

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS E
INSTITUTOS DE SALUD “DR. CARLOS G. MALBRÁN”

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

Tesis presentada para optar por el título de Magíster en Microbiología Molecular

***Shigella flexneri*: subtipos genéticos
circulantes en Argentina y caracterización
molecular de aislamientos “Atípicos”.**

Silvina Patricia Brengi

Directora: *Dra. Mariana Pichel*

*Servicio Enterobacterias, Departamento de Bacteriología,
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”*

2017

Agradecimientos

Quiero agradecer...

...a mis compañeras y amigas de “Labo”, por el apoyo y comprensión durante la realización y escritura de este trabajo, sin uds., no hubiera podido. Por muchos momentos compartidos y por compartir entre “*Shigellitas*”, “*Salmonellitas*” y cosas ricas. Andre, Ani, Dani, Marce, Miri, Jose, Sabri, M. Rosa y M. Inés. Gracias chicas...

...a mi directora, Mariana, por llevar a cabo su rol con tanto compromiso y dedicación, aportando su experiencia, ideas, conocimientos y entusiasmo a lo largo de todo el trabajo. Aprendí y sigo aprendiendo mucho de vos. Gracias...

...a Roberto por permitirme realizar la pasantía en su laboratorio, y por recibirme con tanto cariño en su hogar junto a Sandra, sus hijos y Tango, durante mi estadía en Canadá.

...a mis colegas pero mucho más que eso, mis amigas, Pato y Yani, por las juntadas, los alfajores Jorgito, por hacer todo más divertido y también por el constante asesoramiento en diversos temas...las quiero amiguis.

...a los Brengi's:

...mis papás Oscar y Elena, por la ayuda durante mis largos años de facultad, y en estos últimos meses. Ahora les puedo contestar con algún fundamento lo que siempre me preguntan: “¿Para que te mandamos a la universidad?”... gracias y los amo.

...mis hermanos, Marina y Diego, cada uno con su vida y profesiones tan distintas, pero siempre unidos a pesar de las ocupaciones y la distancia, como diría Mari... Love you “Bros”.

...y a Mía y Martín, mi propia familia, por llegar a mi vida, los amo.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
<i>Shigella</i>	5
Características bioquímicas y serológicas generales del género <i>Shigella</i>	5
Epidemiología.....	6
Shigelosis: manifestaciones clínicas y tratamiento.....	7
Resistencia a antimicrobianos.....	7
Vacunas.....	8
Patogenia.....	9
Estructura antigénica de serotipos y subserotipos en <i>Shigella flexneri</i>	11
Bases genéticas de la seroconversión en <i>Shigella flexneri</i>	14
Serotipificación por aglutinación con antisueros específicos en <i>Shigella flexneri</i>	14
Serotipificación molecular.....	15
<i>S. flexneri</i> : Nuevas variantes y serotipos emergentes en los últimos años en el mundo.....	16
Epidemiología molecular y Subtipificación.....	19
<i>Shigella en Argentina</i>	22
Vigilancia epidemiológica y prevalencia de <i>Shigella</i> spp. en Argentina...	22
Emergencia de aislamientos de <i>S. flexneri</i> “Atípicos” en Argentina – Resultados preliminares.....	24
Justificación del proyecto. Impacto e implicancias en las actividades y programas del LNR en Salud Pública.....	28

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Parte 1 - Estudio de la diversidad genética y diseminación témporo-espacial de aislamientos de <i>S. flexneri</i> incorporados a la Base de datos de perfiles genéticos de PFGE.....	32
1.1 Selección de aislamientos de <i>S. flexneri</i> para su incorporación a la base de datos de perfiles genéticos circulantes en Argentina.....	32
1.2 Subtipificación molecular por PFGE.....	34
1.3 Base de datos y normalización de los geles contra un perfil estándar.....	36
1.4 Ingreso de los perfiles genéticos y análisis de relación genética.....	38
Parte 2	
Caracterización molecular de una selección de aislamientos atípicos de <i>S. flexneri</i> .	39
2.1 Comparación de genomas por PFGE y Mapeo de Genoma Completo (“Whole Genome Mapping”).....	39
2.2 Caracterización de aislamientos “Atípicos” por serotipificación molecular (PCR múltiple).....	45
2.3 Relación genética de aislamientos “Atípicos” por PFGE.....	50
RESULTADOS.....	51
Parte 1	
Estudio de la diversidad genética y diseminación témporo-espacial de aislamientos de <i>S. flexneri</i> incorporados a la Base de datos de perfiles genéticos de PFGE.....	52
1.1 Diversidad geográfica y temporal de los aislamientos incorporados a la BDN.....	52
1.2 Diversidad genética y ramas principales determinadas en el dendograma total.....	53

