plazo para evaluar las tendencias en prevalencia de serotipos y así establecer las intervenciones pertinentes, como a corto plazo para por ejemplo, reconocer brotes y determinar el alcance de la diseminación microbiana en el tiempo y el espacio.

I.2.1. Transmisión. Dosis infectiva

La shigelosis es una patología asociada a malas condiciones de higiene. Los seres humanos son el reservorio primario para *Shigella*, mientras que

primates superiores en cautiverio pueden resultar hospederos accidentales (Coimbra y col., 1999; Hale, 1991).

Los estudios epidemiológicos sobre *Shigella* establecieron que sólo diez células pueden ser suficientes como dosis infectiva (Villalobo y Torres, 1998). El pequeño inóculo necesario para causar infección es un grave problema ya que torna muy fácil la transmisión persona-persona (Clemens y col., 1999). Por otra parte la infección se ve favorecida por la existencia de portadores asintomáticos.

El modo predominante de transmisión es por contacto fecal-oral. Si bien los responsables primarios de la transmisión son las personas infectadas, también existe el contagio por ingestión de agua o alimentos contaminados.

I.2.2. Aspectos clínicos de la enfermedad

La shigelosis es una infección invasiva del colon humano que abarca varias manifestaciones clínicas; las mismas pueden ir desde una diarrea acuosa de corto tiempo hasta una enfermedad aguda inflamatoria caracterizada por fiebre, dolor intestinal y diarrea mucosa-sanguinolenta (Sansoneetti, 2001).

El período de incubación es de 1 a 4 días y los primeros síntomas son fiebre, malestar, dolor de cabeza y ocasionalmente vómitos. La diarrea acuosa es frecuentemente la única manifestación clínica de una infección suave; la progresión a una disentería franca puede ocurrir de horas a días con deposiciones frecuentes conteniendo sangre y moco, dolores abdominales y tenesmo rectal. Cuando la infección es causada por organismos productores de Shiga-toxina, el cuadro se puede complicar con anemia hemolítica microangiopática, la cual se manifiesta como síndrome urémico hemolítico en niños o como púrpura trombótica trombocitopénica en adultos. Muy raramente *Shigella* se disemina a sitios distantes causando infecciones focales como meningitis, artritis u osteomielitis (Clemens y col., 1999).

En individuos sanos, la mayoría de los episodios de shigelosis son autolimitados y se resuelven en 5 a 7 días sin dejar secuelas. En niños

malnutridos pueden surgir complicaciones metabólicas (ej., deshidratación, hiponatremia, hipoglucemia) y complicaciones intestinales (ej., megacolon tóxico, prolapso rectal, perforación intestinal). Las secuelas crónicas más comunes son diarrea persistente y malnutrición.

El síndrome de Reiter (comprende artritis, uretritis y conjuntivitis) es una complicación pos-infección rara que se observó en adultos luego de una infección con *S. flexneri* (Clemens y col., 1999).

I.2.3. Patogénesis

Shigella tiene una alta capacidad para invadir y colonizar el epitelio intestinal humano (Torres, 2004; Sansonetti, 2001).

En la figura I.1. puede observarse la representación del mecanismo de acción de *Shigella* en las células del epitelio intestinal.

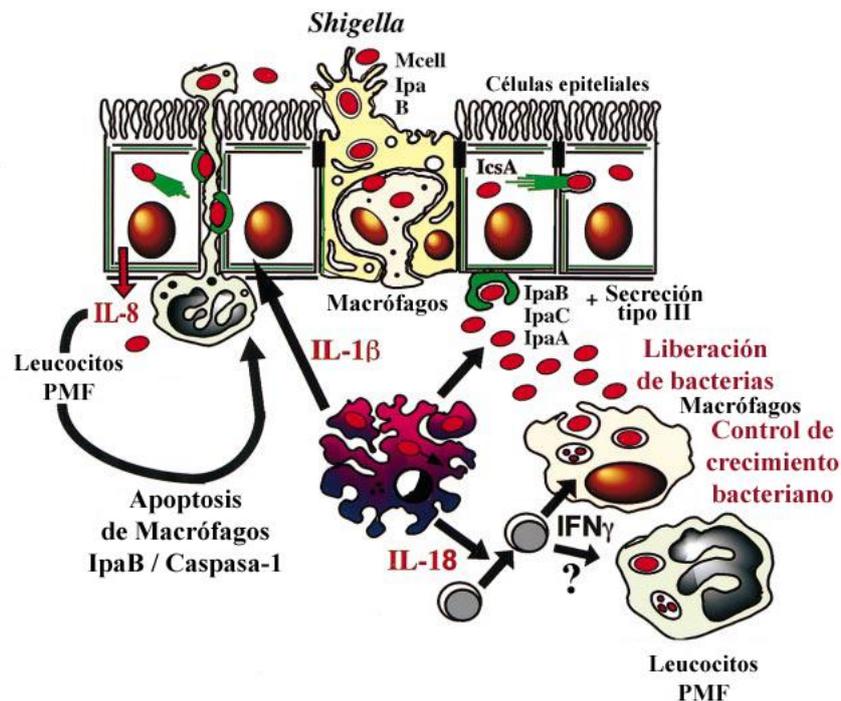


Figura I.1. Representación esquemática de la ruptura, invasión y destrucción inflamatoria de la barrera intestinal.

(Fuente: Sansonetti, 2001)

La infección se inicia cuando la bacteria es captada por el tejido linfóide asociado a las células M del intestino y luego es transocitada hacia el

espacio subepitelial. Esta zona está poblada por macrófagos que fagocitan al bacilo, el cual lisa el fagosoma e inicia la apoptosis del macrófago, quien libera citoquinas inflamatorias que promueven la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN). La transmigración de PMN hacia el lumen intestinal permite la migración reversa de la enterobacteria desde el lumen hacia los espacios subepiteliales. Así, *Shigella* infecta las células del epitelio columnar induciendo su captación endocítica, esta invasión también estimula la liberación de citoquinas inflamatorias que provocan el reclutamiento de más PMN (Torres, 2004; Sansonetti, 2001).

Dentro de la célula hospedera *Shigella* lisa la vacuola que la rodea liberándose al citosol donde puede crecer y dividirse; además, en uno de sus polos forma una cola de actina que favorece su movilidad en el citoplasma y genera una proyección desde la superficie de la célula infectada hasta la membrana lateral de la célula adyacente de modo que el microorganismo resulta internalizado, empezando así un nuevo ciclo de infección en una nueva célula hospedera (Torres, 2004; Sansonetti, 2001; Hale, 1991).

La mayoría de los determinantes de virulencia responsables de la invasión a las células epiteliales están codificados en un plásmido de 214 kb que tiene los genes necesarios para: (a) la producción de antígenos de invasión (Ipa), (b) la síntesis de un aparato de secreción tipo III (capaz de distribuir proteínas efectoras de *Shigella* hacia la célula eucariótica), (c) la inducción de la captación endocítica de la bacteria y disrupción de las vacuolas endocíticas, (d) la diseminación intra e intercelular y (e) la regulación de los genes de virulencia codificados en el plásmido. Si bien las secuencias codificantes están diseminadas en todo el plásmido, hay un bloque de 30 kb (locus ipa/mxi-spa) que se considera la principal isla de patogenicidad (IPA), necesaria y suficiente para causar la entrada a las células epiteliales vía macropinocitosis, la muerte apoptótica de los macrófagos y la activación de los PMN (Sansonetti, 2001; Niyogi, 2005; Torres, 2004).

Otro mecanismo de patogenicidad es la secreción de toxinas. La enterotoxina ShET1 se encuentra codificada en el cromosoma y se asocia con el serotipo 2 de *S. flexneri*, mientras que la enterotoxina ShET2 está codificada en un plásmido y se encuentra diseminada entre todas las especies y serotipos. Estas enterotoxinas causarían el síndrome diarreico que precede a la disentería bacilar.

Un factor de virulencia relacionado con *S. dysenteriae* 1 es su capacidad de expresar la toxina Shiga, una citotoxina muy potente codificada en el cromosoma de la bacteria y que en células mamíferas susceptibles inhibe la síntesis proteica, causa destrucción capilar, hemorragia local y está asociada con el síndrome urémico hemolítico (Hale, 1991).

I.2.4. Diagnóstico y tratamiento

Si bien se puede sospechar de una infección por *Shigella* en base a signos clínicos, el diagnóstico dependerá del aislamiento e identificación del organismo a partir de las heces.

Frecuentemente, los cultivos positivos son obtenidos de heces mucosanguinolentas durante la fase aguda de la diarrea. El aislamiento de *Shigella* implica un paso inicial de cultivo en medios selectivos/diferenciales con incubación aeróbica para inhibir el crecimiento de la flora normal anaeróbica. Los medios comúnmente usados para el aislamiento primario contienen sales biliares que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas y un indicador de pH que diferencia los organismos fermentadores de lactosa de aquellos que no lo son.

Luego de una incubación durante 18 h a 37°C, las colonias incoloras son sembradas en al menos tres medios diferenciales: TSI (Triple Sugar Iron), acetato y LIA (Lisina Iron Agar). Resultados negativos para la utilización del acetato y la decarboxilación de lisina, junto con estría alcalina y fondo ácido sin formación de gas en el TSI, se toma como una identificación presuntiva

de *Shigella*. La identificación se confirma con los antisueros específicos para serogrupo y serotipo mediante pruebas de aglutinación en lámina.

Algunos biotipos de *E. coli* (inmóviles y fermentadores tardíos de lactosa) de la flora intestinal normal pueden asemejarse a *Shigella*, pero dichas coliformes pueden ser diferenciadas por su capacidad de decarboxilar la lisina (Hale, 1991). Es importante considerar que los microorganismos del patogrupo enteroinvasivo de *E. coli* (EIEC) pueden confundirse bioquímicamente con *Shigella* ya que son inmóviles, no fermentadores de lactosa y lisina decarboxilasa negativos.

La shigelosis es una enfermedad autolimitada, la terapia antibiótica solo se recomienda en casos severos y/o ante la presencia de patologías de base. Los agentes antimicrobianos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) son: ampicilina, ciprofloxacina, norfloxacina y trimetoprima-sulfametoxazol (Bopp y Wells, 2003).

I.2.5. Prevalencia en el mundo y en Argentina

Se estima que en el mundo ocurren anualmente más de 164 millones de infecciones por *Shigella* y en consecuencia cerca de 1 millón de muertes. El 99% de las infecciones suceden en los países en vías de desarrollo; además el 69% de los episodios y el 61% de las muertes atribuibles a shigelosis involucran a niños menores de 5 años de edad.

En los países desarrollados 77% de los casos son por *S. sonnei*, 16% por *S. flexneri*, 2% por *S. boydii* y 1% por *S. dysenteriae*; mientras que en los países en desarrollo el 60% de los casos son debidos a *S. flexneri*, el 15% a *S. sonnei*, el 6% a *S. boydii* y otro 6% a *S. dysenteriae*. Dentro de *S. flexneri* el serotipo 2a es el de mayor incidencia (von Seidlein y col., 2006; Kotloff y col., 1999; Adhikari y col., 1999).

Ante esta realidad la OMS priorizó el desarrollo de una vacuna contra *S. flexneri*, sabiendo que la respuesta inmune que protege al hospedero contra

este microorganismo está dirigida contra el componente antigénico O del lipopolisacárido (LPS) (Allison y Verma, 2000).

En las tablas I.2. y I.3. se muestran la morbilidad y la mortalidad causadas por *Shigella* en países en desarrollo.

Tabla I.2. Número anual de episodios de diarrea por *Shigella* en niños menores de 4 años en países en desarrollo

Grupos de edades	Pacientes domiciliarios	Pacientes no internados	Pacientes internados	Total de episodios de diarrea por <i>Shigella</i>
0-11 meses				
Número anual de episodios de diarrea	429.975.000	50.212.500	7.312.500	
% de episodios con <i>Shigella</i> spp	3,2	6,3	6,5	
Total de episodios de <i>Shigella</i>	13.759.200	3.163.390	475.315	17.397.905
1-4 años				
Número anual de episodios de diarrea	868.455.000	74.655.000	1.890.000	
% de episodios con <i>Shigella</i> spp	9,1	22	16,5	
Total de episodios de <i>Shigella</i>	79.029.405	16.424.100	311.850	95.765.355
	92.788.605	19.587.490	787.165	113.163.260

(Fuente: Kotloff y col., 1999)

Tabla I.3. Mortalidad anual estimada por grupos etáreos, debidas a shigelosis en países en desarrollo

	0-11 meses	1-4 años	≥ 5 años
Nº de casos hospitalizados infectados con <i>Shigella</i> spp	475.315	311.850	741.850
Nº de casos hospitalizados por shigelosis que murieron (%)	66.070 (13,9)	29.315 (9,4)	60.830 (8,2)
Nº de casos que murieron por shigelosis, corregido por la mortalidad fuera del hospital	462.490	205.205	425.810
Total de muertes por <i>Shigella</i>		1.093.505	

(Fuente: Kotloff y col., 1999)

En nuestro país, el número de diarreas agudas es informado mediante boletines epidemiológicos confeccionados por el Ministerio de Salud en base a los datos aportados por los diferentes hospitales al Sistema Nacional de Vigilancia por Laboratorios (SIVILA). En la tabla I.4. se detallan los registros correspondientes al período 2007-2010.

Tabla I.4. Número anual de casos de diarreas agudas en la Argentina

Año	Nº de casos
2007	813.719
2008	1.077.387
2009	1.128.500
2010	1.228.219

(Fuente: Dirección de Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, SIVILA)

Si bien en Argentina las infecciones causadas por *Shigella* spp. no son de declaración obligatoria, el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de Enterobacterias en base a los aislamientos que recibe y tipifica en el marco de la Red Nacional de Diarreas Bacterianas y Patógenos de Transmisión Alimentaria (RNDBByPTA) ubica al género *Shigella* como uno de los principales organismos bacterianos causantes de diarrea. En la tabla I.5. se detallan los datos obtenidos durante el período 2007-2010.

Tabla I.5. Frecuencia (%) anual de diarreas causadas por los principales grupos bacterianos.

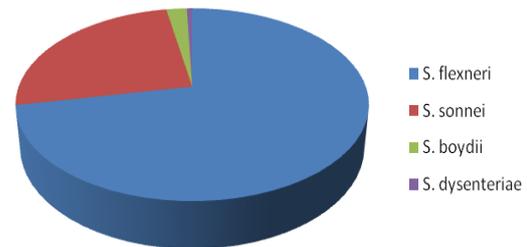
	2007	2008	2009	2010
<i>Shigella</i>	56,10%	50,20%	44,50%	51,10%
<i>Salmonella</i>	31,30%	29,90%	34,00%	22,20%
<i>E. coli O157</i>	10,10%	10,20%	10,30%	6,20%
<i>Campylobacter</i>	2,50%	9,70%	11,20%	20,50%

(Fuente: Servicio Enterobacterias, LNR (INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”))

En la tabla I.6. puede observarse como en la Argentina al igual que en el resto de los países no desarrollados, *S. flexneri* es el serogrupo ampliamente predominante.

Tabla I.6. Distribución de los serogrupos de *Shigella* en Argentina en el período 2007-2010.

SEROGRUPO	Nº de aislamientos
<i>S. flexneri</i>	2403 (71,9%)
<i>S. sonnei</i>	843 (25,2%)
<i>S. boydii</i>	75 (2,2%)
<i>S. dysenteriae</i>	20 (0,6%)



Fuente: Servicio Enterobacterias, LNR (INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán")

I.3. Lipopolisacárido (LPS) y antígeno O

I.3.1. Composición del LPS

El LPS es un componente esencial de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Es un glucolípido complejo compuesto por 3 partes: lípido A (región proximal), core de oligosacáridos (zona intermedia) y cadena lateral específica (región distal). En la figura I.2. se muestra en forma esquemática la composición de la membrana en las bacterias Gram negativas.

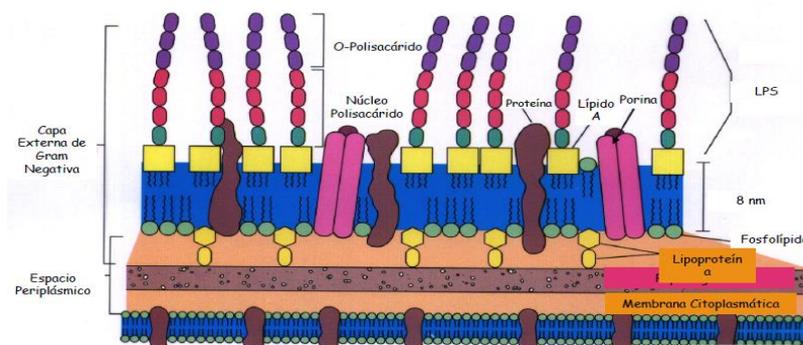


Figura I.2. Composición de la membrana en las bacterias Gram negativas.

(Fuente: Brock - Biología de los microorganismos. 8ª ed.)

La región del lípido A es casi idéntica en todas las bacterias Gram negativas, es un disacárido de glucosaminas unidas $\beta(1\rightarrow6)$ con casi todos los grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}_2$ sustituidos principalmente con ácidos grasos (siendo el predominante el ácido β -hidroximirístico); el lípido A ancla el LPS a la membrana externa por uniones no covalentes y tiene actividad de endotoxina (Simmons, 1971).

El core de oligosacáridos puede dividirse en dos fracciones, la fracción del núcleo interno que tiene dos tipos de azúcares exclusivos de bacterias Gram negativas (2-ceto-3-desoxioctónico (KDO) y L-glicero-D-manoheptosa (Hep)) y la fracción del núcleo externo que está formada por hexosas (glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina y algunas hexosas raras). La cadena lateral específica es un polisacárido compuesto por la repetición (de hasta 40 veces) de unidades oligosacáridicas que se proyecta hacia el exterior de la célula. Esta cadena lateral específica es el antígeno O de las bacterias Gram negativas (Simmons, 1971).

En la figura I.3A. puede observarse la representación esquemática del LPS.

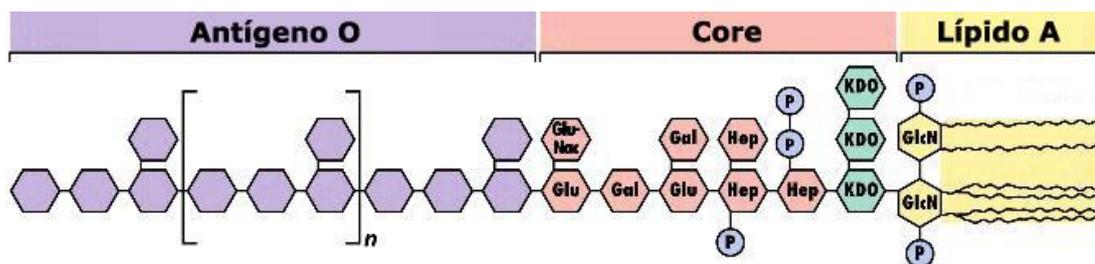


Figura I.3A. Esquema del LPS de una bacteria Gram negativa.

(Fuente: recuperado de http://www.biorom.uma.es/contenido/UPV_EHU/hc/sugar35b.htm#lp)

La única región del LPS indispensable para la viabilidad es el lípido A. Las bacterias que no sintetizan las cadenas laterales o el core pueden tener afectadas distintas propiedades biológicas pero sobreviven (Simmons, 1971).

Como puede observarse en la figura I.3B., el polisacárido puede esquematizarse en dos partes: la estructura basal que contiene los determinantes antigénicos característicos de rugosidad (R) y las cadenas laterales del antígeno O que determinan la especificidad y las reacciones cruzadas entre los diferentes serotipos (Simmons, 1971).

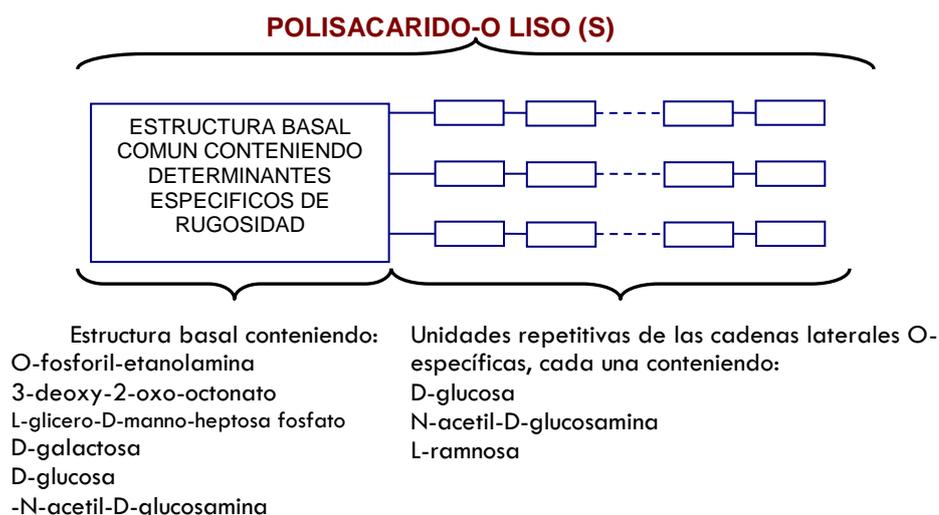


Figura I.3B. Esquema del polisacárido de *S. flexneri*.
(Fuente: Simmons, 1971)

I.3.2. Biosíntesis del LPS

I.3.2.1. Síntesis de la estructura basal

La biosíntesis comienza con un esqueleto de poliheptosa fosfato-aldoheptosa y sigue con la adición secuencial de glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina generando el crecimiento de la cadena lateral de la estructura basal. Las cadenas laterales secundarias no se incorporan a la molécula en crecimiento hasta que las cadenas laterales primarias del core estén cubiertas con N-acetilglucosamina (Schnaitman y Klena, 1993; Simmons, 1971).