1.3 Análisis de diversidad genética y distribución témporo-espacial de los subtipos circulantes identificado por PFGE, por serotipo.....	58
1.3.1 <i>Shigella flexneri</i> serotipo 2.....	58
1.3.2 <i>Shigella flexneri</i> serotipo 1.....	60
1.3.3 <i>Shigella flexneri</i> serotipo 3.....	61
1.3.4 <i>Shigella flexneri</i> serotipo 6.....	63
1.3.5 <i>Shigella flexneri</i> serotipo 4.....	65
1.3.6 <i>Shigella flexneri</i> serotipo Y.....	65
1.3.7 <i>Shigella flexneri</i> serotipo X.....	66
1.3.8 <i>Shigella flexneri</i> “Atípicos AA479”.....	67
1.4 Estudio de aislamientos asociados a brotes por PFGE.....	70
 Parte 2 -	
Caracterización molecular de una selección de aislamientos “Atípicos AA479” de <i>S. flexneri</i> por PFGE, Mapeo de Genoma Completo (“Whole Genome Mapping” o WGM) y PCR.....	
2.1 Comparación de genomas por PFGE y WGM.....	74
2.2 Caracterización de aislamientos “Atípicos AA479” por serotipificación molecular (PCR múltiple).....	76
2.3 Relación genética por PFGE de las nuevas variantes “Atípicas AA479” identificadas por PCR.....	78

DISCUSIÓN	86
CONCLUSIONES FINALES	97
ANEXO	100
Hospitales y Laboratorios que remitieron aislamientos	113
Hospitales y Laboratorios del proyecto “MIDAS”	115
BIBLIOGRAFÍA	116

RESUMEN

Shigella flexneri (*S. flexneri*) es el principal serogrupo del género causal de diarreas en el mundo y Argentina, se reconocen 13 serotipos según el esquema de serotipificación cuya última revisión realizó Brenner en 1984. Desde entonces, se reportaron en el mundo nuevos serotipos, llegando a 20, según algunos autores .

Si bien la serología es la técnica tradicional de serotipificación, se han desarrollado técnicas para la serotipificación molecular, como por ejemplo las basadas en PCR múltiple.

En Argentina, se encuentra constituida la Red de Diarreas y Enteropatógenos de Transmisión Alimentaria, cuyo Laboratorio de Referencia Nacional (LNR) para *Shigella spp.* (Servicio Enterobacterias, INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán”) recibe aislamientos de casos esporádicos y asociados a brote de *S. flexneri* en el marco de la vigilancia. Además, desde el 2004, el LNR coordina la Red PulseNet (PN) América Latina y Caribe de epidemiología molecular para la vigilancia de infecciones bacterianas transmitidas por alimentos, que utiliza protocolos estandarizados de Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE) para la subtipificación de bacterias, contando desde 2009 con un protocolo específico para *S. flexneri*.

Por otra parte, ese mismo año, se comenzó el estudio de un grupo de aislamientos no tipificables emergentes en el país, denominados “Atípicos”, que ya en 2011 tenían una prevalencia similar a la del serotipo 2, mayoritario hasta el momento.

En la Parte 1 de este trabajo, se estudió la diversidad genética y distribución témporo-espacial de 840 aislamientos incorporados en la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos *S. flexneri*, incluyendo 7 serotipos y “Atípicos”, recuperados en casos esporádicos y de brote entre 2004-2014.

La diversidad fue de 404 subtipos genéticos, en ocasiones persistentes en tiempo y lugar. Dentro de cada serotipo, se encontró mayor relación genética entre sí que con otros, y a su vez la diversidad encontrada permitió discriminar subtipos para su aplicación en epidemiología molecular. Además, se pudieron estudiar y confirmar la ocurrencia de 16 brotes.

En la Parte 2, se profundizó la caracterización de aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos” mediante PFGE, Mapeo de Genoma Completo y serotipificación molecular por PCR. Se estableció que los 2 aislamientos “Atípicos” estudiados pertenecían a los serotipos Xv (por X variante) y 4av (por 4a variante). Además, aplicando una PCR para serotipificación molecular, se determinó en otros 77 aislamientos “Atípicos”, la

existencia no solo de los serotipos Xv y 4av, sino también del serotipo Yv (por Y variante).

En conclusión, en este trabajo, se obtuvo conocimiento de la diversidad genética de cepas circulantes causales de casos esporádicos y asociados a brotes de diarrea en el país. Constituyéndose una Base de Datos Nacional de subtipos genéticos de *S. flexneri* que servirá de base para la vigilancia y estudios de brotes por epidemiología molecular.

Además, se caracterizó a un grupo de aislamientos “Atípicos” detectados desde 2009, identificándose 3 serotipos nunca antes descritos en el país, proponiéndose la nomenclatura Xv, Yv y 4av, utilizada en la bibliografía actual, hasta tanto se llegue a un consenso mundial. Por último, se implementó como alternativa a la serología, una herramienta complementaria, versátil, rápida y accesible, para la identificación de todos los serotipos y subserotipos conocidos hasta el momento de *S. flexneri*.

INTRODUCCIÓN

Shigella

Características bioquímicas y serológicas generales del género Shigella spp.

El género *Shigella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gram negativos, no móviles, no formadores de esporas y anaerobios facultativos. Fue descrito por primera vez en 1897 por el médico japonés Kiyoshi Shiga como *Bacillus dysenteriae*, agente causal de disentería bacilar, distinguiendo así a estos microorganismos de *Bacillus coli* (hoy *Escherichia coli*). Hoy día, en cuanto a la taxonomía de *Shigella* y *Escherichia coli* (*E. coli*), está reconocido en la literatura que ambos microorganismos tienen suficientes similitudes para ser considerados de la misma especie. Esto se ha demostrado con estudios principalmente basados en secuencia de genes “*housekeeping*” y secuencias genómicas (Pupo y col., 2000; Manual de Microbiología Clínica de la AAM, 2016). Sin embargo, se continúa considerando a *Shigella* como un género aparte, principalmente debido a su significancia clínica así como a la asociación de este género con la disentería.

El género *Shigella* se compone de cuatro especies/serogrupos: *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*. Salvo esta última, las demás especies se clasifican en serotipos y subserotipos, reconociéndose al momento 20, 15 y 19 subserotipos respectivamente (Molecular Medical Microbiology, 2015); sin embargo estos números varían en la literatura, particularmente respecto a *S. flexneri*, encontrándose diversas publicaciones con propuestas de nuevos serotipos provisionales.

Entre las pruebas bioquímicas que sirven para diferenciar estas cuatro especies, se pueden mencionar, la fermentación del manitol, decarboxilación de la ornitina y el ONPG (orto-nitrofenilgalactopiranosido). *S. sonnei* es positiva para las tres pruebas, *S. dysenteriae* negativa para las 3 pruebas, y *S. flexneri* junto a *S. boydii* son positivas para la fermentación del manitol. En este último caso, se puede completar su identificación por serología (Manual de Procedimientos Diagnóstico y Caracterización de *Shigella* spp., 2007).

La serología de especie se realiza por aglutinación en lámina con antisueros polivalentes específicos. En Argentina se disponen de dichos antisueros, producidos localmente en el Instituto Nacional de Producción de Biológicos, INPB-ANLIS “Carlos G. Malbrán” (INPB). Para *S. boydii* se dispone de dos antisueros: Osh-CI(-) que aglutina los serotipos indol negativo (1,2,3,4,6,8,10,12 y 14) y el Osh-CI(+) que aglutina los serotipos indol positivo (5,7,9,11,13 y 15). Del mismo modo, para *S. dysenteriae* se producen los antisueros polivalentes Osh-AI (+) que aglutina los serotipos indol positivos (2,7 y 8) y el

Osh-AI (-) que aglutina los serotipos indol negativos (1,3, 4, 5, 6, 9 y 10). En el caso de *S. sonnei*, se cuenta con un antisuero polivalente denominado Osh-D. Por último, el suero anti-*S. flexneri*, polivalente Osh-B, aglutina a todos los serotipos de esta especie (Manual de Procedimientos Diagnóstico y Caracterización de *Shigella* spp., 2007).