En estado de LPS liso (S) la estructura basal está oculta, mientras que en el estado rugoso (R) se encuentra expuesta como consecuencia de defectos enzimáticos que interrumpen la vía biosintética del antígeno O (Schnaitman y Klena, 1993; Simmons, 1971).

I.3.2.2. Síntesis del antígeno O

Se inicia en el lado citoplasmático de la membrana interna y consta de tres etapas diferentes. En primer lugar, ocurre la adición secuencial de residuos de azúcar a la estructura basal para formar la unidad repetitiva del antígeno O unida al lípido transportador; este complejo anclado en la membrana citoplasmática es luego trasladado hacia el lado periplásmico por la flipasa Wzx.

Luego, las unidades repetitivas de la cadena lateral primaria se polimerizan por la acción de Wzy (polimerasa del antígeno O).

Una vez que la cadena del antígeno O está completa, una ligasa une el polímero antígeno O modificado al complejo lípido A-core. Finalmente, el LPS completo es traslocado a la membrana externa (Korres y col., 2005; Allison y Verma, 2000; Guan y col., 1999).

I.3.2.3. Transición S-R

La mutación de cepa lisa (S) a rugosa (R) ocurre cuando por defectos en alguna enzima de la vía biosintética se impide la incorporación de las cadenas laterales O específicas, con la consecuente exposición de los determinantes R de la región basal.

Aunque hay muchas deficiencias enzimáticas que dan mutantes R, existen dos mecanismos reconocidos. Uno se debe a la pérdida de una sintetasa o transferasa de la cadena lateral, resultando en la ausencia total de cadena lateral O-específica pero una estructura basal normal. El otro mecanismo se debe a la pérdida de una sintetasa o transferasa basal, en esta situación la biosíntesis de la cadena lateral O específica ocurre normalmente pero no puede ser transferida a la estructura basal incompleta ya que carece del receptor apropiado (Simmons, 1971; Jhonston y col., 1967).

I.4. *S. flexneri*

I.4.1. Antígeno O

Los diferentes serotipos de *S. flexneri*, con la excepción del serotipo 6, comparten un esqueleto compuesto por unidades repetitivas del tetrasacárido N-acetilglucosamina-ramnosa-ramnosa-ramnosa. Esta cadena primaria o antígeno básico O corresponde al serotipo Y y es el resultado de la acción de las enzimas Wzx y Wzy, codificadas por genes cromosómicos (Liu y col., 2008, Coimbra y col., 1999; Simmons, 1971).

Las diferencias grupo y tipo específicas (debidas a la adición de residuos α -glucosilos u O-acetilos en el tetrasacárido) son debidas a genes aportados por fagos insertos en la bacteria (Allison y Verma, 2000; Coimbra y col., 1999). Entonces, una vez sintetizada la estructura coincidente con el serotipo Y, la biosíntesis del antígeno O en *S. flexneri* se completa con la incorporación de cadenas laterales secundarias mediante una unión específica, dando lugar al mecanismo de conversión de serotipo (Schnaitman y Klena, 1993; Simmons, 1971). Por ejemplo, el serotipo 5a se origina por la adición de un residuo glucosilo vía una unión α 1,3 a la ramnosa II de la unidad del antígeno O (Korres y col., 2005; Allison y col., 2002; Adams y col., 2001; Allison y Verma, 2000; Adhikari y col., 1999; Lindberg y col., 1978; Simmons, 1971).

I.4.2. Serotipos y estructuras

La determinación del serotipo se basa en la aglutinación del organismo con un antisuero específico (Mavris y col., 1997). En base a dichas reacciones de aglutinación *S. flexneri* se subdividió hasta el año 2009 en los serotipos y subserotipos detallados en la tabla I.7. (Brenner, 1984; van der Ploeg y col., 2010).

Luego, en la tabla I.8. se exponen los determinantes antigénicos que confieren la especificidad para un determinado serotipo o factor grupal de *S. flexneri*.

Tabla I.7. Serotipos de *S. flexneri* aceptados por el Subcomité de taxonomía de *Enterobacteriaceae*.

Serotipo	Subserotipo	Fórmula antigénica abreviada
1	1a	I:4
	1b	I:6
2	2a	II:3,4
	2b	II:7,8
3	3a	III:6,7,8
	3b	III:3,4,6
4	4a	IV:3,4
	4b	IV:6
5	5a	V:3,4
	5b	V:7,8
6	----	VI:(4)
X	----	--:7,8
Y	----	--:3,4

(Fuente: van der Ploeg y col., 2010)

Tabla I.8. Estructura molecular de los determinantes antigénicos de *S. flexneri*.

Factor	Determinante antigénico
I	α -glucosil-(\rightarrow 4)-N-acetilglucosamina
II	α -glucosil-(1 \rightarrow 4)-Ramnosa
III	2-O-acetil- α -glucosil-(1 \rightarrow 2)-Ramnosa
IV	α -glucosil-(1 \rightarrow 6)-N-acetilglucosamina
V	α -glucosil-(1 \rightarrow 3)-Ramnosa
7,8	α -glucosil-(1 \rightarrow 2)-Ramnosa
4	ramnosil-(1 \rightarrow 4)-Ramnosa
3,4	ramnosil-(1 \rightarrow 4)-Ramnosil-(1 \rightarrow 6)-N-acetilglucosamina

(Fuente: Simmons, 1971)

En la figura I.4. se muestra la estructura química de los serotipos de *S. flexneri* reconocidos hasta el año 2009.

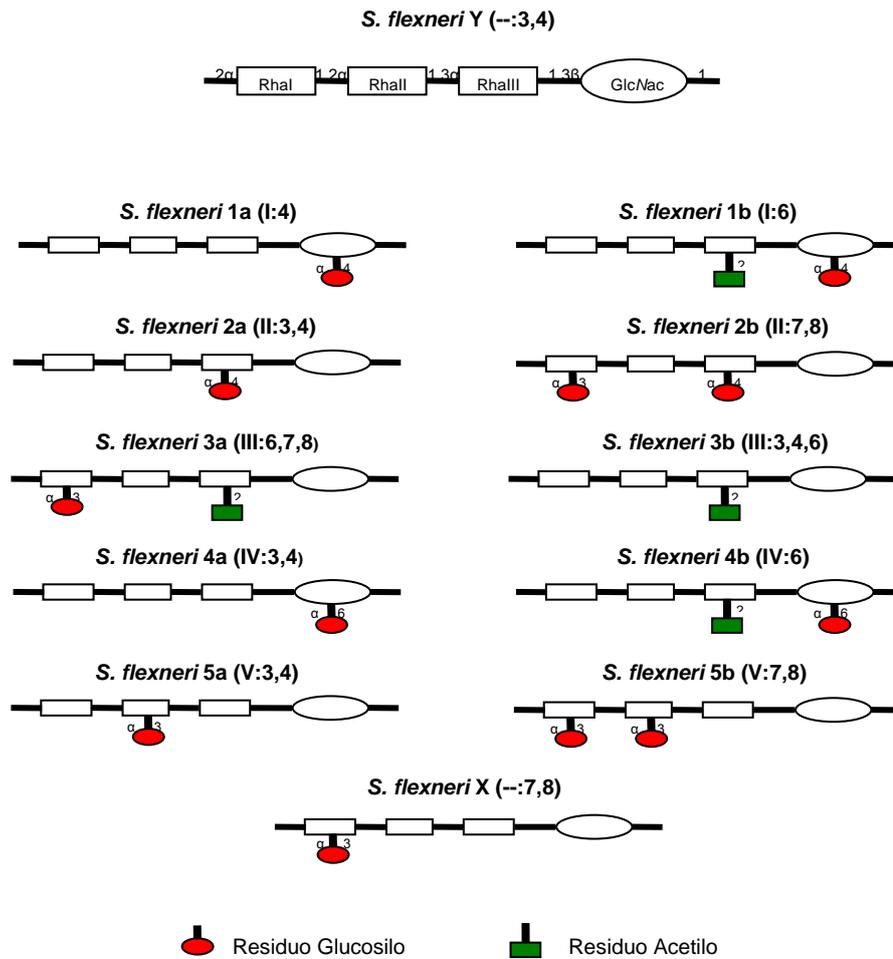


Figura I.4. Esquema de la composición química de los diferentes serotipos de *S. flexneri*.

(Fuente: Allison y Verma, 2000)

I.4.3. Acerca de los bacteriófagos

Las modificaciones que resultan en un nuevo serotipo son conferidas por bacteriófagos que se integran en el cromosoma hospedero formando un profago estable que expresa los genes de conversión de serotipo. En todos los casos, los genes de glucosilación del antígeno O del genoma del fago están ubicados inmediatamente hacia el extremo 3' del gen integrasa y del sitio *attP*, mediando la integración del fago en la región *pro-lac* del genoma del hospedero (Mavris y col, 1997; Adams y col., 2001; Allison y Verma, 2000). En la figura I.5. puede observarse esquemáticamente la organización de algunos de los genes de modificación del antígeno O.

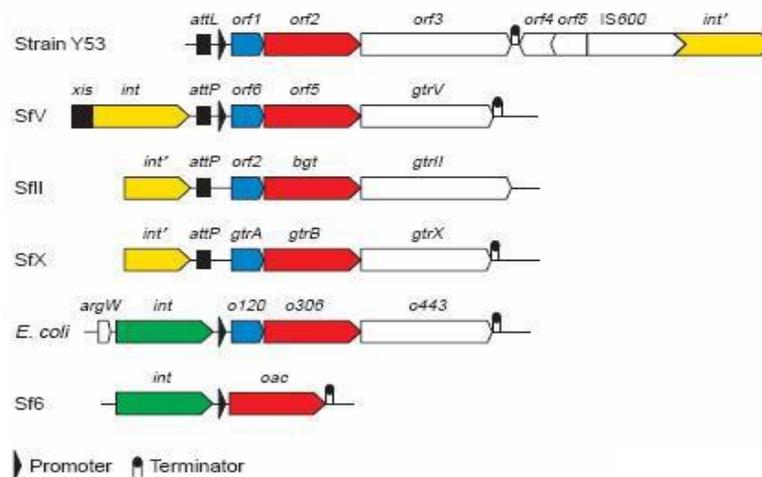


Figura I.5. Organización de los genes de modificación del antígeno O.

Los genes que codifican proteínas muestran más del 85% de identidad y tienen el mismo color, *orf1*, *orf6*, *orf2* (SflI) y *o120* son homólogos al GtrA; *orf2* (cepa Y53), *orf5*, *bgt* y *o306* son homólogos al *gtrB*; *int* e *int'* son los genes de integrasa completos o parciales respectivamente; *xis*, gen excisionasa; *oac*, gen O-acetiltransferasa; *argW*, gen ARNt arginina; *attP*, *attL* y *attR* son los sitios de unión al fago.

(Fuente: Allison y Verma, 2000)

Los genes *gtrA*, *gtrB* (*bgt*) y *gtr_{type}* codificados en el fago, están involucrados en la glucosilación de la cadena primaria del antígeno O y son necesarios para la conversión completa del serotipo (Korres y col., 2005; Allison y Verma, 2000).

Los genes *gtrA* y *gtrB* se encuentran altamente conservados y son intercambiables entre los serotipos, mientras que el gen *gtr_{type}* es único para

cada bacteriófago. La proteína glucosil-transferasa serotipo-específica, codificada por dicho gen, adiciona un residuo glucosilo mediante una unión particular a un azúcar específico del tetrasacárido (Liu y col., 2008; Allison y Verma, 2000).

Es importante considerar que los serotipos *S. flexneri* 3, X e Y no poseen bacteriófagos que les modifiquen el antígeno O asignándoles especificidad de tipo; mientras que el serotipo Y no posee ningún bacteriófago que modifique su antígeno O, los serotipos *S. flexneri* 3 y X poseen bacteriófagos que modifican el antígeno O participando en el agregado de antígenos de grupo. Por su parte, *S. flexneri* 6 no comparte la estructura básica del antígeno somático del resto de los serotipos de *S. flexneri*.

En la tabla I.9. se detalla la longitud descripta para cada uno de los genes de los diferentes bacteriófagos.

Tabla I.9. Longitud de los genes *gtrA*, *gtrB* y *gtr_{type}*

	Longitud de los genes (pb)			
	<i>gtrA</i>	<i>gtrB</i>	<i>gtr_{type}</i>	<i>gtrA+gtrB+gtr_{type}</i>
Fago Sfl	362	920	1520	2802
Fago SflI	362	929	1460	2745
Fago SflV	362	914	1313	2588
Fago SflV	362	923	1253	2532

Los genes *gtr* tienen menor contenido GC que el genoma del hospedero, que se estima en 50%. El contenido promedio GC para *gtrA* y *gtrB* es 42% y para el gen *gtr_{type}* es menor al 35%. A continuación se hace una breve reseña de cada una de las proteínas codificadas por los genes *gtr*.

-GtrA: son proteínas integrales de membrana altamente conservadas, de 120 aminoácidos (aa) y muy hidrofóbicas. Tienen actividad de flipasa (Korres y col., 2005; Allison y Verma, 2000).

-GtrB: tienen entre 305 y 309 aa, son altamente conservadas, con la mayor variación en los últimos 20 aa. Son bactoprenol glucosil transferasas (Allison y Verma, 2000).

- Glucosil transferasa serotipo-específica (Gtr_{type}): tienen un tamaño de entre 416 a 506 aa, 9 a 11 regiones transmembrana y comparten muy poca homología entre sí. GtrV y GtrX son las más similares en tamaño (417 y 416 aa) y secuencia (35,7% de identidad y 61,3% de similitud) y ambas catalizan la adición de un grupo glucosilo vía una unión α 1-3 a la ramnosa II y ramnosa I, respectivamente. GtrI y GtrII son las Gtr más grandes y catalizan la formación de uniones α 1-4 entre el grupo glucosilo agregado y la N-acetilglucosamina y ramnosa III respectivamente. A pesar de su naturaleza heterogénea, todas las glucosil transferasas usan el mismo sustrato, UndP- β -glucosa (Korres y col., 2005; Allison y Verma, 2000).

Además de las tres proteínas mencionadas, hay que considerar a la O-acetiltransferasa (Oac) codificada por el gen *oac* del bacteriófago Sf6. Esta proteína tiene 333 aa, es relativamente hidrofóbica y tiene 9 regiones transmembrana (Adams y col., 2001; Allison y Verma, 2000).

Mientras que la O-acetilación ocurre sólo en el residuo ramnosa III (y genera el epítipo del factor de grupo 6), la glucosilación puede ocurrir en cualquiera de las tres ramnosas y en la N-acetilglucosamina (Mavris y col., 1997).

Las modificaciones realizadas por los fagos en el serotipo ayudan a que las células lisogenizadas eviten la inmunidad pre-existente del hospedero y proporcionan un mecanismo de autoprotección para evitar que otros fagos entren a las células alterando los sitios de adsorción (Guan y col., 1999).

I.4.4. Actualizaciones en la serología de *S. flexneri*

Ninguno de los serotipos descritos a continuación pueden ser tipificados dentro del esquema vigente (tabla I.7.).

I.4.4.1. *S. flexneri* 1d, 7a y 7b: nuevos serotipos generados por la inserción de fagos

El serotipo 1d (I:7,8) está provisto con dos bacteriófagos, el Sf1 y el SfX (Shashkov y col., 2013). En la figura I.6. se esquematiza su estructura química.

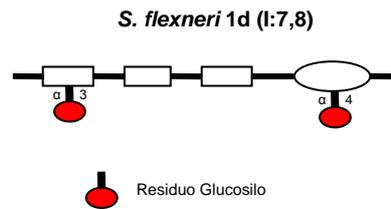


Figura I.6. Esquema de la composición química del serotipo *S. flexneri* 1d.

El antígeno de los serotipos 7a y 7b consiste en el tetrasacárido básico de la unidad repetitiva con un disacárido (dos residuos glucosilos) unido a la N-acetilglucosamina. El primer glucosilo está unido a la N-acetilglucosamina vía una unión α 1,4 (al igual que en los serotipos *S. flexneri* 1a y 1b) y el segundo glucosilo está unido al primero vía una unión α 1,2. Estos serotipos fueron agrupados en base a la reacción serológica del dímero de glucosas frente al anticuerpo monoclonal MASF 1c (Carlin y col., 1989; Wheler y Carlin, 1988 El-Gendy y col., 1999, Foster y col., 2011).

La adición del segundo glucosilo del dímero es el resultado de la inserción de un segundo fago (Sf1c). Los genes *gtrA*_{1c} y *gtrB*_{1c} comparten menos del 75% de identidad a nivel nucleotídico con los genes *gtrA* y *gtrB* de los otros fagos de *S. flexneri* y están más estrechamente relacionados a clusters *gtr* de especies no *S. flexneri* (ej, *Citrobacter koseri*).

En la figura I.7. se puede observar la estructura química de los serotipos 7a y 7b.

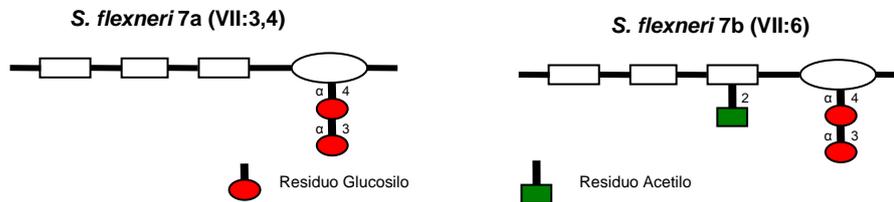


Figura I.7. Esquema de la composición química de los serotipos *S. flexneri* 7a y 7b.

I.4.4.2. *S. flexneri* 4av, Xv e Yv: nuevos serotipos generados por la adquisición de plásmidos

Estos serotipos presentan aglutinación positiva con el anticuerpo MASF IV-1 que reconoce el determinante antigénico E1037 (Carlin y col., 1989) cuya estructura química se corresponde con la presencia de un grupo fosfoetanolamina en la posición 3 de la ramnosa II y/o de la ramnosa III, dando lugar a antígenos O mono o bifosforilados (Knirel y col., 2013; Sun y col., 2012; Perepelov y col., 2009).

El grupo fosfoetanolamina es producto de una fosfoetanolaminotransferasa codificada en el gen *lpt-O*, el cual se encuentra en un plásmido (Knirel y col., 2013).

En la figura I.8. se esquematiza la estructura química de los serotipos monofosforilados *S. flexneri* 4a, Xv e Yv.

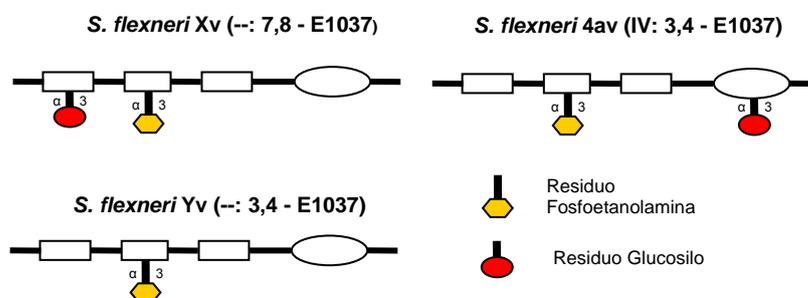


Figura I.8. Esquema de la composición química de los serotipos monofosforilados Xv, Yv y 4av de *S. flexneri*.

I.4.4.3. Patrones de acetilación y factor grupal 9 (FG 9)

Con la realización a partir del año 2009 de estudios de espectroscopía de RMN, se evidenció la presencia de grupos acetilos no descritos previamente. Dichos grupos acetilos fueron denominados FG9.

Se encontró que los serotipos *S. flexneri* 1a, 1b, 2a, 5a, 6 e Y tenían un alto porcentaje de acetilación en la posición 3 de la ramnosa III y menor porcentaje en la posición 4. Además, se detectó acetilación en la posición 6 de la N-acetilglucosamina en los serotipos 2a, 3a, Y e Yv. (Wang y col., 2014; Knirel y col., 2013; Perepelov y col., 2009).

Las acetilaciones de la ramnosa III son realizadas por una acetiltransferasa cuyo gen codificante se denominó *oacB* y es portado por una estructura de tipo trasposón. El gen *oacB* es homólogo del gen *oac* responsable de la acetilación que genera el antígeno del factor grupal 6. Por el contrario, la acetiltransferasa de *S. flexneri* 6 está codificada por el gen *oacC* (Wang y col., 2014).

El conocimiento de las acetilaciones no descritas previamente, permite entender porque serológicamente en algunos cultivos no puede detectarse el antígeno del factor grupal 3,4, a pesar de que es genéticamente constitutivo en todos los serotipos de *S. flexneri* (con excepción de *S. flexneri* 6). Cuando hay simultáneamente glucosilación de la N-acetilglucosamina y acetilación de la ramnosa I, se suprime la reactividad del epitope 3,4. La acetilación de la ramnosa III no afecta la reactividad del determinante 3,4, pero sí interfiere con la adición del grupo fosfoetanolamina en la ramnosa III, que entonces ocurre en la ramnosa II (Wang y col., 2014).

I.4.5. Serotipos circulantes

Históricamente en los países en desarrollo, *S. flexneri* 2 fue el serotipo ampliamente predominante, seguido por los serotipos 1, 3 y 6 con una presencia muchísimo menor.

En la Argentina al igual que ocurrió en otros países, emergió el serotipo *S. flexneri* Xv (Ye y col. 2010; Viñas, van der Ploeg y col., datos no publicados). La aparición y diseminación de este serotipo pudo ser abordada gracias a la inmediata distribución del antisuero de producción nacional AA479 a los hospitales públicos (listados en el Anexo 1) pertenecientes a la Red de Diarreas (RNDyPBTA) (van der Ploeg y col., 2015). Entre los años 2009 y 2011 el serotipo Xv se convirtió en el segundo en prevalencia luego de *S. flexneri* 2; dicha situación fue notificada por la Dirección de Epidemiología en la semana 32 del año 2011 como evento inusitado.

En la tabla I.10. puede observarse el aumento de *S. flexneri* spp en Argentina en el período 2007-2010. La totalidad de esos aislamientos pudieron tipificarse como fenotipo E1037 positivo en base a su aglutinación con el antisuero AA479.

Tabla I.10. Distribución de serotipos de *S. flexneri* en el período 2007-2010.

Nº total de aislamientos	Año	<i>S. flexneri</i>											
		1		2		3		6		4, 5, X ó Y		spp	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
670	2007	104	15,5	369	55,1	128	19,1	45	6,7	17	2,5	7	1,0
577	2008	98	17,0	277	48,0	132	22,9	34	5,9	26	4,5	10	1,7
445	2009	69	15,5	234	52,6	54	12,1	12	2,7	5	1,1	71	16,0
708	2010	53	7,5	345	48,7	81	11,4	14	2,0	0	0,0	215	30,4

Fuente: Servicio Enterobacterias, LNR (INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán")

Los números en color rojo en la tabla I.10., reflejan como el incremento de los aislamientos de *S. flexneri* spp (que correspondieron al serotipo Xv) puede relacionarse con el descenso de los aislamientos del resto de los serotipos de *S. flexneri* (con excepción del serotipo 2).

I.5. Métodos epidemiológicos

Las técnicas de tipificación se evalúan en cuanto a su capacidad de identificación, reproducibilidad, estabilidad, poder discriminatorio, concordancia epidemiológica, eficacia, facilidad en la aplicación, rapidez en la obtención de resultados y versatilidad. Rara vez un método cumple satisfactoriamente con todos los criterios de evaluación, por lo cual se recomienda el uso combinado de diversas técnicas (Vilchez y Alonso, 2009).

Los métodos de tipificación se pueden agrupar en dos categorías: fenotípicos y genotípicos. Los primeros caracterizan los productos de expresión génica y pueden variar con las condiciones del cultivo, la fase de crecimiento, la ocurrencia de mutaciones espontáneas o la pérdida o ganancia de plásmidos, entre otras posibilidades. Los métodos genotípicos se basan en el análisis de la estructura genética de un organismo, por lo tanto están menos sujetos a variación natural y son independientes de los cambios en el patrón de expresión genética, ofreciendo así mayor estabilidad y reproducibilidad (Vilchez y Alonso, 2009).

I.5.1. Serotipificación y métodos moleculares

En particular en el estudio de *S. flexneri*, la serotipificación (método fenotípico) es considerada el método "*gold standard*". Se han evaluado otros métodos tanto fenotípicos (antibiotipo, fagotipificación) como genotípicos (ribotipificación), sin embargo los patrones obtenidos no son coincidentes con la serotipificación ya que en un mismo serotipo podemos encontrar diferentes patrones plasmídicos o a la inversa, en cepas de diferentes serotipos encontrar un patrón plasmídico igual. Por esto es que los métodos antes mencionados, pueden considerarse como estudios complementarios a la serotipificación, resultando en una discriminación más fina entre las cepas que no puede ser adquirida con un sólo método (Faruque y col., 1992).

Si bien la serotipificación es un método con una larga historia y un gran aval en cuanto a su capacidad discriminatoria, presenta algunas desventajas,

siendo la más importante la variedad de antisueros específicos necesarios para realizar la completa serotipificación de un cultivo, convirtiéndolos en reactivos de alto costo para países en vías de desarrollo. Por otro lado, durante el transporte y/o almacenamiento de los cultivos pueden existir alteraciones enzimáticas que impiden la correcta síntesis y ensamblado del antígeno O (cepas R), ante esta situación, para favorecer la expresión adecuada del antígeno de superficie se deben realizar procedimientos muy laboriosos y que requieren de personal calificado.

En los últimos años, con el objeto de afrontar las dificultades descritas para la serotipificación, se inició el desarrollo de distintos métodos moleculares de tipificación mediante la detección de los genes específicos del antígeno O.

Inicialmente la única PCR diagnóstica descrita para *Shigella* estaba dirigida específicamente hacia el gen *ipaH*, el cual está presente en todos los serotipos de los cuatro serogrupos de *Shigella* y en los serotipos pertenecientes al patogrupa enteroinvasivo de *E. coli* (Dutta y col., 2001).

Posteriormente fueron publicadas un conjunto de PCR, cuyos blancos fueron los genes *wzx* y *wzy*, que permitieron la identificación de los 18 serotipos de *S. boydii*, los 13 serotipos de *S. dysenteriae*, del serogrupo *S. sonnei* y de *S. flexneri* 6. Sin embargo los otros serotipos de *S. flexneri* no pudieron ser discriminados debido a que todos presentaron un mismo producto de amplificación (Li y col., 2009).

Recientemente se publicó la primera PCR de tipo múltiple para identificar los diferentes serotipos de *S. flexneri*, en donde no se incluyó al serotipo 6 ni a los nuevos serotipos descritos en los últimos años (Sun y col., 2011).

I.5.2. Consideraciones acerca de las PCR múltiples

La amplificación del ADN mediante técnicas de PCR es un procedimiento simple, específico y sensible.

La PCR múltiple es una variante en la que dos o más genes son amplificados simultáneamente en una misma reacción. Las principales ventajas de este sistema son el ahorro en tiempo, recursos y personal.

El diseño de los iniciadores es una de las etapas más importantes a considerar para obtener una PCR múltiple con alta especificidad y sensibilidad, para esto es importante evaluar mediante recursos bioinformáticos que los pares de iniciadores posean semejantes eficiencias de amplificación. Los iniciadores deben cumplir con las siguientes particularidades: temperaturas de alineamiento semejantes entre sí y dentro del intervalo 55° - 68 °C, una longitud de 18 a 30 bases, temperaturas de fusión (T_m) entre 55° - 80 °C y 35-60% de contenido de purinas (%GC). Además, debe predecirse la posibilidad de formación de estructuras secundarias intra e inter-iniciadores utilizando el valor de energía libre (ΔG^0) necesaria para su formación, recomendándose no utilizar iniciadores con valores menores a -8 kcal/mol de ΔG^0 (Henegariu y col., 1997).

En una PCR múltiple, los iniciadores deben cumplir las reglas mucho más estrictamente que en las PCR simples. Sin embargo, el aumento del número de iniciadores a diseñar no es la única dificultad al momento de plantear la realización de una PCR múltiple. También es importante considerar una serie de parámetros críticos algunos de los cuales se detallan en la tabla I.11 (Henegariu y col., 1997).

Tabla I.11. Parámetros críticos de la PCR y su potencial importancia

Parámetro	Importancia
Temperatura de extensión	Afecta el rendimiento de los productos de amplificación
Temperatura de hibridación	Influye en la especificidad
Tiempo de hibridación	Influye en la especificidad
Balance dNTP/MgCl ₂	Altas concentraciones de dNTP inhiben la reacción. Mayores concentraciones de MgCl ₂ aumentan la especificidad
Tamaños de amplicones	Deben resolverse con facilidad por técnicas convencionales.

Además, es importante tener en cuenta que la concentración de los iniciadores debe ensayarse empíricamente y que los cambios en las marcas de reactivos pueden afectar los resultados.

En el presente trabajo se desarrollaron PCR múltiples con blanco en los genes de los fagos responsables de la modificación de los serotipos de *S. flexneri*, evaluándose varios de los parámetros antes enunciados con el fin de optimizar los resultados.

Para preservar la continuidad de la información epidemiológica basada en los serotipos, se prestó especial atención a que los resultados obtenidos en este desarrollo guarden correlación con la serotipificación, posibilitando así la comunicación con los laboratorios que utilizan los métodos tradicionales. En este sentido, se evaluó la selectividad del método diseñado analizando su exclusividad (capacidad de no detectar un rango relevante de cepas relacionadas que pueden provocar reacciones cruzadas) y su inclusividad (habilidad en detectar un rango de cepas verdaderamente positivas para los analitos “blanco”).

I.6. Hipótesis

El desarrollo de ensayos de tipo PCR múltiple basados en la amplificación específica de los genes que codifican para los antígenos que confieren el serotipo de *S. flexneri*, permitirá disponer de un método alternativo y equiparable a la serotipificación.

I.7. Objetivos

I.7.1. Objetivo general

Obtener un método de caracterización génica que alcance a todos los serotipos de *S. flexneri* y que guarde correlación con la serotipificación para contribuir en la vigilancia epidemiológica.

I.7.2. Objetivos particulares

1. Diseñar iniciadores que permitan amplificar en forma específica los serotipos 1, 2, 4 y 5 de *S. flexneri* y los antígenos de grupo 3,4 - 6 y 7,8.
2. Estandarizar una PCR múltiple que permita, mediante la incorporación de iniciadores desarrollados *de novo* e iniciadores descritos en la literatura para el serotipo 6, la determinación de los serotipos 1, 2, 4, 5 y 6.
3. Estandarizar una PCR múltiple que permita, mediante la incorporación de iniciadores desarrollados *de novo* e iniciadores descritos en la literatura para el serotipo 7 y el antígeno de grupo E1037, la determinación del serotipo 7 y de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037.
4. Comprobar la selectividad y reproducibilidad de ambos sistemas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Diseño *de novo* de iniciadores

II.1.1. Análisis de secuencias

Utilizando los recursos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), se realizó la búsqueda en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) del gen (*rfc*) que codifica para la polimerasa del antígeno O, una de las enzimas responsables de la síntesis del antígeno somático de *S. flexneri*, así como de los genes responsables de modificar dicho antígeno originando los antígenos de serotipo 1, 2, 4 y 5 y de grupo 6 y 7,8.

En la tabla II.1 se presenta el detalle de las secuencias a analizar.

Tabla II.1. Organismo, gen y número de acceso correspondiente de las secuencias a analizar.

Nº de acceso	Genes	Organismo / Cepa	Nº de acceso	Genes	Organismo / Cepa
AF139596	<i>gtrAI</i>	<i>S. flexneri</i> 1a / Y53	NC_003444	<i>gtrA</i>	Bacteriófago SfV
	<i>gtrBI</i>			<i>gtrB</i>	
	<i>gtrI</i>			<i>gtrV</i>	
AF021347	<i>bgt</i>	Bacteriófago SfII	CP000266	<i>gtrA</i>	<i>S. flexneri</i> 5 / 8401
	<i>gtrII</i>			<i>gtrB</i>	
AE005674	<i>gtrAI</i>	<i>S. flexneri</i> 2a / 301		<i>gtrV</i>	
	<i>gtrBI</i>		<i>gtrA</i>		
	<i>gtrII</i>		<i>gtrB</i>		
	<i>rfc</i>		<i>gtrX</i>	L05001	AF547987
AF288197	<i>gtrAIV</i>	<i>S. flexneri</i> 4a / NCTC 8296	<i>oac</i>		
	<i>gtrBIV</i>				
	<i>gtrIV-Sf</i>				

Se construyó un alineamiento múltiple utilizando el programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* 5.0.7. (Hall, 1999). Luego se evaluaron las secuencias de los diferentes genes en cuanto a su nivel de homología y presencia de zonas variables, con el fin de encontrar las zonas apropiadas para el diseño de los iniciadores correspondientes.

II.1.2. Diseño *in silico* de iniciadores

Los iniciadores específicos para lograr la amplificación de los genes implicados en la expresión del antígeno somático de especie de los serotipos 1, 2, 4 y 5 y de los antígenos de grupo 6 y 7,8, fueron diseñados utilizando el programa *Primer3 Plus* (http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input).

Con el fin de incluir dentro de una PCR múltiple la amplificación relacionada con los serotipos 1, 2, 4, 5 y 6, se buscó que los iniciadores generen amplicones con tamaños de entre 350 y 900 pb; además se consideró que el producto de amplificación a obtener con los iniciadores ya descriptos para el serotipo 6 tendría un tamaño de 829 pb.

Para realizar una segunda PCR múltiple, los iniciadores para la determinación de los antígenos de grupo 6 y 7,8 y del antígeno somático de especie, se diseñaron buscando que generen amplicones con tamaños entre 100 y 300 pb.

Las secuencias de los iniciadores diseñados fueron analizadas con la base de datos de la plataforma BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/blast/>) con el objeto de evaluar la especificidad de los mismos frente a ADN de otros organismos y principalmente frente a los genomas disponibles para *S. flexneri*.

En la tabla II.2. se detallan las secuencias de los iniciadores diseñados de *novo* y los tamaños esperados para los correspondientes amplicones.

Tabla II.2. Detalle de los iniciadores diseñados de *nov*o.

Iniciador	Secuencia (5' → 3')	Gen blanco (Nº acceso)	T _m (°C)*	Tamaño de amplicón	Serotipo o factor grupal
SF	GGTGCATGGATGATTATAGA	<i>gtrB</i> (AE005674)	56,3	NA	NA
SF1	CCAATTATCCACGGTTGGTT	<i>gtrI</i> (AF139596)	58,35	382 pb	1
SF2	GCTTTAGCGATCTGCAGA	<i>gtrII</i> (AE005674)	57,62	476 pb	2
SF4	GCTGCGCATGCAACTAGTAA	<i>gtrIV</i> (AF288197)	60,4	720 pb	4
SF5	TTCTGATACTTCCGGCATTG	<i>gtrV</i> (CP000266)	58,35	592 pb	5
SFI	TGTCGGTGCGATTATCAGTT	<i>rfc</i> (AE005674)	58,35	296 pb	3,4
SFr	CCAAACAAGAACGTCGCTAA		58,35		
FG6l	ACCCTACCGCTTGAGTTCCT	<i>oac</i> (AF547987)	62,4	183 pb	6
FG6r	CAGTCCACGCAAAGGATACA		60,4		
FGXI	GGCTGATACAGGCAACATCA	<i>gtrX</i> (AF056939)	60,4	251 pb	7,8
FGXr	GGGTGGCAAACACTTTCATT		58,35		

NA: no aplica.

*T_m emitidos por Operon en base al cálculo $T_m = 81.5 + 16.6 \times \log[N_{a^+}] + \frac{41 \times (G+C)}{length} - \frac{500}{length}$ (www.operon.com)

Luego se verificaron las propiedades fisicoquímicas de los iniciadores diseñados y la probabilidad de formar estructuras secundarias (horquillas, autodímeros y/o heterodímeros). Para esta etapa se usó la herramienta OligoAnalyzer 3.1, disponible en el sitio <http://www.idtdna.com/calc/analyzer>. Una vez evaluados *in silico*, los iniciadores fueron solicitados para su síntesis a la empresa Operon (EE.UU).

II.2. Evaluación de los iniciadores descritos en la literatura

Se utilizaron iniciadores descritos para la amplificación de los genes *wzx* (Li y col., 2009), *lpt-O* (Sun y col., 2012) y *gtrIC* (Sun y col., 2011). Dichos genes codifican para la flipasa del antígeno O de *S. flexneri* 6, la síntesis del antígeno de grupo E1037 y la modificación que genera el antígeno del serotipo 7 respectivamente.

Considerando que los iniciadores para el serotipo 6 serían incluidos en la PCR múltiple para determinación de serotipos de *S. flexneri* y los iniciadores para el serotipo 7 y el antígeno de grupo E1037 se incluirían en la PCR múltiple para la determinación de factores grupales, se utilizó el programa OligoAnalyzer 3.1 para verificar las propiedades fisicoquímicas de estos iniciadores y luego solicitar su síntesis a la empresa Operon (EE.UU).

En la tabla II.3, se detalla la información concerniente a los iniciadores en cuestión.

Tabla II.3. Detalle de los iniciadores descritos en la literatura.

Iniciador	Secuencia (5'→ 3')	T _m (°C)*	Gen blanco (Nº acceso)	Tamaño de amplicón	Antígeno
SF6forw	TGGATTGACCAGAGCTGTTA	58,4	<i>wzx</i> (EU294165)	829pb	serotipo 6
SF6rev	TACTATACCTGGCGTCCCAT	60,4			
lpt-OF	ATCTAGTATTGTTGGCGTTA	54,2	<i>lpt-O</i>	1098pb	factor grupal E1037
lpt-OR	CCTTTTCTTGTGTTCTTATC	54,2			
gtrICF	AGGGAATGGCATTAGGGATG	62,6	<i>gtrIC</i> (FJ905303)	518pb	serotipo 7
gtrICR	GCTGCAAGTGGTTTTTGTGGGA	60,8			

*T_m emitidos por Operon en base al cálculo $T_m = 81.5 + 16.6 \times \log[N_{a^+}] + \frac{41 \times (G+C)}{length} - \frac{500}{length}$ (www.operon.com)

II.3. Cepas utilizadas

Se usó un panel de 54 cepas de *S. flexneri* que incluyeron cultivos utilizados para la producción de antisueros y aislamientos provenientes de muestras de materia fecal de origen humano. Dicho panel incluyó todos los serotipos descritos hasta el momento para *S. flexneri* (tabla II.4) excepto *S. flexneri* 4c.

Las cepas empleadas en este trabajo fueron serotipificadas por aglutinación en lámina con antisueros policlonales monoespecíficos elaborados en el Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB, Argentina) y/o anticuerpos monoclonales (Reagensia AB, Suecia). Todos los cultivos fueron mantenidos a -70°C en caldo tripticosa soja con glicerina como conservante.

Tabla II.4. Detalle y cantidad de los cultivos utilizados

Serotipo de <i>S. flexneri</i>	Estructura antigénica	Nº de cepas utilizadas
1a	I:4	5
1b	I:6	3
1d	I:7,8	1
2a	II:3,4	5
2b	II:7,8	4
3a	III:6,7,8	2
3b	III:3,4,6	4
4a	IV:3,4	4
4av	IV:3,4,E1037	1
4b	IV:6	2
5a	V:3,4	2
5b	V:7,8	3
6	VI:(4)	5
7a	VII:3,4	1
7b	VII:3,4,6	1
X	--:7,8	4
Xv	--:7,8,E1037	1
Y	--:3,4	5
Yv	--:3,4,E1037	1

II.4. Crecimiento bacteriano. Preparación de suspensión antigénica y extracción del ADN

Las cepas a estudiar fueron sembradas en 2 mL de caldo tripticasa soja e incubadas con agitación a 37°C durante 6 h. Luego se sembraron en una placa y una estría conteniendo agar tripticasa soja y se incubaron a 37°C durante 18 h.

Una colonia aislada en la placa se suspendió en 200 µL de agua milliQ; dicha suspensión se calentó a 100 °C durante 20 minutos a Baño María y luego se centrifugó por 5 minutos a 7.000 rpm. El sobrenadante obtenido se utilizó como templado para la PCR.

Por otro lado, el crecimiento de la estría fue cosechado con 1 mL de solución fisiológica formolada 5 ‰. La suspensión bacteriana resultante se utilizó para realizar las reacciones de seroaglutinación.