Epidemiología

Los miembros del género *Shigella* spp. son causales de diarrea, constituyendo un problema de salud pública mundial. Se estima que ocurren aproximadamente 164,7 millones de casos de shigelosis por año en el mundo, que afectan principalmente a la población de menores de 5 años de edad en países en desarrollo (163,2 millones) y causan la muerte de 1,1 millón de personas (Molecular Medical Microbiology, 2015).

Shigella tiene una baja dosis infectiva, siendo suficiente la ingesta de 10 a 100 células para causar enfermedad. El intestino humano es reconocido como el hábitat y reservorio natural de *Shigella* spp., aunque también se ha aislado de primates, como monos y chimpancés. Las infecciones por *Shigella* spp. se transmiten principalmente de persona a persona por vía fecal-oral y por ingesta de alimentos o aguas contaminadas con heces humanas. Este patógeno se encuentra mayormente asociado a condiciones sanitarias deficientes y de hacinamiento. En lugares donde el tratamiento de los desechos sanitarios es inadecuado, las moscas domésticas pueden ser vectores para la transmisión de la shigelosis (Niyogi, 2005).

Los casos presentan un patrón estacional con aumento de las infecciones en el período estival. Se han observado numerosos brotes familiares, en el ámbito de instituciones cerradas como jardines maternos y comedores debido a la transmisión entre personas y/o por contaminación de alimentos durante su manipulación. También se registraron brotes en la comunidad, asociados a deficiencias en el tratamiento o disponibilidad de agua para consumo (Manual de Microbiología Clínica de la AAM, 2016).

La prevalencia de los serogrupos y serotipos de *Shigella* en el mundo va variando a través del tiempo. Actualmente, *S. sonnei* es aislada principalmente en países desarrollados (80% de los aislamientos), mientras que *S. flexneri* es mayormente causal de shigelosis en países en desarrollo. Afortunadamente, no se han reportado en los últimos años casos por *S. dysenteriae* 1 productor de toxina Shiga (Ashkenazi y Cohen, 2013). En nuestro país, *S. flexneri* es el serogrupo más frecuente, seguido por *S. sonnei*; mientras que *S. boydii* y *S. dysenteriae* se aíslan en ese orden, con menor frecuencia.

Shigelosis: manifestaciones clínicas y tratamiento

La morbi-mortalidad de las infecciones por *Shigella* spp. depende de la edad de la persona, de su estado nutricional, de la magnitud de la dosis infectante y en ocasiones del serotipo del microorganismo. A excepción de *S. dysenteriae* serotipo 1, la mayoría de los serotipos de *Shigella* causan diarrea, frecuentemente sanguinolenta y/o inflamatoria (disentería) que en pacientes inmunocompetentes resuelve entre los 5 y 7 días, y que además puede estar acompañada por fiebre y dolor abdominal. El tiempo de incubación es de entre uno y dos días. Las personas pueden ser portadoras asintomáticas transmitiendo la bacteria a otros pacientes susceptibles, por ejemplo manipulando alimentos. *S. dysenteriae* serotipo 1 produce la forma más severa de la enfermedad, con una tasa de letalidad del 20%. Los microorganismos de este serotipo, no identificado hasta ahora en la Argentina, son capaces de producir toxina Shiga, ocasionando síndrome urémico hemolítico (Manual de Microbiología Clínica de la AAM, 2016).

El tratamiento con antibióticos, puede reducir la severidad de los síntomas y el riesgo de complicaciones, así como acortar el periodo de excreción del microorganismo en las deposiciones y su consecuente transmisión. El tratamiento empírico recomendado para las infecciones que lo requieran incluye alguno de los siguientes agentes antimicrobianos: azitromicina (AZI), ciprofloxacina (CIP) o ceftriaxona en niños, y fluorquinolonas (FQ) en adultos (Molecular Medical Microbiology, 2015; WHO Guidelines for control of Shigellosis, 2005). Otras medidas a tomar consisten en la rehidratación oral o cuando esto no sea posible, por vía intravenosa; restitución de la alimentación y suplementación con zinc. Los medicamentos para acortar o eliminar las deposiciones deben ser evitados (WHO Guidelines for control of Shigellosis, 2005).