II.5. Ensayos serológicos

Las pruebas de seroaglutinación fueron realizadas por el método de aglutinación en lámina de acuerdo a las instrucciones provistas por cada productor. Sobre una lámina de vidrio se enfrentaron 20 µL de la suspensión bacteriana correspondiente con 20 µL del antisuero o del anticuerpo a probar. Se mezcló por rotación durante 1 minuto. La presencia o ausencia de aglutinación se observó bajo luz directa e intensa. Se consideró una aglutinación positiva de 4+ o 3+ a una rápida aglutinación con presencia de fondo límpido o turbio respectivamente.

II.6. Amplificación del ADN (PCR)

La amplificación se realizó en un termociclador Multigene Thermal Cycler (Labnet International Inc., EE.UU) usando 20 µl de una mezcla (llamada de ahora en más "mezcla de reacción") conteniendo Buffer Tris-HCl (pH 8.0) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 1 U de *Taq* ADN Polimerasa (Invitrogen, Brasil) y deoxinucleósidos trifosfato 200 µM (Invitrogen, EE.UU), así como

también, cada uno de los iniciadores en la concentración determinada oportunamente.

Las condiciones generales establecidas para la amplificación se detallan en la tabla II.5.

Tabla II.5. Condiciones generales de amplificación.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Cantidad de ciclos
Incubación	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	1 minuto	
Hibridación	a evaluar	a evaluar	30
Extensión	72°C	1,5 minutos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

II.7. Visualización de los productos de PCR

Diez microlitros de los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis horizontal en un gel conteniendo 2% de agarosa (Biodynamics, Argentina) en solución tampón TAE (Tris-Acetato 10mM, EDTA 1mM). La electroforesis se realizó a voltaje constante (90 voltios) durante 50 minutos.

Luego, el gel fue teñido con bromuro de etidio (Bio-Rad, EE.UU) en la concentración de 1µg/mL y examinado mediante un transiluminador (DNyA Light; Labnet, EE.UU) de emisión ultravioleta de 302 nm para visualizar las bandas de ADN.

Para verificar el tamaño de los fragmentos se utilizaron marcadores de peso molecular de ADN en los rangos 100 a 1000 pb (100-200-300-400-500-600-700-800-900-1000 pb; Sigma, Argentina) y/o 50 a 2000 bp (50-100-200-300-400-500-700-1000-1500-2000pb; Bio-Rad, EE.UU).

Los geles fueron fotografiados con el sistema de Documentación digital DOC-6490 (Biodynamics, Argentina).

II.8. PCR múltiple para la determinación de los serotipos 1, 2, 4, 5 y 6 de *S. flexneri*

II.8.1. Determinación de la temperatura de hibridación óptima para llevar a cabo cada una de las PCR simples

El objetivo fue determinar una temperatura común para todos los cebadores, en la que se minimicen las reacciones inespecíficas y se obtenga la banda de amplificación específica en forma suficientemente intensa como para ser visualizada en el gel.

Considerando los T_m de los iniciadores escogidos, se realizaron reacciones de amplificación utilizando seis temperaturas dentro del rango 51°C – 61°C. La amplificación se realizó utilizando cada uno de los correspondientes iniciadores en la concentración 1 μ M. En la tabla II.6 se detallan las condiciones de amplificación utilizadas.

Tabla II.6. Condiciones de amplificación utilizadas para determinar la temperatura de hibridación óptima en las PCR simples.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Cantidad de ciclos
Incubación	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	1 minuto	
Hibridación	variable	2 minutos	30
Extensión	72°C	1,5 minutos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

II.8.2. Determinación de la selectividad de cada una de las PCR simples

La amplificación se realizó en las mismas condiciones descritas en el punto II.8.1., utilizando 57°C como temperatura de hibridación.

Como control negativo se utilizó un templado de cada uno de los serotipos detallados en la Tabla II.7, mientras que como control positivo, se usó el total de los templados disponibles para cada serotipo.

Tabla II.7. Controles utilizados en cada PCR simple.

PCR	Controles positivos – Serotipos	Controles negativos
<i>S. flexneri</i> 1	1a -1b	2a – 3a – 4a – 5b – 6 – X - Y
<i>S. flexneri</i> 2	2a -2b	1b – 3a – 4a – 5b – 6 – X - Y
<i>S. flexneri</i> 4	4a -4b	1b - 2a – 3a – 5b – 6 – X - Y
<i>S. flexneri</i> 5	5a -5b	1b - 2a – 3a – 4a – 6 – X - Y
<i>S. flexneri</i> 6	6	1b - 2a – 3a – 4a – 5b – X - Y

II.8.3. Determinación de la temperatura de hibridación óptima para llevar a cabo la PCR múltiple

Una vez establecidas las posibles temperaturas de hibridación para cada una de las PCR simples y confirmada la selectividad de las mismas, se procedió a realizar la PCR múltiple con las mismas condiciones utilizadas en la determinación de temperatura de las PCR individuales aunque variando la temperatura de hibridación. Las temperaturas utilizadas fueron: 53°C - 55°C y 57°C.

Para cada uno de los serotipos evaluados se utilizaron 2 templados diferentes.

II.8.4. Determinación de la concentración óptima de los iniciadores para llevar a cabo la PCR múltiple

Se realizaron amplificaciones con cada uno de los templados usando todos los iniciadores en las concentraciones 0,125 µM, 0,25 µM ó 0,50 µM.

Para este ensayo se utilizaron los templados de los serotipos de *S. flexneri* 1a, 2a, 4b, 5a y 6.

II.8.5. Evaluación con el total de los serotipos, de las condiciones óptimas determinadas para realizar la PCR múltiple

Una vez definida la temperatura y concentración de cada iniciador óptima para la realización de la PCR múltiple, se evaluaron nuevamente los serotipos convencionales, incorporándose además los serotipos descriptos en los últimos años, a saber: 1d, 4av, 7a, 7b, Xv e Yv.

II.8.6. Determinación del tiempo de hibridación óptimo para llevar a cabo la PCR múltiple

Con el objetivo de analizar el efecto del tiempo de hibridación sobre las amplificaciones inespecíficas, se realizaron ensayos con las condiciones definidas previamente, pero utilizando los siguientes tiempos de hibridación: 30 – 45 – 60 y 90 segundos.

II.9. PCR múltiple para la determinación del serotipo 7 y de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de *S. flexneri*

II.9.1. Determinación de las condiciones óptimas para la determinación de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de *S. flexneri*

Se aplicaron las condiciones de tiempo y temperatura establecidas para la PCR múltiple de serotipos.

La amplificación se realizó utilizando cada uno de los iniciadores en la concentración 0,25 μM . En base a los resultados obtenidos se repitió el ensayo utilizando los iniciadores para el factor E1037 en concentración 0,50 μM .

II.9.2. Determinación de las condiciones óptimas para la incorporación del serotipo 7 en la PCR múltiple para la determinación de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de *S. flexneri*

Se aplicaron las condiciones de tiempo y temperatura establecidas para la PCR múltiple de serotipos.

La amplificación se realizó utilizando cada uno de los iniciadores en la concentración 0,25 μM , excepto lpt-OF y lpt-OR que se utilizaron en concentración 0,50 μM .

II.10. Secuenciación de genes

Para comprobar la identidad del producto de amplificación, se procedió a la secuenciación de aquellos genes que mostraron resultados aleatorios en los diferentes ensayos.

A partir de un gel de agarosa, se purificaron las bandas de amplificación correspondientes utilizando el kit de purificación "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega Corporation, EE.UU).

La secuenciación se realizó en ambos sentidos, en el Servicio de Neurovirosis del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (ANLIS - "Dr. Carlos G. Malbrán"), utilizando un secuenciador de ADN automático "ABI PRISM 337" y el sistema comercial "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems Inc., EE.UU).

III. RESULTADOS

III.1. Evaluación de los iniciadores

III.1.1. Iniciadores diseñados *de novo*

La estrategia utilizada en el diseño de los iniciadores para la amplificación de los serotipos 1, 2, 4 y 5 de *S. flexneri*, consideró la utilización de un único iniciador común complementario al gen *gtrB* (altamente conservado entre estos serotipos) y de un iniciador específico para el gen *gtr_{type}* de cada uno de los cuatro bacteriófagos.

En la figura III.1. se representa de manera esquemática el sitio de unión de los iniciadores a los correspondientes genes.

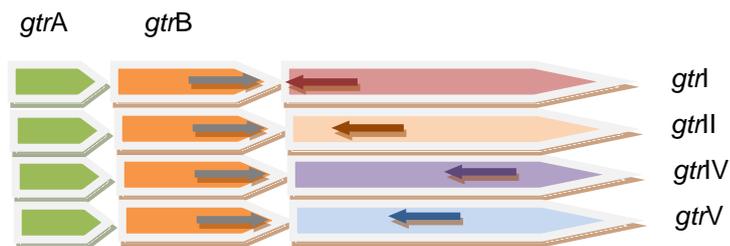


Figura III.1. Esquema de los sitios de unión de los iniciadores diseñados para la amplificación de los serotipos 1, 2, 4 y 5 de *S. flexneri*.

En la figura III.2. se puede observar la alta homología del extremo final entre los genes *gtrB* de los fagos Sf1, Sf2, Sf4 y Sf5, así como el sitio de hibridación del iniciador común diseñado. También puede observarse la gran variabilidad de los genes *gtr_{type}* que permitió diseñar iniciadores específicos para cada uno de los serotipos y sus respectivos sitios de hibridación.

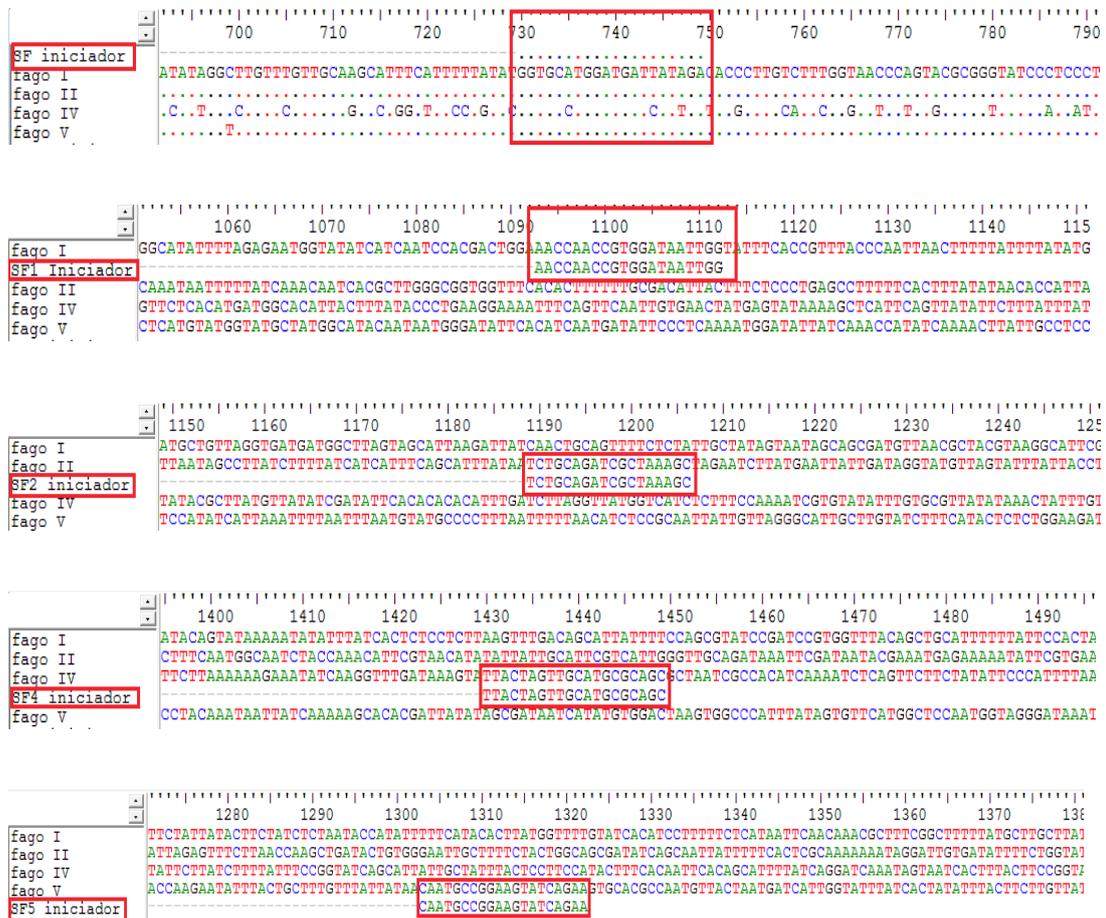


Figura III.2. Alineamiento del extremo final de los genes *gtrB* y del comienzo de los *gtr_{type}* con cada uno de los iniciadores

Para la identificación del antígeno de grupo 7,8 se decidió utilizar directamente al gen *gtrX* como blanco genómico para el diseño de los iniciadores directo y reverso dado que no se encontró ningún iniciador en la región final del gen *gtrB* que fuera compatible con un producto de amplificación del tamaño planteado (100 a 300 pb).

Luego, para los antígenos de grupo 3,4 y 6 se eligieron iniciadores recomendados por el programa para los genes *wzx* y *oac* respectivamente.

El resultado de las propiedades fisicoquímicas de los iniciadores diseñados se detallan en la tabla III.1.

Tabla III.1. Propiedades físicoquímicas de los iniciadores diseñados *de novo*.

Iniciador	pb	% GC	Tm (°C)	ΔG (kcal/mol) necesaria para la formación de:	
				horquillas	homodímeros
SF	20	40	49,3	-0,5	-7,05
SF1	20	45	53	-1,01	-6,97
SF2	18	50	52,3	-1,49	-13,39
SF4	20	50	56	-1,38	-13,8
SF5	20	45	52,5	0,8	-9,75
FG6l	20	45	53,4	-1,24	-6,34
FG6r	20	50	54,8	-0,52	-5,02
SFI	20	45	54,1	-0,15	-5,19
SFr	20	45	53,3	1,43	-6,3

Cuando se analizaron los iniciadores SF, SF1, SF2, SF4, SF5, FGXI, FGXr, FG6l y FG6r con la base de datos BLASTn, se obtuvo un resultado satisfactorio en cuanto a la homología exclusiva con las secuencias correspondientes al gen esperado y en el organismo esperado. A modo de ejemplo, se muestra en la figura III.3. el resultado de la búsqueda obtenida con la secuencia del iniciador SF1, para el cual se obtuvieron solamente dos secuencias con 100% de identidad y *e-values* cercanos a cero. Dichas secuencias forman parte, una de un bacteriófago Sf1 y la otra de un aislamiento de *S. flexneri* 1.

En el caso de los iniciadores SFI y SFr, además de con las secuencias esperadas dentro del grupo de *S. flexneri*, alinearon con los genes *wzy* que codifican para la polimerasa del antígeno O de aislamientos pertenecientes a los serotipos O13, O129 y O135 de *E. coli*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Enterobacteria phage Sf1, complete genome	40.1	40.1	100%	0.15	100%	gi 404074235 X 509734.1
<input type="checkbox"/> <i>Shigella flexneri</i> dsdC gene, partial sequence, GtrA (gtrA), GtrB (gtrB), and Gtr (gtr) genes, complete cds: int.genes, partial sequence: rRNA-Thr (thrV), gene, complete sequence: Prc	40.1	40.1	100%	0.15	100%	gi 6103436 AF139596.1
<input type="checkbox"/> <i>Diphyllobothrium latum</i> genome assembly: D_latum_Genova_scaffold DILI_scaffold002659	34.2	34.2	85%	9.1	100%	gi 68906667 LL572643.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> transcription factor bHLH48-like (LOC105122723), transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	80%	36	100%	gi 743816946 XM_011021995.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Populus euphratica</i> transcription factor bHLH48-like (LOC105122722), transcript variant X2, mRNA	32.2	32.2	80%	36	100%	gi 743816942 XM_011021993.1

Figura III.3. Resultado de la búsqueda en BLASTn con la secuencia correspondiente al iniciador SF1.

III.1.2. Iniciadores descritos en la literatura

Al ser analizados con la base de datos BLASTn, los seis iniciadores presentaron resultados satisfactorios, alineando en forma óptima con las secuencias correspondientes al gen esperado y en el organismo esperado.

En el caso del par de iniciadores para la amplificación del gen *wzx* de *S. flexneri* 6, también se observó un alineamiento perfecto con el gen *wzx* que codifica para la flipasa del antígeno O del serotipo O147 de *E. coli*.

El resultado de las propiedades fisicoquímicas de los iniciadores tomados de otros trabajos, se detallan en la tabla III.2.

Tabla III.2. Propiedades fisicoquímicas de los iniciadores descritos en la literatura.

Iniciador	pb	% GC	Tm (°C)	ΔG (kcal/mol) necesaria para	
				la formación de:	
				horquillas	Homodímeros
SF6forw	20	45	53,4	-1,24	-6,34
SF6rev	20	50	54,8	-0,52	-5,02
lpt-OF	20	35	48,5	1,71	-4,16
lpt-OR	20	35	46,3	3,12	-1,47
gtrICF	20	50	54,6	3,12	-1,47
gtrICR	22	45,5	56,9	0,14	-7,05

III.1.3. Iniciadores diseñados *de novo* vs descritos en la literatura

En las tablas de doble entrada III.3. y III.4. puede observarse el valor de energía libre (ΔG) que predice la posibilidad de formación de heterodímeros entre los diferentes iniciadores utilizados en cada una de las reacciones múltiples.

Tabla III.3. Energía libre (kcal/mol) necesaria para la formación de heterodímeros entre los iniciadores a utilizar en la PCR múltiple de serotipos.

	SF	SF1	SF2	SF4	SF5	SF6forw	SF6rev
SF	NA	-8,07	-7,05	-10,48	-5,09	-5,02	-6,5
SF1	-8,07	NA	-3,61	-5,24	-6,68	-8,07	-5,02
SF2	-7,05	-3,61	NA	-7,05	-5,13	-5,13	-3,61
SF4	-10,48	-5,24	-7,05	NA	-6,57	-4,74	-6,75
SF5	-5,09	-6,68	-5,13	-6,57	NA	-5,13	-3,61
SF6forw	-5,02	-8,07	-5,13	-4,74	-5,13	NA	-6,62
SF6rev	-6,5	-5,02	-3,61	-6,75	-3,61	-6,62	NA

NA: no aplica

Tabla III.4. Energía libre (kcal/mol) necesaria para la formación de heterodímeros entre los iniciadores a utilizar en la PCR múltiple para la determinación de los antígenos de grupo y del serotipo 7.

	SFI	SFr	FG6l	FG6r	FGXI	FGXr	lpt-OF	lpt-OR	gtrICF	gtrICR
SFI	NA	-8,33	-8,02	-8,7	-7,56	-5,09	-3,61	-3,07	-5,09	-5,09
SFr	-5,5	NA	-5,5	-4,95	-3,14	-5,02	-7,18	-10,36	-5,02	-7,18
FG6l	-8,02	-5,5	NA	-6,24	-4,67	-7,48	-6,75	-1,6	-8,7	-5,5
FG6r	-8,7	-4,95	-6,24	NA	-3,55	-6,37	-8,09	-8,56	-5,02	-6,6
FGXI	-7,56	-3,14	-4,67	-3,55	NA	-3,53	-7,19	-5,24	-5,0	-7,19
FGXr	-5,09	-5,02	-7,48	-6,37	-3,53	NA	-5,24	-6,58	-5,37	-6,84
lpt-OF	-3,61	-7,18	-6,75	-8,09	-7,19	-5,24	NA	-3,07	-3,42	-3,90
lpt-OR	-3,07	-10,36	-1,6	-8,56	-5,24	-6,58	-3,07	NA	-4,67	-5,5
gtrICF	-5,09	-5,02	-8,7	-5,02	-5,0	-5,37	-3,42	-4,67	NA	-5,09
gtrICR	-5,09	-7,18	-5,5	-6,6	-7,19	-6,84	-3,90	-5,5	-5,09	NA

NA: no aplica

Los números que figuran en rojo en las dos tablas anteriores, son aquellos pares de iniciadores que requieren un valor de energía libre menor al recomendado para la formación de heterodímeros. Dichos iniciadores de todas formas serán probados empíricamente.

III.2. Ajuste de la PCR múltiple para la determinación de los serotipos 1, 2, 4, 5 y 6 de *S. flexneri*

III.2.1. Determinación de la temperatura de hibridación óptima para llevar a cabo cada una de las PCR simples

Considerando los T_m de los iniciadores (tablas II.2. y II.3.) se evaluaron las siguientes temperaturas: 51,2°C - 52,7°C - 54,3°C - 56,6°C - 59,3°C y 61°C.

Los resultados de las amplificaciones a las diferentes temperaturas para los serotipos *S. flexneri* 1, 2, 4, 5 y 6 se muestran en las figuras III.4. y III.5.

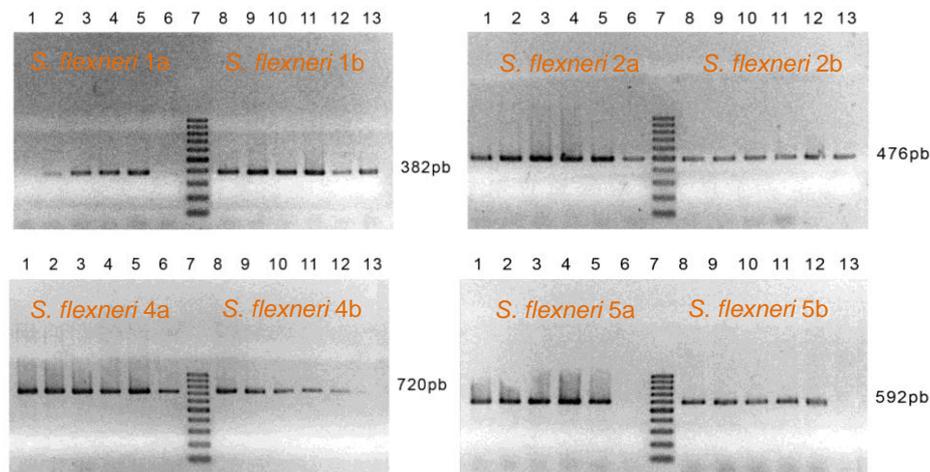


Figura III.4. Gradiente de temperatura para los serotipos *S. flexneri* 1, 2, 4 y 5. Calles 1 a 6: temperaturas 51,2°C - 52,7°C - 54,3°C - 56,6°C - 59,3°C - 61°C. Calle 7: marcador de PM (rango 100 - 1000pb). Calles 8 a 13: temperaturas 51,2°C - 52,7°C - 54,3°C - 56,6°C - 59,3°C - 61°C.

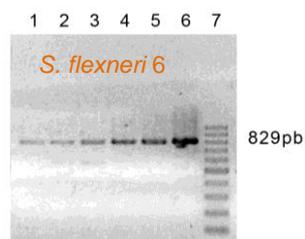


Figura III.5. Gradiente de temperatura para la amplificación de *S. flexneri* 6. Calles 1 a 6: *S. flexneri* 6, temperaturas 51,2°C - 52,7°C - 54,3°C - 56,6°C - 59,3°C - 61°C. Calle 7: marcador de PM (rango 100 - 1000pb).

Considerando la intensidad de las bandas observadas en las diferentes temperaturas para cada serotipo, se define en la tabla III.5. el posible rango de temperaturas a utilizar con cada iniciador para la hibridación.

Tabla III.5. Posibles temperaturas de hibridación

Iniciador	T _m (°C)	Rango de temperaturas posibles (°C)
SF	56,3	NA
SF1	58,3	54°C-59°C
SF2	57,6	53°C -59°C
SF4	60,4	51°C-57°C
SF5	58,3	51°C-59°C
SF6forw	58,4	54°C-61°C
SF6rev	60,4	

NA: no aplica

Se seleccionó la temperatura de 57°C para llevar a cabo la PCR múltiple, ya que a temperaturas superiores disminuye la intensidad de la banda obtenida como producto de la amplificación del serotipo 4b (figura III.4.).

III.2.2. Determinación de la selectividad de cada una de las PCR simples

En las pruebas realizadas para cada una de las PCR simples, se obtuvo 100% de especificidad (en términos de inclusividad y exclusividad). Cada PCR amplificó el serotipo esperado, independientemente del subserotipo que representara (ej: *S. flexneri* serotipo 1, subserotipo 1a o 1b) y no amplificó con ninguno de los otros serotipos de *S. flexneri* (datos no mostrados).

III.2.3. Determinación de la temperatura de hibridación óptima para llevar a cabo la PCR múltiple

Cuando se realizó la PCR múltiple en las condiciones establecidas como óptimas para el conjunto de cada una de las PCR simples, los serotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 4a, 5b y 6 mostraron la banda esperada y con una intensidad apreciable, sin embargo, no se obtuvo amplificación del serotipo 4b, y la banda obtenida para el serotipo 5a resultó de muy baja intensidad. Con respecto a los serotipos 3a, 3b, X e Y, como era esperable no se obtuvo amplificación alguna (figura III.6).

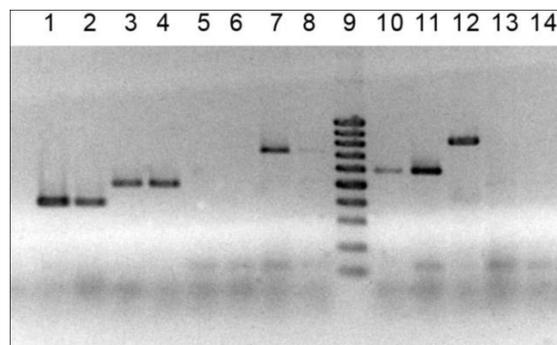


Figura III.6. Resultados de la PCR múltiple realizada a 57°C.

Calle 1: *S. flexneri* 1a. Calle 2: *S. flexneri* 1b. Calle 3: *S. flexneri* 2a. Calle 4: *S. flexneri* 2b. Calle 5: *S. flexneri* 3a. Calle 6: *S. flexneri* 3b. Calle 7: *S. flexneri* 4a. Calle 8: *S. flexneri* 4b. Calle 9: marcador de PM (rango 100 - 1000). Calle 10: *S. flexneri* 5a. Calle 11: *S. flexneri* 5b. Calle 12: *S. flexneri* 6. Calle 13: *S. flexneri* X. Calle 14: *S. flexneri* Y.

Con este primer resultado y sabiendo que en una PCR múltiple hay varios factores que pueden afectar los resultados con respecto a cada una de las PCR simples, se decidió evaluar la amplificación utilizando 55°C y 53°C como temperatura de hibridación.

Los resultados de ambas amplificaciones pueden apreciarse en las figuras III.7. y III.8.

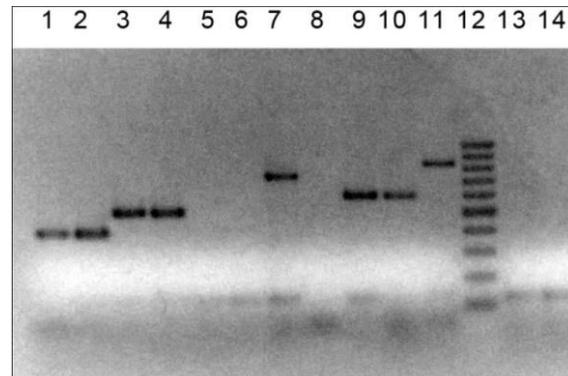


Figura III.7. Resultados de la PCR múltiple realizada a 55°C.

Calle 1: *S. flexneri* 1a. Calle 2: *S. flexneri* 1b. Calle 3: *S. flexneri* 2a. Calle 4: *S. flexneri* 2b.
 Calle 5: *S. flexneri* 3a. Calle 6: *S. flexneri* 3b. Calle 7: *S. flexneri* 4a. Calle 8: *S. flexneri* 4b.
 Calle 9: *S. flexneri* 5a. Calle 10: *S. flexneri* 5b. Calle 11: *S. flexneri* 6. Calle 12: marcador de
 PM (rango 100 - 1000). Calle 13: *S. flexneri* X. Calle 14: *S. flexneri* Y.

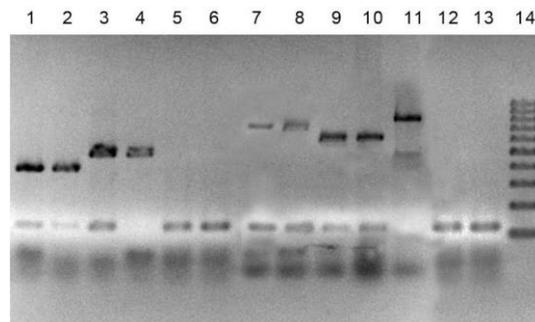


Figura III.8. Resultados de la PCR múltiple realizada a 53°C.

Calle 1: *S. flexneri* 1a. Calle 2: *S. flexneri* 1b. Calle 3: *S. flexneri* 2a. Calle 4: *S. flexneri* 2b.
 Calle 5: *S. flexneri* 3a. Calle 6: *S. flexneri* 3b. Calle 7: *S. flexneri* 4a. Calle 8: *S. flexneri* 4b.
 Calle 9: *S. flexneri* 5a. Calle 10: *S. flexneri* 5b. Calle 11: *S. flexneri* 6. Calle 12: *S. flexneri* X.
 Calle 13: *S. flexneri* Y. Calle 14: marcador de PM (rango 100 - 1000).

Realizando la PCR múltiple con 55°C de temperatura de hibridación, pudo resolverse la intensidad de la banda del serotipo 5a, sin embargo siguió sin obtenerse la amplificación del serotipo 4b (figura III.7.).

La banda correspondiente a la amplificación del serotipo 4b pudo observarse cuando la reacción se realizó con 53°C como temperatura de hibridación, pero a esta temperatura se observaron también amplificaciones inespecíficas con bandas de notoria intensidad en aproximadamente 120 pb en casi todos los serotipos y una banda en aproximadamente 450 pb en el serotipo 6 (figura III.8.).

La temperatura de hibridación elegida para continuar con la puesta a punto de esta PCR múltiple fue 55°C. A esta temperatura se observó la correcta amplificación de todos los serotipos evaluados (con excepción del serotipo 4b) y la ausencia de amplificaciones inespecíficas.

La amplificación de los cuatro templados de *S. flexneri* 4a a 55°C y a 57°C y la no amplificación de los dos templados de *S. flexneri* 4b a esas mismas temperaturas, llevó a suponer que podría haber alguna diferencia en el gen *gtrIV* de estos dos serotipos, razón por la cual se procedió a secuenciar el producto de PCR del gen *gtrIV* de un aislamiento de cada uno de estos dos serotipos.

III.2.4. Determinación de la concentración óptima de los iniciadores para llevar a cabo la PCR múltiple

El ensayo se realizó bajo el formato de PCR múltiple, con el fin de evaluar la óptima concentración de cada iniciador dentro de la mezcla y así contemplar la posibilidad de acoplamiento inter-iniciadores.

En este ensayo se usaron concentraciones menores (0,50, 0,25 y 0,125 μM) a la inicialmente utilizada (1 μM).

La figura III.9. muestra los resultados de amplificación obtenidos con las diferentes concentraciones de iniciadores.

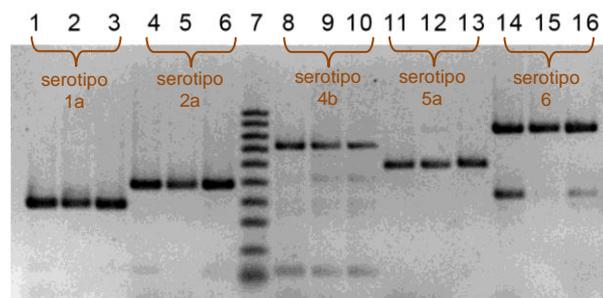


Figura III.9. Resultados de la amplificación variando las concentraciones de los iniciadores.

Calles 1, 4, 8, 11 y 14: iniciadores en concentración 0,5 μM .

Calles 2, 5, 9, 12 y 15: iniciadores en concentración 0,25 μM .

Calles 3, 6, 10, 13 y 16: iniciadores en concentración 0,125 μM .

Calle 7: marcador de PM (rango 100 - 1000)

En los serotipos 1, 2 y 5 no se observó diferencia alguna en la amplificación realizada con las diferentes concentraciones de iniciadores, razón por la cual se elige la menor concentración (0,125 μM).

A diferencia de lo que ocurría utilizando los iniciadores en la concentración 1 μM , obtuvimos la amplificación del serotipo 4b con las tres concentraciones de iniciadores utilizadas. Se utilizará la concentración 0,25 μM ya que en la concentración 0,125 μM hay una leve disminución en la intensidad de la banda.

La intensidad de la banda en el serotipo 6 es constante con las tres concentraciones de iniciadores. Se elige la concentración 0,25 μM debido a que es la única en la que no se observa la presencia de bandas inespecíficas, aunque cabe aclarar que dicha situación podría deberse a un error experimental.

Siendo que el iniciador SF es el iniciador común para la amplificación de los serotipos 1, 2, 4 y 5, se utilizará en la concentración 0,25 μM debido a que es la mayor concentración en la que se utiliza uno de los iniciadores (SF4).

III.2.5. Evaluación con el total de los serotipos, de las condiciones óptimas determinadas para realizar la PCR múltiple

La figura III.10. evidencia los resultados de la amplificación realizada. Si bien se observa la amplificación específica esperada para todos y cada uno de los serotipos, incluido el serotipo 4b, aparecen muchas bandas debidas a amplificaciones inespecíficas, principalmente en los serotipos 3, 4, 6 y Xv. Con estos resultados se procedió a evaluar el efecto de diferentes tiempos de hibridación sobre la amplificación inespecífica.

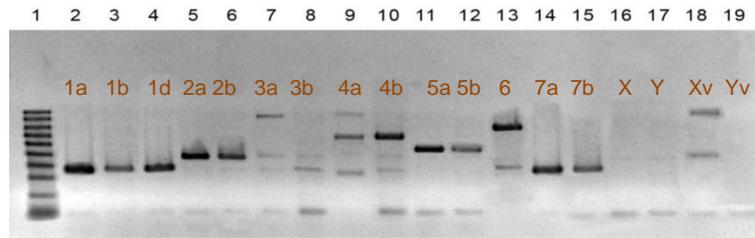


Figura III.10. Resultados de la PCR múltiple con todos los serotipos descriptos.

Calle 1: marcador de PM (rango 100 - 1000). Calle 2: *S. flexneri* 1a. Calle 3: *S. flexneri* 1b. Calle 4: *S. flexneri* 1d. Calle 5: *S. flexneri* 2a. Calle 6: *S. flexneri* 2b. Calle 7: *S. flexneri* 3a. Calle 8: *S. flexneri* 3b. Calle 9: *S. flexneri* 4a. Calle 10: *S. flexneri* 4b. Calle 11: *S. flexneri* 5a. Calle 12: *S. flexneri* 5b. Calle 13: *S. flexneri* 6. Calle 14: *S. flexneri* 7a. Calle 15: *S. flexneri* 7b. Calle 16: *S. flexneri* X. Calle 17: *S. flexneri* Y. Calle 18: *S. flexneri* Xv. Calle 19: *S. flexneri* Yv.

III.2.6. Determinación del tiempo de hibridación óptimo para llevar a cabo la PCR múltiple

Se realizó la amplificación utilizando cuatro tiempos de hibridación menores al utilizado inicialmente (2 minutos). Los serotipos más problemáticos en cuanto a la presencia de bandas inespecíficas son aquellos que no tienen banda específica de serotipo (3, X, Xv, Y, Yv), de estos se eligió a *S. flexneri* 3 que es el más importante por prevalencia. En la figura III.11. pueden observarse los resultados de las amplificaciones obtenidos con los diferentes tiempos.

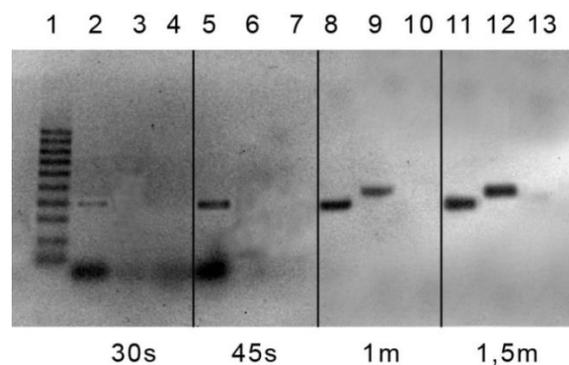


Figura III.11. Resultados obtenidos con los diferentes tiempos de hibridación

Calle 1: marcador de PM (rango 100 - 1000). Calles 2, 5, 8 y 11: *S. flexneri* 1a. Calles 3, 6, 9 y 12: *S. flexneri* 2a. Calles 4, 7, 10 y 13: *S. flexneri* 3a.

Se determinó utilizar 1,5 minutos como tiempo para la hibridación, a dicha temperatura se observan con suficiente intensidad las bandas de amplificación esperadas y no se observa ninguna banda producto de amplificación inespecífica.

La amplificación realizada con todos los serotipos utilizando el tiempo de hibridación antes indicado, puede observarse en la figura III.12.

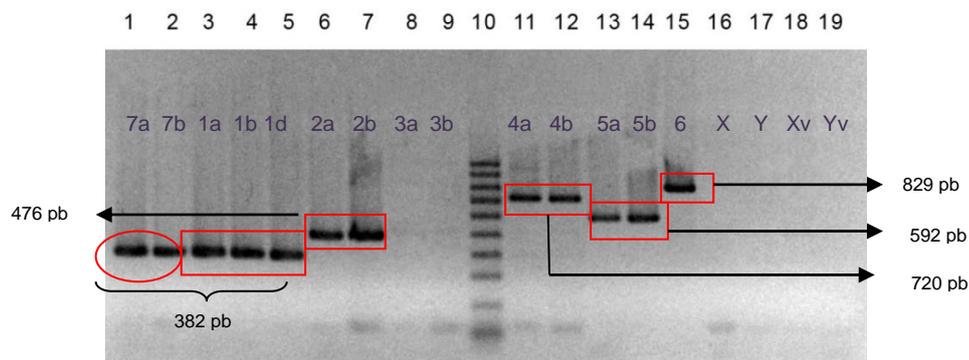


Figura III.12. PCR múltiple realizada a 55°C y durante 1,5 minutos como condiciones de hibridación

Calle 1: *S. flexneri* 7a. Calle 2: *S. flexneri* 7b. Calle 3: *S. flexneri* 1d. Calle 4: *S. flexneri* 1a. Calle 5: *S. flexneri* 1b. Calle 6: *S. flexneri* 2a. Calle 7: *S. flexneri* 2b. Calle 8: *S. flexneri* 3a. Calle 9: *S. flexneri* 3b. Calle 10: marcador de PM (rango 100 - 1000). Calle 11: *S. flexneri* 4a. Calle 12: *S. flexneri* 4b. Calle 13: *S. flexneri* 5a. Calle 14: *S. flexneri* 5b. Calle 15: *S. flexneri* 6. Calle 16: *S. flexneri* X. Calle 17: *S. flexneri* Y. Calle 18: *S. flexneri* Xv. Calle 19: *S. flexneri* Yv.

III.3. PCR múltiple para la determinación del serotipo 7 y de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de *S. flexneri*

III.3.1. Análisis de las condiciones óptimas para la determinación de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de *S. flexneri*

Se aplicaron las condiciones de tiempo y temperatura establecidas para la PCR múltiple de serotipos con el fin de poder realizar ambas reacciones en paralelo.

Se usó inicialmente una concentración 0,25 μ M para cada iniciador. En la figura III.13. pueden visualizarse los resultados.

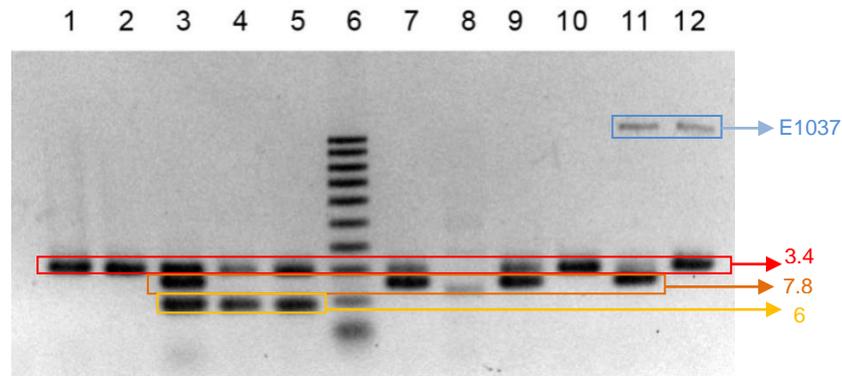


Figura III.13. Amplificaciones obtenidas con la PCR múltiple para factores grupales.

Calle 1: *S. flexneri* 1a. Calle 2: *S. flexneri* 2a. Calle 3: *S. flexneri* 3a. Calle 4: *S. flexneri* 3b. Calle 5: *S. flexneri* 4b. Calle 6: marcador de PM (rango 100 - 1000). Calle 7: *S. flexneri* 5b. Calle 8: *S. flexneri* 6. Calle 9: *S. flexneri* X. Calle 10: *S. flexneri* Y. Calle 11: *S. flexneri* Xv. Calle 12: *S. flexneri* Yv.