Resistencia a antimicrobianos

En el mundo se han reportado ciertas tendencias en relación a la resistencia a antimicrobianos en *Shigella* spp. Pueden mencionarse, el aumento de resistencia a CIP y ácido nalixídico (NAL) en Asia y África en comparación con Europa y América. También, el aumento a la resistencia a las FQ en países en desarrollo, como en India, donde se detectó un aumento del 50%. Aislamientos de *S. flexneri* serotipo 1c con resistencia a ampicilina (AMP), trimetoprima/sulfametoxazol (TMS) y tetraciclinas (TET) reportados en Bangladesh, Vietnam, Egipto e India, mientras que en China se encontró resistencia a CIP y cefalosporinas

de 3^{ra} generación (C3G) en este serotipo. Por último, los emergentes aislamientos de *S. flexneri* Xv en China que mostraron un perfil de multirresistencia a antimicrobianos, incluyendo TET, estreptomicina, estreptotricina, cloranfenicol (CMP), AMP y trimetoprima (Molecular Medical Microbiology, 2015; Sun y col., 2011; WHO Guidelines for control of Shigellosis, 2005).

En Argentina, la Red WHONET de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos aplica estrictas normas de control de calidad interno y está integrada por laboratorios de todo el país. En esta red, la sensibilidad a los antimicrobianos mediante el método de difusión con discos se realiza según normas CLSI, evaluando la actividad a distintas drogas. El protocolo vigente desde el año 2005 para *Shigella* spp. es: AMP, TMS, CIP, cefpodoxima (POD), NAL, fosfomicina (FOS) y CMP. Entre los años 1994 y 2009, se encontró que los porcentajes de resistencia a FOS, CIP, C3G y nitrofuranos fueron muy bajos o nulos, mientras que se encontró resistencia principalmente a AMP, TMS y CMP en las cuatro especies con variabilidad entre ellas. En el caso de *S. flexneri*, la resistencia a AMP en ese periodo fue del orden del 80%, a CMP del 70% y a TMS del 50%, encontrándose un aumento sostenido desde 1996 (40% de resistencia) y una disminución de resistencia a TMS de un 80% en 1996 a 50% en 2009. Si bien se observa resistencia a las drogas de primera elección, se cuenta con varias alternativas de tratamiento para Shigelosis en Argentina (Galas y col., 2010).

Vacunas

Actualmente hay varias vacunas en desarrollo en distintos estadios de prueba, pero no existe aún ninguna aprobada para su uso. Gracias a los avances en el conocimiento de los mecanismos de virulencia y las estructuras antigénicas que provocan respuesta inmune contra el patógeno, diversas estrategias han sido desarrolladas con el fin de lograr obtener una vacuna que sea eficiente y segura. Algunos estudios mostraron que la duración de la protección a un dado serotipo fue limitada en el tiempo, mientras que otros mostraron diferencia en la eficiencia según el rango etario (Passwell y col., 2010). Otra cuestión que hizo difícil contar con una vacuna eficiente es que la inmunidad contra *Shigella* es serotipo específica. Se postula la necesidad de contar con una vacuna, ya que debido a la baja dosis infectiva necesaria para causar enfermedad, las medidas de higiene no son suficientes para erradicar la shigelosis en áreas endémicas, además, al ser el humano el principal reservorio, una vacuna eficaz podría conllevar a una reducción significativa de la enfermedad.

Las últimas estrategias tienen como objetivo desarrollar una vacuna que sea al menos pentavalente, para cubrir un rango poblacional amplio, dadas las diferencias regionales de la prevalencia de los distintos serogrupos y serotipos en el mundo. Una vacuna contra *S. dysenteriae* 1, *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 3a y *S. flexneri* 6 cubriría al 75% de los casos mundiales. Además se asume que se lograría protección cruzada contra otros 11 serotipos de *S. flexneri* adicionales, con los cuales se comparten determinantes antigénicos.

Se considera que hay dos enfoques para el desarrollo de una vacuna multivalente contra *Shigella*: combinar varias vacunas serotipo específicas en una sola, o utilizar antígenos con reacción cruzada en los distintos serotipo. Por otra parte, existen prototipos de vacunas tanto de cepa viva-atenuada como de cepa inactivada, ya sea celular o de subunidades (Ashkenazi y Cohen, 2013).

En este contexto, resulta de relevancia el conocimiento oportuno de los serotipos y subserotipos circulantes en el mundo, como también los subtipos genéticos predominantes en cada región, a fin de proveer información específica y actualizada a ser considerada en el desarrollo de las fórmulas vacunales.