Siendo que la banda correspondiente a la amplificación del gen *lpt-O* se ve muy débil con respecto al resto de las bandas, se aumentó la concentración de los iniciadores *lpt-OF* y *lpt-OR* a 0,50 μM y se logró así intensificar las bandas en cuestión (figura III.14.).

La tabla III.6. detalla los genes amplificados para cada uno de los serotipos de las fotos III.13. y III.14.

Tabla III.6. Detalle de los factores grupales en los serotipos evaluados

Serotipo (estructura antigénica)	Factor grupal			
	Tamaño amplicón (pb)			
	3,4 296	6 183	7,8 251	E1037 1098
<i>S. flexneri</i> 1a (I:4)	•			
<i>S. flexneri</i> 2a (II:4)	•			
<i>S. flexneri</i> 3a (III:6,7,8)	•	•	•	
<i>S. flexneri</i> 3b (III:3,4,6)	•	•		
<i>S. flexneri</i> 4b (IV:6)	•	•		
<i>S. flexneri</i> 5b (V:7,8)	•		•	
<i>S. flexneri</i> 6 (VI:4)				
<i>S. flexneri</i> X (--:7,8)	•		•	
<i>S. flexneri</i> Y (--: :3,4)	•			
<i>S. flexneri</i> Xv (--:7,8,E1037)	•		•	•
<i>S. flexneri</i> Yv (--:3,4,E1037)	•			•
<i>S. flexneri</i> 7a (VII:3,4)	•			
<i>S. flexneri</i> 7b (VII:3,4,6)	•	•		

•	Gen presente
	Gen ausente

III.3.2. Determinación de las condiciones óptimas para la incorporación del serotipo 7 en la PCR múltiple para la determinación de los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037 de *S. flexneri*

Se realizó una nueva reacción de amplificación bajo las condiciones de tiempo y temperatura establecidas para la PCR múltiple de serotipos e incorporando el par de iniciadores necesarios para la amplificación del gen *gtrIC*.

Todos los iniciadores se utilizaron en la concentración 0,25 μ M, excepto lpt-OF y lpt-OR que se utilizaron en la concentración 0,50 μ M.

En la figura III.14. puede observarse la imagen de los resultados obtenidos; además, en la tabla III.6. se muestra el detalle de los genes amplificados para cada uno de los serotipos evaluados.

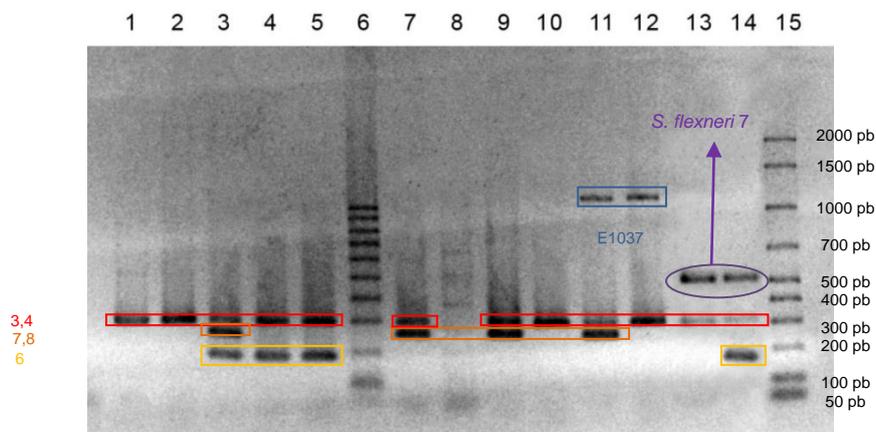


Figura III.14. Amplificaciones obtenidas en la PCR múltiple para factores de grupo y serotipo 7.

Calle 1: *S. flexneri* 1a. Calle 2: *S. flexneri* 2a. Calle 3: *S. flexneri* 3a. Calle 4: *S. flexneri* 3b. Calle 5: *S. flexneri* 4b. Calle 6: marcador de PM (rango 100 - 1000). Calle 7: *S. flexneri* 5b. Calle 8: *S. flexneri* 6. Calle 9: *S. flexneri* X. Calle 10: *S. flexneri* Y. Calle 11: *S. flexneri* Xv. Calle 12: *S. flexneri* Yv. Calle 13: *S. flexneri* 7a. Calle 14: *S. flexneri* 7b. Calle 15: marcador de PM (rango 50 - 2000).

III.4. Secuenciación de genes

Debido a las discrepancias observadas en cuanto a la amplificación del gen *gtrIV* entre los serotipos 4a y 4b, se procedió a la secuenciación del producto de amplificación de dicho gen en un aislamiento de *S. flexneri* 4a y en uno de *S. flexneri* 4b.

Se logró obtener una secuencia de 705 bases de longitud en el aislamiento de *S. flexneri* 4a y de 715 bases en el aislamiento de *S. flexneri* 4b.

En la figura III.15. puede observarse el alineamiento realizado con el programa *Bioedit*, de las secuencias obtenidas como producto de la secuenciación, así como la secuencia de los genes *gtrB* y *gtrIV* disponibles en el GenBank. La homología entre todas las secuencias es prácticamente total.

Cuando las secuencias obtenidas se cotejaron con la base de datos del GenBank, solo se encontró identidad con dos secuencias, una perteneciente al fago Sf4 y la otra a un aislamiento de *S. flexneri* 4a, esto puede apreciarse en la figura III.16.

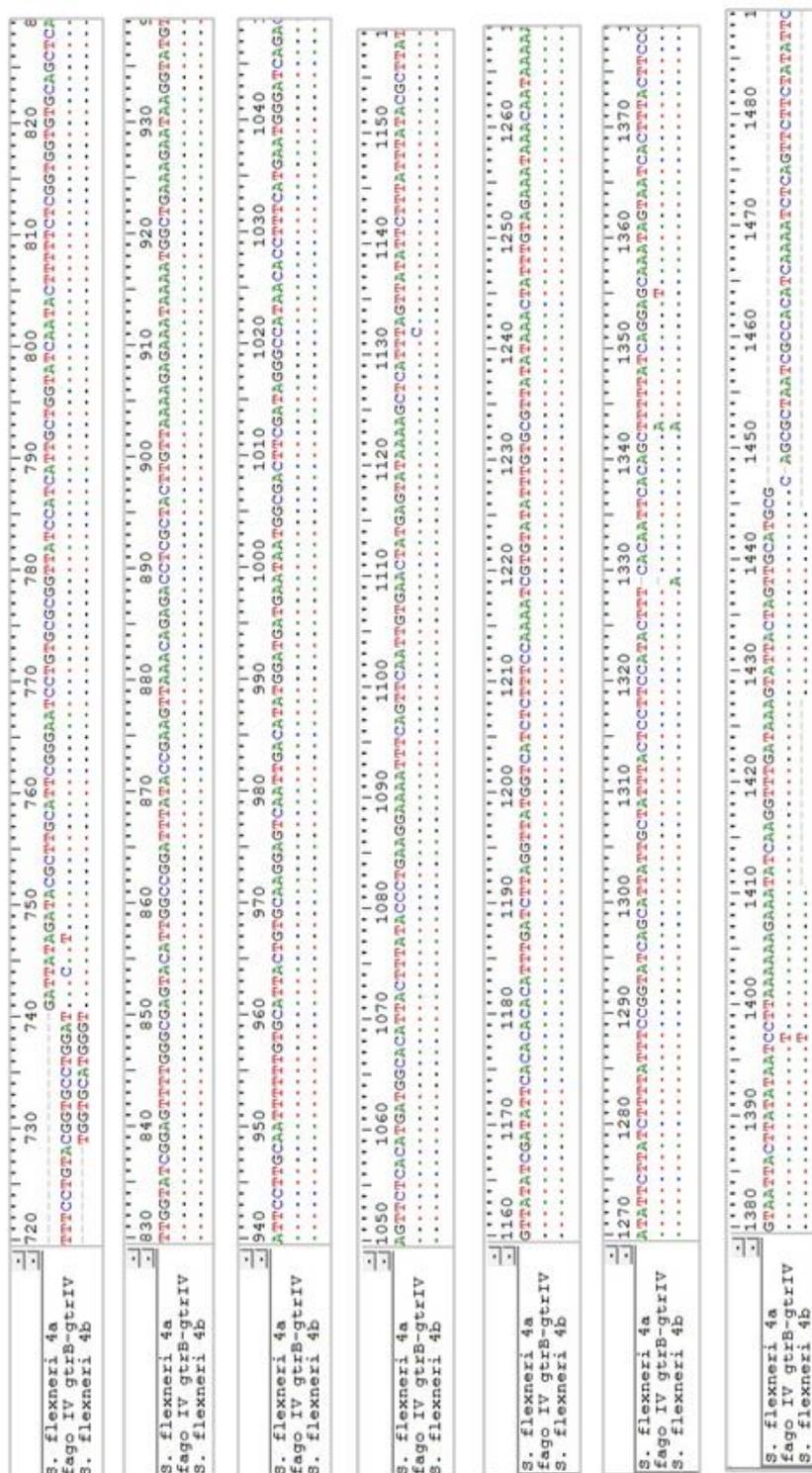


Figura III.15. Alineamiento de los serotipos 4a y 4b secuenciados frente a las secuencias del GenBank

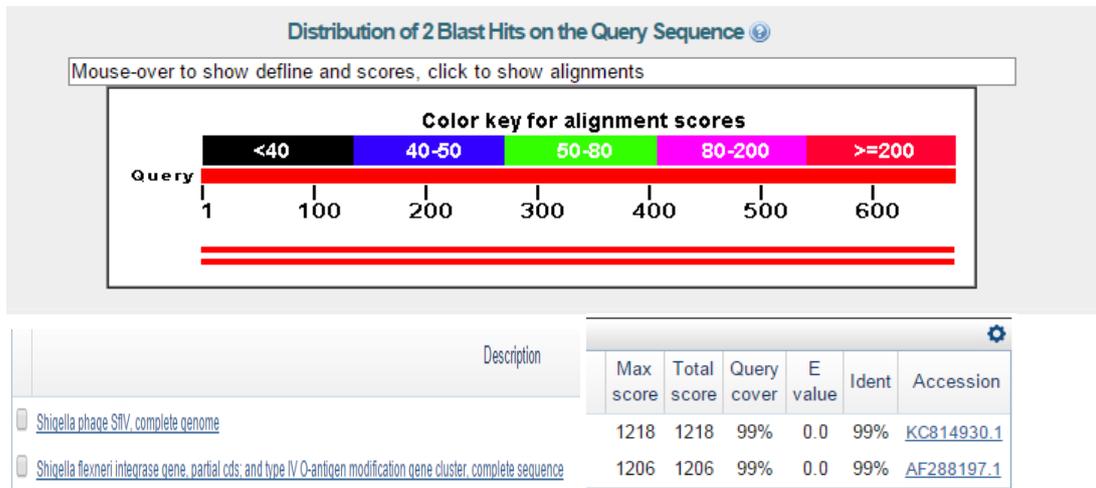


Figura III.16. Identidad de los serotipos secuenciados con las secuencias del GenBank

La necesidad particular de ajustar las condiciones para amplificar el serotipo *S. flexneri* 4b, sin registrar mayores problemas en la amplificación del serotipo *S. flexneri* 4a, no puede explicarse por diferencias en las regiones de hibridación de los iniciadores. En el iniciador SF solamente hay una base de diferencia con el aislamiento 4b secuenciado mientras que, al momento de diseñar el iniciador considerando la secuencia publicada, se contemplaron diferencias en tres bases (para ambas, 4a y 4b). En cuanto al iniciador SF4, no se observa diferencia alguna entre las zonas de hibridación de los aislamientos 4a y 4b, aunque es importante considerar que en *S. flexneri* 4b solo logramos secuenciar el 75% de la zona de hibridación. Estos resultados pueden observarse en la figura III.17.

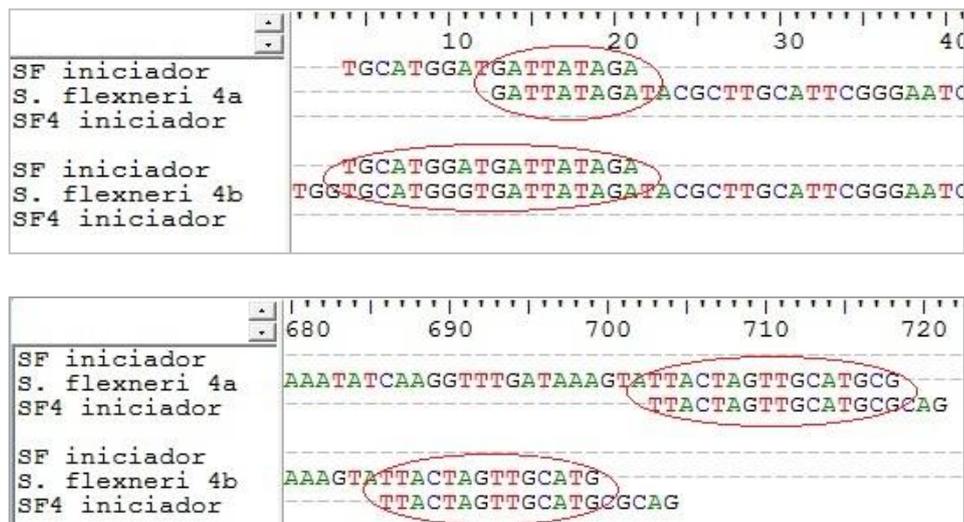


Figura III.17. Identidad en la zona de hibridación entre los serotipos secuenciados y los iniciadores específicos

III.5. Síntesis de la información mínima necesaria para la realización de las respectivas PCR múltiples

En las tablas III.7. y III.8. se detalla la información necesaria para realizar la PCR múltiple correspondiente e identificar los serotipos 1, 2, 4, 5, 6 y 7 o los antígenos de grupo 3,4 – 6 – 7,8 y E1037 respectivamente.

Tabla III.7. Datos de interés para la identificación de los serotipos mediante la PCR múltiple correspondiente.

Serotipo a identificar	Subserotipos que se espera amplifiquen	Gen o genes blanco	Iniciadores utilizados (concentración)	Tamaño de amplicón esperado
1	1a 1b 1d 7a 7b	<i>gtrB / gtrI</i>	SF (0,25 µM) - SF1 (0,125 µM)	382 pb
2	2a 2b	<i>gtrB / gtrII</i>	SF (0,25 µM) - SF2 (0,125 µM)	476 pb
4	4a 4av 4b	<i>gtrB / gtrIV</i>	SF (0,25 µM) - SF4 (0,25 µM)	720 pb
5	5a 5b	<i>gtrB / gtrV</i>	SF (0,25 µM) - SF5 (0,125 µM)	592 pb
6	NA	<i>wzx</i>	SF6 _{forw} (0,25 µM) - SF6 _{rev} (0,25 µM)	829 pb
7	7a 7b	<i>gtrIC</i>	gtrICF (0,25 µM) - gtrICR (0,25 µM)	518 pb

NA: no aplica

Tabla III.8. Datos de interés para la identificación de los antígenos de grupo mediante la PCR múltiple correspondiente.

Antígeno de grupo a identificar	Subserotipos que se espera amplifiquen	Gen o genes blanco	Iniciadores utilizados (concentración)	Tamaño de amplicón esperado
3,4	1a - 1b - 1d 2a - 2b 3a - 3b 4a - 4av - 4b 5a - 5b 7a - 7b X - Xv Y - Yv	<i>rfc</i>	SF1 (0,25 µM) - SFr (0,25 µM)	296 pb
6	1b 3a - 3b 4b 7b	<i>oac</i>	FG6l (0,25 µM) - FG6r (0,25 µM)	183 pb
7,8	1d 2b 3a 5b X - Xv	<i>gtrX</i>	FGXl (0,25 µM) - FGXr (0,25 µM)	251 pb
E1037	4av Xv Yv	<i>lpt-O</i>	lpt-OF (0,50 µM) - lpt-OR (0,50 µM)	1098 pb

III.6. Análisis comparativo entre los resultados de tipificación obtenidos con la serología convencional y con las PCR múltiples

Puede observarse en la tabla III.9. la correlación encontrada entre los resultados obtenidos mediante la tipificación en base a reacciones de aglutinación del antígeno en estudio (utilizando antisueros y/o anticuerpos) y los obtenidos mediante la amplificación del gen correspondiente.

Tabla III.9. Tabla comparativa entre los resultados de la aglutinación vs los de la amplificación.

Aglutinación positiva con:											<i>S. flexneri</i> serotipo	Amplificación positiva del gen:									
Antisuero policlonal										Anticuerpo monoclonal		<i>gtr I</i>	<i>gtr II</i>	<i>gtr IV</i>	<i>gtr V</i>	<i>rfc*</i>	<i>oac</i>	<i>gtr X</i>	<i>wzx SF6</i>	<i>gtr IC</i>	<i>lpt-O</i>
I	II	III	IV	V	VI	3,4	6	7,8	AA479	MASF 1c											
+						+					1a	+				+					
+						+	+				1b	+				+	+				
+						+		+			1d	+				+		+			
	+					+					2a		+			+					
	+					+					2b		+			+					
		+				+	+	+			3a					+	+	+			
		+				+	+				3b					+	+				
			+			+			+		4a			+		+					
			+			+			+		4av			+		+				+	
			+			+	+				4b			+		+					
				+		+					5a				+	+					
				+		+		+			5b				+	+					
					+						6								+		
						+				+	7a	+				+				+	
						+	+			+	7b	+				+				+	
						+		+			X					+					
						+		+	+		Xv					+				+	
						+					Y					+					
						+			+		Yv					+				+	

*rfc**: su amplificación guarda directa relación con la presencia del determinante antigénico 3,4.

+ Presencia de aglutinación o amplificación, según corresponda.

Las celdas remarcadas en rojo indican las discrepancias encontradas entre la detección del antígeno mediante serología y la amplificación del gen. Dichas diferencias no se deben a amplificaciones inespecíficas sino que corresponden a la presencia específica del gen detectado, mientras que el epítipo correspondiente no puede ser detectado con el antisuero específico.

En la figura III.18. puede observarse a modo de ejemplo, para los serotipos *S. flexneri* 3a, 5a, 5b, 6, Y e Yv, como la combinación de bandas de ambas PCR múltiples dan un patrón que inequívocamente se asocia con un serotipo específico.

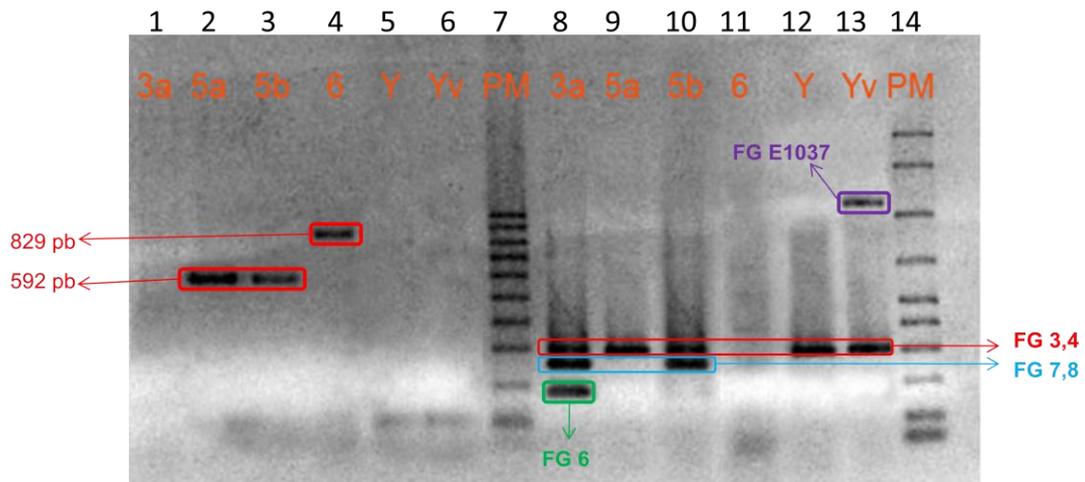


Figura III.18. Asignación del serotipo con el patrón de bandas obtenidas con ambas PCR múltiples.

Calles 1 a 6: amplificaciones realizadas con la PCR múltiple de serotipos.

Calle 7: marcador de PM (rango 100 - 1000).

Calles 8 a 13: amplificaciones realizadas con la PCR múltiple de factores de grupo.

Calle 14: marcador de PM (rango 50 - 2000).

IV. DISCUSIÓN

La shigelosis es una enfermedad aguda gastrointestinal. Se estima que en el mundo ocurren cada año más de 164 millones de infecciones por *Shigella*, sucediendo el 99% en países en vías de desarrollo y afectando principalmente a los niños menores de 5 años. La infección por esta enterobacteria implica, tanto en términos sanitarios como económicos, un grave problema de salud pública a nivel mundial. A raíz de esta situación, la OMS tiene entre sus objetivos prioritarios la formulación de una vacuna contra *S. flexneri*, teniendo en cuenta que ésta es la especie predominante en los países no desarrollados (Kotloff y col., 1999).

Si bien en Argentina las infecciones causadas por *Shigella* spp. no son de declaración obligatoria, el LNR de Enterobacterias ubica a este género como uno de los principales organismos bacterianos causantes de diarrea asociada a brotes. Al igual que en el resto de los países no desarrollados, *S. flexneri* es la especie ampliamente prevalente (aproximadamente el 70% de los casos).

Un aspecto clave en el combate de la enfermedad es la vigilancia epidemiológica que permite por ejemplo, conocer la diseminación microbiana en tiempo y espacio. Este aspecto es sumamente importante si se considera que la inmunidad conferida por *S. flexneri* es serotipo-específica (Noriega y col., 1999), razón por la cual el conocimiento de los serotipos circulantes es imprescindible al momento de considerar la formulación de una vacuna.

La vigilancia epidemiológica se realiza utilizando métodos de tipificación en los que se valora la utilidad de una determinada característica en cuanto a su estabilidad en la cepa y su diversidad inter-especie.

Dentro de los métodos fenotípicos más utilizados con los organismos del género *Shigella* se encuentra la serotipificación. Este método se basa en la aglutinación del organismo al ser enfrentado con un antisuero específico dirigido contra el antígeno O exhibido en su membrana externa. En base a dichas reacciones de aglutinación, *S. flexneri* se subdividió hasta el año 2009 en 13 serotipos diferentes. Pero a partir del año 1988 y con mayor frecuencia en los últimos cinco años, surgieron aislamientos de serotipos de *S. flexneri* no descriptos previamente, que no pudieron ser tipificados dentro del esquema vigente para la clasificación en serotipos.

Entonces, si bien la serotipificación tiene un gran aval en cuanto a su capacidad discriminatoria y se considera el método “*gold standard*”; como contrapartida, implica contar con un gran número de antisueros específicos y costosos y con cultivos que expresen adecuadamente su antígeno somático (cepas lisas). Además, el reconocimiento de nuevos serotipos evidenció las limitaciones en los antisueros comerciales disponibles para detectar la diversidad serológica de *S. flexneri*.

Con el objeto de contrarrestar las dificultades descritas para la serotipificación, se emprendió el desarrollo de métodos para lograr dicha clasificación a nivel molecular. Frente a lo antes expuesto, sería imprescindible que estos nuevos métodos guarden correlación con la serotipificación.

Al momento de iniciar el desarrollo de una PCR múltiple que permita obtener para los serotipos de *S. flexneri* resultados equiparables a los obtenidos con los antisueros, no existía ninguna publicación que abordara este tema.

Recién en el año 2009 se publicó un conjunto de PCR simples con las cuales se podía determinar el serotipo 6 de *S. flexneri*, pero no diferenciar al resto de los serotipos que generaban un mismo producto de amplificación debido a que se utilizó el gen cromosómico *wzx* como blanco (Li y col., 2009).

En nuestro enfoque metodológico, el blanco para la PCR son genes específicos de serotipo insertos en el cromosoma bacteriano a través de bacteriófagos.

En el año 2011 se publicó la primera PCR de tipo múltiple que permitió identificar los diferentes serotipos de *S. flexneri* (Sun y col., 2011). Esta PCR no incluyó al serotipo 6 y la estrategia en cuanto al diseño de iniciadores difería de la planteada por nosotros.

Mientras que la mencionada PCR utiliza un par de iniciadores para cada uno de los genes *gtr_{type}*, nuestro diseño consiste en utilizar, además de un iniciador específico en cada uno de los genes *gtr_{type}*, otro iniciador sobre el gen *gtrB* que es común y conservado entre los serotipos 1, 2, 4 y 5. De esta forma se simplifica considerablemente el número de iniciadores involucrados en la reacción, haciendo descender la probabilidad de que se produzcan amplificaciones no esperadas. Además, se incluyeron iniciadores para la identificación del serotipo 6, el cual ocupa en nuestro país el cuarto lugar en incidencia dentro de *S. flexneri*.

El desarrollo de una PCR múltiple para determinar los factores de grupo, fue planteada con el objeto de discriminar entre subserotipos, pero además se consideró imprescindible para poder diferenciar los serotipos 3, X e Y, ya que estos no pueden ser discriminados entre sí por no contar con ninguna modificación serotipo específica.

Los iniciadores se diseñaron con el objetivo de que los tamaños de los productos de amplificación estén incluidos dentro de un rango determinado (100 a 1000 pb) y considerando las recomendaciones para el diseño de iniciadores, así como la potencialidad de formar estructuras secundarias.

Los resultados obtenidos con la base de datos de la plataforma BLAST indicaron una completa identidad entre las secuencias de los iniciadores SFI y SFr y el gen *wzx* de los serotipos O13, O129 y O135 de *E. coli*, así como entre los iniciadores SF6forw y SF6rev y el gen *wzx* del serotipo O147 de *E.*

coli. Dichos resultados eran esperables debido a que los serotipos O13, O129 y O135 de *E. coli* tienen la misma cadena primaria de antígeno O que los serotipos de *S. flexneri* (con excepción del 6), más precisamente *E. coli* O129 y O135 tienen idéntica estructura de antígeno O que *S. flexneri* 5a y 4b respectivamente (Hygge Blakeman y col., 1998); por su parte, *E. coli* O147 tiene la misma cadena primaria de antígeno O que *S. flexneri* 6 (Perepelov y col., 2010).

Sin embargo, la identidad encontrada entre dichos iniciadores y serotipos de *E. coli* no interfiere con los resultados de la metodología porque los serotipos de *E. coli* implicados son infrecuentemente hallados y además no están descritos dentro del patogrupo EIEC, que es el único que bioquímicamente podría confundirse con *Shigella*.

En cuanto a las diferentes etapas para el ajuste de las PCR múltiples, es importante rescatar la diferencia en la temperatura de hibridación necesaria para el funcionamiento óptimo de un mismo par de iniciadores en la PCR simple y dentro de la PCR múltiple. También pudo apreciarse la importancia en la elección de la concentración de iniciadores y de los diferentes tiempos de hibridación a elegir, con el fin de minimizar la aparición de bandas de amplificación inespecíficas y obtener una intensidad apropiada de la banda deseada.

Luego de haber estandarizado las condiciones de ambas PCR, se logró la amplificación de los productos esperados en forma fácilmente identificable y con ausencia de productos de amplificación inespecíficos que provoquen confusión al momento de la visualización de las bandas y el análisis de los resultados.

La emergencia de nuevos serotipos en los últimos años generó la necesidad de poder incorporarlos a nuestra colección de cultivos para así realizar un control completo de nuestro sistema de PCR con todos los serotipos hasta ahora descritos. Así, se incorporaron a la PCR múltiple para la tipificación

molecular de los antígenos de grupo, los iniciadores descritos para la amplificación de los genes relacionados con el serotipo 7 y el antígeno de grupo E1037.

La estrategia de utilizar dos PCR múltiples simultáneas que se complementen posee dos ventajas. Por un lado, la fácil visualización e identificación de las bandas correspondientes a los productos de amplificación. Por otra parte debido a la imposibilidad, en cuanto a practicidad y costo, de incorporar controles positivos que representen a todos los serotipos (habría que usar al menos siete controles), la presencia de la banda correspondiente a la amplificación del factor de grupo 3,4 (exceptuando en el serotipo 6), nos permite al menos garantizar que no hubo inconvenientes en cuanto al proceso de extracción de ADN ni a las condiciones de ciclado.

Como se esperaba, la banda correspondiente a la amplificación del gen *gtrI* se observó tanto en el serotipo 7 como en el serotipo 1, ya que los aislamientos pertenecientes al serotipo 7 tienen los genes *gtrI* y *gtrIC*, ambos provenientes de bacteriófagos que glicosilan la cadena primaria del antígeno O.

Con respecto a la diferencia entre los serotipos 4a y 4b en la amplificación del gen *gtrIV* en la PCR múltiple, junto con la identidad observada entre ambas secuencias obtenidas, se pone en evidencia la importancia que tiene el ajuste de los diferentes parámetros intervinientes en este tipo de reacciones.

Otro de los objetivos principales que perseguía el trabajo también se ha logrado ya que, al comparar los resultados obtenidos con la serotipificación y la PCR múltiple, se pudo verificar que el sistema diseñado cumple con el requisito de la correlación entre ambas metodologías.

Con la PCR múltiple desarrollada para identificar los serotipos, puede reconocerse de forma inequívoca a los serotipos 2, 4, 5 y 6, siendo

necesaria la segunda PCR múltiple si se quiere conocer el subserotipo. Para definir si un aislamiento corresponde al serotipo 1 o al 7, así como para diferenciar los serotipos 3, X e Y, resulta imprescindible el uso conjunto de ambas PCR múltiples.

Las ventajas del método de tipificación molecular desarrollado son su rapidez y su bajo costo en comparación con el serológico utilizado actualmente, que por ejemplo, para la identificación del serotipo X requiere ensayar hasta 10 antisueros diferentes. Además, puede ser realizado en cualquier laboratorio de biología molecular, sin necesidad de equipamiento específico ni mantenimiento de ceparios de *Shigella*. Por lo tanto, consideramos de gran relevancia para el sistema de Salud Pública, que dicha metodología pueda ser utilizada en hospitales seleccionados como un primer paso dentro de la vigilancia epidemiológica de *S. flexneri*.

En el mes de mayo del año 2012, se realizó en Buenos Aires una reunión en la que participaron los máximos referentes en *Shigella* a nivel mundial (ver instituciones participantes en el anexo 2). Uno de los temas discutidos en dicha reunión fue la metodología a utilizar de ahora en más para la vigilancia epidemiológica de *S. flexneri*, debido a que en la actualidad se dispone de técnicas serológicas para la identificación de un determinante antigénico (antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales) y técnicas de biología molecular para la identificación de genes relacionados con la expresión de dichos determinantes. Lamentablemente no se pudo llegar a una definición, ya que si bien en general se consideraba que debía utilizarse una única metodología como referencia, no hubo unanimidad con respecto a cuál utilizar.

En mi opinión, no será posible la utilización de una única técnica, sino que ambas deberán complementarse.

Si dentro de las técnicas serológicas evaluamos la eficacia de los resultados obtenidos mediante el uso de reactivos monoclonales o policlonales, rápidamente salen a la luz las limitaciones de ambos.

En la actualidad no existen anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epitopes conformacionales de *Shigella*, con lo cual no puede determinarse el serotipo *S. flexneri* 3 (Carlin y col., 1986).

Por otro lado es imposible, en la producción de los antisueros policlonales, contemplar los determinantes antigénicos aún no descritos, pudiendo así obtenerse antisueros que en algún momento presenten reactividad cruzada con serotipos no descritos. Esto se evidenció frente a la emergencia del serotipo Xv, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos con antisueros comerciales, dichos aislamientos se identificaban como serotipo 4 (Ye y col., 2010).

En cuanto a las técnicas de biología molecular, una desventaja importante es la falta de una relación directa entre la detección del gen y su expresión, algo sustancialmente importante en cuanto a la epidemiología. Además, basándonos en la experiencia del serotipo 7, si no hubiera existido el anticuerpo monoclonal específico y se hubiera considerado la amplificación de los genes de los serotipos convencionales, *S. flexneri* 7 no hubiera sido reconocida como tal sino que hubiera sido tipificada como *S. flexneri* 1.

Por lo tanto, en base a lo expuesto, a la posibilidad de que se detecten nuevos epitopes y que, además de por la inserción de bacteriófagos, nuevos serotipos pueden generarse por ganancia de plásmidos, es que la identificación de serotipos a través de la detección de sus genes ha sido un gran avance que permite complementar a la serotipificación tradicional. Además esta tecnología puede adaptarse más fácilmente que la serología para ampliar la vigilancia epidemiológica de la enfermedad.

Para la inclusión de ambas metodologías, es imprescindible la implementación de un protocolo avalado a nivel internacional por los

principales centros de salud, con el objetivo de poder arribar en forma confiable al serotipo correspondiente y lograr una contribución global en lo que respecta a la vigilancia epidemiológica de *S. flexneri*.

V. CONCLUSIONES

1. Se logró el diseño de iniciadores para la amplificación específica de los serotipos 1, 2, 4 y 5 de *S. flexneri*, cumpliendo los parámetros establecidos en la estrategia de diseño.

2. Se logró el diseño de iniciadores para la amplificación específica de los antígenos de grupo 3,4 - 6 y 7,8.

3. Se estandarizó una PCR múltiple que permitirá ser utilizada para la vigilancia epidemiológica de los serotipos 1/7, 2, 4, 5 y 6 de *S. flexneri*.

4. Se estandarizó una segunda PCR múltiple que permitirá determinar la presencia de los genes correspondientes al antígeno de serotipo 7 y a los antígenos de grupo 3,4 - 6 - 7,8 y E1037.

5. Se verificó la selectividad y reproducibilidad de ambos sistemas.

6. Se determinó que el sistema diseñado ofrece una herramienta molecular que guarda correlación con el método convencional de serotipificación, ya que mediante el uso conjunto de ambas PCR múltiples, es posible identificar los siguientes 19 serotipos de *S. flexneri*: 1a - 1b - 1d - 2a - 2b - 3a - 3b - 4a - 4av - 4b - 5a - 5b - 6 - 7a - 7b - X - Xv - Y - Yv.

VI. TRABAJOS FUTUROS

- Elaborar un marcador de tamaño molecular que contenga los fragmentos amplificados para cada uno de los genes en estudio. Esto facilitaría la visualización e identificación de las bandas obtenidas como producto de la amplificación del aislamiento a estudiar.
- Diseñar iniciadores para el recientemente descrito factor grupal 9.
 - Evaluar su presencia en los diferentes cultivos de la colección del servicio Antígenos y Antisueros.
 - Comprobar la relación planteada entre presencia del factor grupal 9 y ausencia de reactividad con el antígeno de grupo 3,4.
 - Incluir la detección del factor grupal 9 dentro de la PCR múltiple para la determinación de antígenos de grupo.
- Validar el sistema de PCR múltiples para su potencial utilización en el diagnóstico epidemiológico.
- Evaluar la factibilidad de que el plásmido poseedor del gen *lpt-O* haya sido transferido a cepas de *E. coli*.
- Cooperar en el diseño de un protocolo de tipificación que incluya las técnicas serológicas y de biología molecular para permitir la correcta identificación de los serotipos de *S. flexneri*.

- Nomenclatura de *Shigella*.
 - Participar en la generación de un consenso internacional para la nomenclatura de *S. flexneri* considerando los nuevos determinantes antigénicos. Este objetivo fue propuesto en la reunión internacional de *Shigella* realizada en el año 2012.
 - Analizar la estabilidad en el tiempo del plásmido poseedor del gen *lpt-O* en los cultivos, con el fin de definir su inclusión o no para la asignación de un nuevo serotipo en la nomenclatura.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M., Allison, G., Verma, N. **2001**. Type IV O antigen modification genes in the genome of *Shigella flexneri* NCTC 8296. *Microbiology*, 147: 851-860.

Adhikari, P., Allison, G., Whittle, B., Verma, N. K. **1999**. Serotype 1a O-antigen modification: molecular characterization of the genes involved and their novel organization in the *Shigella flexneri* chromosome. *Journal of Bacteriology*, 181(15): 4711-4718.

Allison, G., Verma, N. **2000**. Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends Microbiol.*, 8(1): 17-23.

Allison, G., Angeles, D., Tran-Dinh, N., Verma, N. **2002**. Complete genomic sequence of SfV, a serotype-converting temperate bacteriophage of *Shigella flexneri*. *Journal of Bacteriology*, 184(7): 1974-1987.

Bopp, C., Wells, J. **2003**. Manual de Laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (EUA) y OMS.

Brenner, D.J. **1984**. Recommendations on Recent Proposals for the Classification of *Shigellae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(1): 87-88.

Carlin, N., Wehler, T., Lindberg, A. **1986**. *Shigella flexneri* O-antigen epitopes chemical and immunochemical analyses reveal that epitopes of type III and group 6 antigens are identical. *Infection and Immunity*, 53(1): 110-115.

Carlin, N., Rahman, M., Sack, D., Zaman, A., Kay, B., Lindberg, A. **1989**. Use of monoclonal antibodies to type *Shigella flexneri* in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(6): 1163-1166.

Casabuono, A., van der Ploeg, C., Rogé, A., Bruno, S., Couto, A. **2012**. Characterization of lipid A profiles from *Shigella flexneri* variant X lipopolysaccharide. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26: 2011–2020.

Clemens, J., Kotloff, K., Kay, B. Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhoea and dysenteric mortality. **1999**. Department of vaccines and biologicals - WHO.

http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/WHO_V&B_99.26.pdf.

Coimbra, R. S., Grimont, F., Grimont, P. A. D. Identification of *Shigella* serotypes by restriction of amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP) **1999**. *Res. Microbiol.*, 150: 543-553.

Edwards P, Ewing W. **1986**. Identification of enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Publishers;. 135-172.

Dutta, S., Chatterjee, A., Dutta, P., Rajendran, K., Roy, S., Pramanik, K., Bhattacharya S. **2001**. 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 diarrhoeae in Calcutta, India. *J. Med. Microbiol.*, 50: 667-674.

El-Gendy, A., El-Ghorab, N., Lane, E., Elyazeed, R., Carli, N., Mytri, M., Kay, B., Savarino, S., Peruski, L. **1999**. Identification of *Shigella flexneri* subserotype 1c in rural Egypt. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3): 873-874.

Faruque, S., Haider, K., Monzur Rahman, M., Abdul Alim, A., Shafi Ahmad, Q., John Albert, M., Bradley Sack, R. **1992**. Differentiation of *Shigella flexneri*

strains by rRNA gene restriction patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(11): 2996-2999.

Foster, R., Carlin, N., Majcher, M., Tabor, H., Ng, L., Widmalm, G. **2011**. Structural elucidation of the O-antigen of the *Shigella flexneri* provisional serotype 88-893: structural and serological similarities with *S. flexneri* provisional serotype Y394 (1c). *Carbohydrate Research*, 346: 872–876.

Guan, S., Bastin, D., Verma, N. **1999**. Functional analysis of the O antigen glycosylation gene cluster of *Shigella flexneri* bacteriophage SfX. *Microbiology*, 145: 1263-1273.

Hale, T. Genetic basis in virulence in *Shigella* species. **1991**. *Microbiological reviews*, 55(2): 206-224.

Hall, T. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **1999**. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

Hygge Blakeman, K., Weintraub, A., Widmalm, G. **1998**. Structural determination of the O-antigenic polysaccharide from the enterotoxigenic *Escherichia coli* O147. *Eur. J. Biochem.*, 251: 534-537.

Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., Vogt, P. **1997**. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23: 504-511.

Johnston, J., Johnston, R., Simmons, D. **1967**. The immunochemistry of *Shigella flexneri* O-antigens. *Biochem. J.*, 105: 79-87.

Knirel, Y., Lan, R., Senchenkova, S., Wang, J., Shashkov, A., Wang, Y., Perepelov, A., Xiong, Y., Xu, J., Sun, Q. **2013**. O-antigen structure of *Shigella flexneri* serotype Yv and effect of the *lpt-O* gene variation on

phosphoethanolamine modification of *S. flexneri* O-antigens. *Glycobiology*, 23(4): 475-485.

Korres, H., Mavris, M., Morona, R., Manning, P. A., Verma, N. **2005**. Topological analysis of GtrA and GtrB proteins encoded by the serotype-converting cassette of *Shigella flexneri*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328: 1252-1260.

Kotloff, K.L., Winickoff, J.P., Ivanoff, B., Clemens, J.D., Swerdlow, D.L., Sansonetti, P.J., Adak, G.K., Levine, M.M. **1999**. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(8): 651-666.

Li, Y., Cao, B., Liu, B., Liu, D., Gao, Q., Peng, X., Wu, J., Bastin, D., Feng, L., Wang, L. **2009**. Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of *Shigella*. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 69-81.

Lindberg, A., Wollin, R., Gemski, P., Wohlhieter, J. **1978**. Interaction between bacteriophage Sf6 and *Shigella flexneri*. *Journal of virology*, 27(1): 38-44.

Litwin, C., Store, A., Chipowsky, S., Ryan, K. **1991**. Molecular epidemiology of *Shigella* infections: plasmid profiles, serotype correlation and restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(1): 104-108.

Liu, B., Knirel, Y., Feng, L., Perepelov, A., Senchenkova, S., Wang, Q., Reeves, P., Wang, L. **2008**. Structure and genetics of *Shigella* O antigens. *FEMS Microbiology Rev.*, 32: 627-653.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. **1998**. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8ª edición. Prentice-Hall. Madrid

Mavris, M., Manning, P., Morona, R. **1997**. Mechanism of bacteriophage SfII-mediated serotype conversion in *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, 26(5): 939-950.

Nie, H., Yang, F., Zhang, X., Yang, J., Chen L., Wang, J., Xiong, Z., Peng, J., Sun, L., Dong, J., Xue, Y., Xu, X., Chen, S., Yao, Z., Shen, Y., and Jin, Q. **2006**. Complete genome sequence of *Shigella flexneri* 5b and comparison with *Shigella flexneri* 2a. BMC Genomics, 7 (173).

Niyogi, S. **2005**. Shigellosis. The journal of microbiology, 43(2): 133-143.

Noriega, F., Liao, F., Maneval, D., Ren, S., Formal, S., Levine, M. **1999**. Strategy for cross-protection among *Shigella flexneri* serotypes. Infection and Immunity, 67(2): 782-788.

Perepelov, A., Shevelev, S., Liu, B., Senchenkova, S., Shashkov, A., Feng, L., Knirel, Y., Wang, L. **2010**. Structures of the O-antigens of *Escherichia coli* O13, O129 and O135 related to the O-antigens of *Shigella flexneri*. Carbohydr. Res., 345(11): 1594-1599.

Perepelov, A., L'vov, V., Liu, B., Senchenkova, S., Shekht, M., Shashkov, A., Feng, L., Aparin, P., Wang, L., Knirel, Y. **2009**. A new ethanolamine phosphate-containing variant of the O-antigen of *Shigella flexneri* type 4a. Carbohydrate Research, 344(12): 1588-1591.

Perepelov, A., L'vov, V., Liu, B., Senchenkova, S., Shekht, M., Shashkov, A., Feng, L., Aparin, P., Wang, L., Knirel, Y. **2009**. A similarity in the O-acetylation pattern of the O-antigens of *Shigella flexneri* types 1 a, 1b, and 2a. Carbohydrate Research, 344(5): 687-692.

Sansonetti, P. J. Microbes and Microbial Toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular patogénesis. **2001**. Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol., 280: 319-323.

Schnaitman, C., Klena, J. **1993**. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. Microbiological reviews, 57(3): 655-682.

Shashkov, A., Senchenkova, S., Sun, Q., Lan, R., Wang, J., Perepelov, A., Knirel, Y., Xu, J. **2013**. Structure of the O-antigen of a novel *Shigella flexneri* serotype 1d (I: 7,8). *Carbohydrate Research*, 373: 93-96.

Simmons, D. A. R. **1971**. Immunochemistry of *Shigella flexneri* O-antigens: a study of structural and genetic aspects of the biosynthesis of cell-surface antigens. *Bacteriological Reviews*, 35(2): 117-148.

Stagg, R., Tang, S., Carlin, N., Talukder, K., Cam, P., Verma, N. **2009**. A novel glucosyltransferase involved in O-antigen modification of *Shigella flexneri* serotype 1c. *Journal of Bacteriology*, 191(21): 6612-6617.

Sun, Q., Knirel, Y., Lan, R., Wang, J., Senchenkova, S., Jin, D., Shashkov, A., Xia, S., Perepelov, A., Chen, Q., Wang, Y., Wang, H., Xu, J. **2012**. A novel plasmid-encoded serotype conversion mechanism through addition of phosphoethanolamine to the O-antigen of *Shigella flexneri*. *Plos One*, 7 (9).

Sun, Q., Lan, R., Wang, Y., Zhao, A., Zhang, S., Wang, J., Wang, Y., Xia, S., Jin, D., Cui, Z., Zhao, H., Li, Z., Ye, C., Zhang, S., Jing, H., Xu, J. **2011**. Development of a multiplex PCR assay targeting O-antigen modification genes for molecular serotyping of *Shigella flexneri*. *J. Clin. Microbiol.*, 49(11): 3766-3770.

Talukder, K., Dutta, D., Safa, M., Ansaruzzaman, M., Hassan, F., Alam, K., Islam, K., Carlin, N., Nair, G., Sack, D. **2001**. Altering trends in the dominance of *Shigella flexneri* serotypes and emergence of serologically atypical *S. flexneri* strains in Dhaka, Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiol.*, 39: 3757-3759.

Talukder, K., Islam, M., Dutta, D., Hassan, F., Safa, A., Nair, G., Sack, D. **2002**. Phenotypic and genotypic characterization of serologically atypical strains of *Shigella flexneri* type 4 isolated in Dhaka, Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiol.*, 40: 2490-2497.

- Torres, Alfredo G. Current aspects of *Shigella* patogénesis. **2004**. Revista Latinoamericana de Microbiología, 46(3): 89-97.
- van der Ploeg, C., Viñas, M., Terragno, R., Bruno, S., Binsztein, N. **2010**. Laboratory Protocol: "Serotyping of *Shigella* spp." WHO Global Foodborne Infections Network.
(http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/protocols/gfn_shigellaserotypification-final-29-06-10.pdf)
- van der Ploeg, C., Rogé, A., Bordagorria, X., de Urquiza, M., Viñas, M., Pichel, M., Bruno, S. **2015**. AA479 antiserum: new reagent for the serotype characterization of atypical variants of *Shigella flexneri*. Rev. Argent. Microbiol., 47: 36-40.
- Vílchez, G., Alonso, G. **2009**. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 29: 6-12.
- Villalobo, E., Torres, A. **1998**. PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise. Applied and environmental microbiology, 64(4): 1242-1245.
- von Seidlein, L., Kim, D., Ali, M., Lee H, Wang, X., Thiem, Vu., Canh, D., Chaicumpa, W., Agtini, M., Hossain A., Bhutta, Z., Mason, C., Sethabutr O., Talukder, K., Nair, G., Deen, J., Kotloff, K., Clemens, J. **2006**. A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. PLOS medicine, 3(9): 1556-1569.
- Wang, J., Knirel, Y., Lan, R., Senchenkova, S., Luo, X., Perepelov, A., Wang, Y., Shashkov, A., Xu, J., Sun, Q. **2014**. Identification of an *O*-acyltransferase gene (*oacB*) that mediates 3- and 4-*O*-acetylation of rhamnose III in *Shigella flexneri* O antigens. Journal of Bacteriology, 196(8): 1525-1531.

Wheler, T. y Carlin, N. **1988**. Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharide from a new provisional serotype of *Shigella flexneri*. Eur. J. Biochem., 176: 471-476.

Ye, C., Lan, R., Xia, S., Zhang, J., Sun, Q., Zhang, S., Jing, H., Wang, L., Li, Z., Zhou, Z., Zhao, A., Cui, Z., Cao, J., Jin, D., Huang, L., Wang, Y., Luo, X., Bai, X., Wang, Y., Wang, P., Xu, Q., Xu, J. **2010**. Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*. Journal of Clinical Microbiology, 48: 419-426.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

Red Nacional de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria

Coordinación: Dra. Marta Rivas (Servicio Fisiopatogenia - INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán")

Referentes Nacionales: Dra. Susana Bruno (Servicio Antígenos y Antisueros, INPB-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán") y Dra. Mariana Pichel (Servicio Enterobacterias - INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán")

Buenos Aires (prov): **Htal. San Juan de Dios (RJ) – Htal. Penna (RT) – Htal. Piñeiro (RT) – Htal. Petrona Paroissien (RT)** - Htal. Eva Perón; Htal. de Agudos Sor María Ludovica; Instituto Nacional de Epidemiología “Dr. Juan Jara”; Htal. Nacional “Prof. Dr. Alejandro Posadas”; Htal. Evita de Lanús, Htal. Belgrano, Htal. Blas Dubarry, Htal. Oñativía, Htal. Posadas (Guernica), Htal. Cecilia Grieson, Htal. T. Calcutta, Htal. L.Melendez, Htal. San Pedro, Htal. Orellana, Htal. Alejandro Korn, Htal. Municipal San Roque, Htal. Vte Lopez y Planes, Htal. Interzonal de Agudos Güemes, Htal. Illia, Htal. Ramón Carrillo.

Catamarca: Htal. de Niños de Catamarca; Htal. Interzonal San Juan Bautista.

Chaco: **Dirección de Laboratorios-MSP Chaco (RJ) – Laboratorio Central de Salud Pública (RT)** - Htal Perrando; Htal de Castelli; Htal 4 de junio.

Chubut: **Dirección control de Patologías Prevalentes (RJ) – Laboratorio de Patologías Prevalentes (RT)** - Htal. Regional de Comodoro Rivadavia; Htal. Rural Cholila, Htal. Rural Corcovado, Htal. Rural Dolavon; Htal. Rural El Hoyo, Htal. Rural Gaiman Jhon Evans, Htal. Rural José de San Martín, Htal. Rural Lago Puelo, Htal. Rural Río Mayor, Htal. Rural Río Senguer, Htal.

Rural Sarmiento, Htal. Rural Tecka, Htal. Rural Trevelin, Htal. Subzonal Dr. Andres Isola, Htal. Subzonal El Maiten, Htal. Subzonal Santa Teresita, Htal. Zonal Esquel, Laboratorio de la Dirección Pcial. de PP y Epidemiología, Laboratorio de la Dirección Pcial de Salud Ambiental (Bromatología).

Ciudad de Buenos Aires: **Htal. Durand (RJ) - Htal. de Infecciosas “Francisco Javier Muñiz” (RT) - Htal. Fernández (RT)** – Htal. Borda, Htal. Elizalde Casa Cuna, Htal. Santa Lucia, Htal. E. Tornú, Htal. Lagleyze, Htal. Zubizarreta, Htal. Argerich, Htal. Maria Curie, Htal. Gutierrez, Htal. Alvarez, Htal. de Quemados, Htal. Ramos Mejía, Htal. Pirovano, Htal. Ferrer, Htal. Santojani, Htal. Velez Sarsfield, Htal. Moyano, Htal. Piñero, Htal. Udaondo, Htal. Penna, Htal. De Rehabilitación Manuel Rocca.

Córdoba: **Laboratorio Central (RJ) - Htal. Guillermo Rawson (RT)** - Htal. de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba.

Corrientes: **Departamento de Bioquímica Ministerio de Salud Pública (RJ) - Hospital Pediátrico Juan Pablo II (RT)** – Facultad de Medicina.

Entre Ríos: **Lab Provincial de Epidemiología (RJ) – Htal. San Martín (RT) – Htal. Centenario (RT)** - Facultad de Bromatología (UNER).

Formosa: **Lab. Vig. Epidemiológica Htal. La Madre y el Niño (RJ)** - Min. Desarrollo Humano-Lab. Vigilancia Epidemiológica (RT) - Htal. Central de Formosa; Htal. de la Madre y el Niño, Htal. Estanislao del Campo, Htal. Pozo del Tigre, Htal. Posta C. Salazar, Htal. Ibarreña, Htal. Laguna Yerma, Htal. El Potrillo, Htal. Comandante Fontana, Htal. Belgrano, Htal. Laguna Blanca, Htal. General Güemez, Htal. El Colorado, Htal. Villafañe, Htal. Pirané, Htal. Palo Santo, Htal. Misión Laishi, Centro de Salud Eva Perón, Centro de Salud Pablo Bargas, Centro de Salud 2 de Abril, Centro de Salud Antenor Gauna.

Jujuy: **Dpto. Bioquím. Min. de Bienestar Social (RJ)** - Htal. Pablo Soria, Htal. de Niños “Dr. Héctor Quintana”, Htal. Nuestra Señora del Carmen, Centro Sanitario Dr. Carlos Alvarado, Htal. Nuestra Señora del Rosario, Htal.

Dr. Jorge Uro, Laboratorio Central, Htal. Nuestra Señora del Pilar, Htal. Dr. Arturo Zabala, Htal. Nuestra Señora del Valle, Htal. San Miguel, Htal. San Roque, Htal. Dr. Salvador Mazza, Htal. Pres. Escolástico Zegada, Htal. General Belgrano, Htal. Dr. Oscar Orias, Htal. Ing. C. Snopek, Htal. Ntra. Sra. de la Buena Esperanza, Htal. Wenceslao Gallardo, Htal. Guillermo C. Paterson, Htal. Calilegua, Htal. Maimara, Htal. Susques, Htal. Monterrico, Htal. La Mendieta, Puesto de Salud Caimancito.

La Pampa: **Coordinación Ejecutiva de Epidemiología (RJ) - Htal. Lucio Molas (RT)** - Establecimiento Asistencial Gobernador Centeno, Laboratorio Central de Bromatología.

La Rioja: **Redes de Laboratorio (RJ) - Htal. Regional "Dr. Enrique Vera Barros" (RT)** – Htal. Eduardo Neira, Htal. Luis Agote, Htal. Pasteur, Htal. San Nicolás.

Mendoza: **Dpto. Epidemiol. Coord. Red de Laboratorios de la Provincia (RJ) - Htal. Pediátrico "Dr. Humberto Notti" (RT)** – Centro de Salud Guaymallén, Centro de Salud Las Heras, Centro de Salud Godoy Cruz, Htal. Regional Alvear, Htal. Central, Htal. El Carmen, Htal. Lagomaggiore, Htal. Lencinas, Htal. Malargue, Htal. Paroisiens, Htal. Perrupato, Htal. Scaravelli, Htal. Schestakow, Htal. Sicoli, Htal. Pereyra, Htal. Saporiti, Htal. Eva Perón, Htal. Gral. Las Heras, Htal. Gaiyac, Htal. Tagarelli, Htal. Ramón Carrillo, Htal. Raffo, Htal. Central de Mendoza.

Misiones: **Dir. de Bioquímica Min. Salud Pública (RJ) - Htal. Provincial de Pediatría (RT)** -. Htal. "Dr. R. Madariaga", Htal. SAMIC Oberá, Htal. SAMIC El Dorado, Htal. SAMIC Lenadro N. Alem, Htal. De Area Jardín América, Htal. SAMIC de Iguazú, Htal. De Fatima, Htal. Baliña, Htal. De Montecarlo, Lab. De Bromatología de Salud Pública.

Neuquén: **Subsecretaría de Salud. Dir de Redes de Laboratorios (RJ) - Htal. Heller (RT)** -; Htal. Provincial de Neuquén "Dr. Castro Rendón", Htal.

Andacollo, Htal. Loncopue, Htal. Las Lajas, Htal. Picun Leufu, Htal. Senillosa, Htal. Chocon, Htal. Buta Ranquil, Htal. Alumine, Htal. Villa La Angostura, Htal. Piedra del Aguila, Htal. Rincón de los Sauces, Htal. Chanar, Htal. Chos Malal, Htal. Zapala, Htal. San Martín de los Andes, Htal. Junin de los Andes, Htal. Cutralcó, Htal. Centenario, Htal. Plottier, Htal. Bouquet Roldán.

Río Negro: Dirección de Epidemiología (RJ) - Htal. Zonal de Bariloche (RT) - Htal. Area Cipolletti., Htal. A. Zatti, Htal. Fco. Lopez Lima, Htal. Dr. P. Mognillansky, Htal. R. Carrillo, Htal. Allen, Htal. Catriel, Htal. Chimpay, Htal. Choele Choel, Htal. Cinco Saltos, Htal. Comallo, Htal. Coronel Belisle, Htal. El Bolsón, Htal. Gral. Conesa, Htal. Ing. Huergo, Htal. Ing. Jacobacci, Htal. Lamarque, Htal. Las Grutas, Htal. Los Menucos, Htal. Luis Beltrán, Htal. Maquinchao, Htal. Río Colorado, Htal. San Antonio Oeste, Htal. Sierra Colorada, Htal. Sierra Grande, Htal. Valcheta, Htal. Villa Regina. **Salta:** Programa de Bioquímica. M.S.P (RJ) - Htal. Materno Infantil de Salta, Htal. San Vicente de Paul, Htal. Joaquín Castellanos, Htal. J. D. Perón, Htal. Del Milagro, Htal. Nuestra Señora del Rosario, Htal. San Bernardo, Htal. Gral. Mosconi, Htal. San Roque, Htal. Dr. Elías Anna, Htal. Cnel. Juan Sola, Htal. Ntra. Sra. Del Carmen, Htal. Melchora F. De Cornejo, Htal. Dr. O. Costas, Htal. Dr. A. Hoygaard, Htal. San Rafael, Htal. Dr. Joaquín Corbalán, Htal. Sta. Teresita, Centro de Salud Villa Primavera, Centro de Salud El Manjon, Centro de Salud Villa Lavalle, Centro de Salud Barrio Castañares, Centro Barrio Provipo, Centro de Salud Barrio Solidaridad, Htal. Dr. Fco. Herrera.

San Juan: Secret. De Estado de Salud Pública. Of de Div Bioquímica (RJ) - Htal. Guillermo Rawson; Htal. Marcial Quiroga, C. S. Municip. Santa Lucia, C.S. Comandante Cabot, C. S. Dr. Alfonso Barassi, C. S. Dr. Ramon Carrillo, C. S. Ullum, Htal Dr. Aldo Cantón, Hta. Barreal, Htal Dr. Federico Cantón, C.I.C Pocito, C. S. Mons. Italo Distefano, Htal Dr. Ventura Lloveras, Htal Dr. Alejandro Albarracin, C. S. Santa Rosa, C. S. Dra. Stella Molina, Htal. San Roque, Htal. Dr. Rizo Esparza, Htal Dr. Tomas Peron, C. S. Mons

Baez Laspiur, C. S Rene Favaloro, Htal. Dr. Cesar Aguilar, Htal. Dr. Jose Giordano.

San Luis: Laboratorio de Salud Pública (RJ) – Complejo Sanitario San Luis (RT) – Lab .Hospital Juarez Rocha, Lab Hospital del Sur, Lab. Hospital del Oeste, Lab. Hospital Juana Koslay, Lab. Hospital de la Punta, Lab. Hospital Concarán, Hosp Braulio Moyano, Lab. Central Malvinas Argentinas, Lab. Hospital J. D. Perón, Lab. Hospital Cerro de la Cruz, Lab Bromatología.

Santa Cruz: Htal. Regional de Río Gallegos (RJ) – Htal. Gdor. Gregores, Htal. Pto. Santa Cruz, Htal. Cdte. Luis Piedrabuena II, Htal. 28 de Noviembre, Htal. Pto. Deseado, Htal. Pico Truncado, Htal. Perito Moreno, Htal. Los Antiguos, Htal. Las heras, Htal. Rio Turbio, Htal. El Calafate, Htal. Pto. San Julián, Htal. Caleta Olivia.

Santa Fe: Laboratorio Central de Santa Fe (RJ) - Htal. de Niños "V. J. Vilela"; Htal. de Niños "Dr. O. Allasia"; Htal. Español de Rosario; Htal. Cullen; Htal Centenario, Htal. Frere, SAMCO V.Constitución, SAMCO El Trébol, SAMCO Casilda, SAMCO Ceres, SAMCO Sa Pereyra, SAMCO V:Tuerto, Hosp.C.Alvarez, Hosp.M.y López, Hosp.Sayago, Hosp.Reconquista, Hosp.Carrasco, Hosp.Alberdi, Hosp.Protomédico, Hosp.R.Saenz Peña, Hosp.Niños Zona Norte, Hosp.Iturraspe, Hosp.Eva Perón, Laboratorio de Bromatología.

Santiago del Estero: Hosp. Independencia, (RJ) – Htal. De Niños Francisco Viano (RT) - Htal. Regional "Dr. Ramón Carrillo", Htal de Niños "Eva Perón".

Tierra Del Fuego: Htal. Regional de Río Grande; Htal. Regional de Ushuaia.

Tucumán: Div. Bioquímica SIPROSA Tucumán (RJ) - Htal. Del Niño Jesús (RT) – Htal. Centro de Salud, Inst. Maternidad Ntra Sra de las Mercedes, Htal. Pte. Nicolás Avellaneda, Htal. Ángel C. Padilla, Htal.

Regional de Concepción, Htal. Gral Lamadrid de Monteros, Dirección de Bromatología de la Pcia Tucumán.

Los laboratorios periféricos articulan su funcionamiento en la Red con los correspondientes Referentes Temáticos (RT) y Referentes Jurisdiccionales (RJ).

ANEXO 2

Instituciones participantes en la reunión organizada sobre la temática de *Shigella* (mayo del 2012. Buenos Aires, Argentina).

Argentina: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - Instituto Nacional de Producción de Biológicos.

Australia: The Australian National University.

Bangladesh: International Center for Diarrhoeal Disease Research.

China: China Office US CDC, Centre for Health Protection.

Dinamarca: Statens Serum Institute.

EE.UU: Centers for Disease Control and Prevention - Center for Vaccine Development - University of Texas - Walter Reed Army Institute of Research - National Institutes of Health - Program for Appropriate Technology in Health.

Francia: Institut Pasteur.

India: National Institute of Cholera and Enteric Diseases.

Inglaterra: Wellcome Trust Sanger Institute - Colindale Health Protection Agency - Imperial College.

Israel: Tel Aviv University.

Organización Panamericana de la Salud

Sudafrica: National Institute for Communicable Diseases.

Suecia: Etvax AB.

World Health Organization