Patogenia

Shigella spp. es un patógeno invasivo, que puede atravesar el epitelio intestinal, evadir la fagocitosis por macrófagos y diseminarse a las células intestinales adyacentes. La infección por *S. flexneri* comienza cuando atraviesa las *células M* del epitelio intestinal, las cuales son especializadas y constantemente toman partículas del lumen para translocarlas a la mucosa, desencadenando la respuesta inmune (**Figura 1**). *Shigella* causa su propia internalización a las células a través del Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3). Se transloca a la mucosa intestinal y es capturada por los macrófagos, donde evade su degradación disparando un mecanismo similar a la apoptosis, desencadenante de señales proinflamatorias que causan su liberación del macrófago. Así logran invadir las células epiteliales desde la membrana basolateral y desplazarse hacia células adyacentes a través del citoplasma por polimerización de la actina. Las señales proinflamatorias desencadenadas en el macrófago, inducen la respuesta inmune innata a través de la secreción de interleuquina 18 (IL-18) que actuará en células “*natural killers*” (Nk-cell) provocando a su vez la secreción de Interferón γ (INF- γ) desencadenando la activación inmune (**Figura 1**). Por otra parte, la atracción de polimorfonucleares (PNM) mediante la interleuquina -1β (IL- 1β) secretada por macrófagos e interleuquina-8 (IL-8) secretada por células epiteliales infectadas (esto es estimulado por el factor de transcripción

NF-κB), produce el influjo de estas células contribuyendo con la desintegración del epitelio, facilitando la invasión de un mayor número de bacterias (**Figura 1**). La infección se resuelve cuando los PMN fagocitan y matan a las bacterias patógenas (Manual de Microbiología Clínica de la AAM, 2016).

Figura 1: Patogénesis de *Shigella* spp. basado en estudios de *S. flexneri*

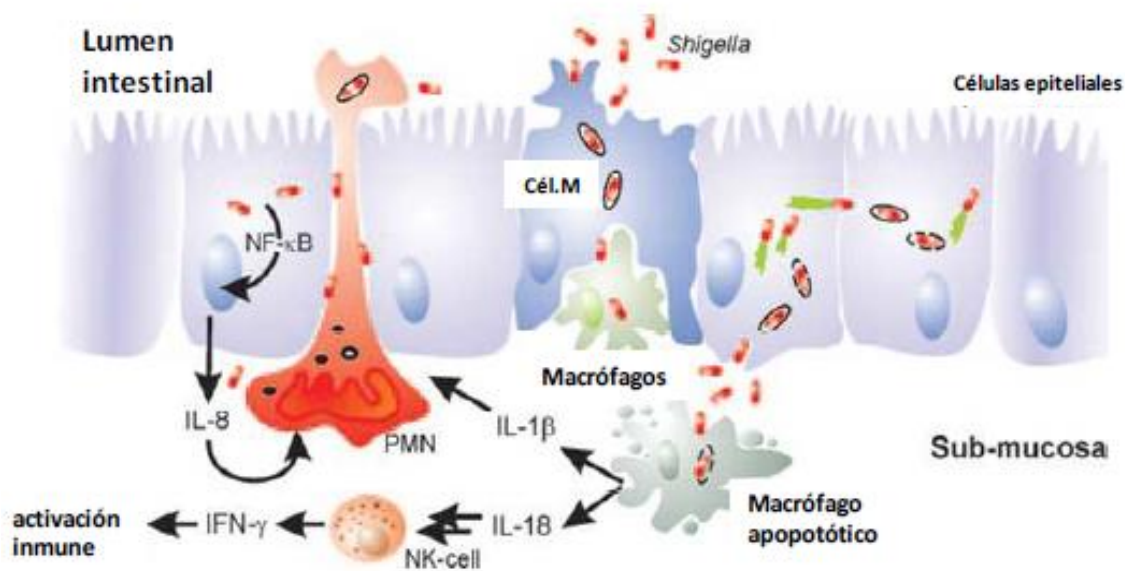


Figura adaptada de Schoeder y col., 2008.

Shigella posee factores de virulencia codificados en el cromosoma y en un gran plásmido. El plásmido lleva la información genética para la síntesis de la maquinaria molecular que hace posible la invasión y supervivencia intracelular, principalmente para el SST3. Tanto en el cromosoma, como en el plásmido de virulencia de *Shigella*, se observaron evidencias de la dinámica de adquisición de genes por transferencia horizontal, como numerosas secuencias de inserción (IS) y marcadores de rearrreglos genómicos, como las islas de patogenicidad. Estas diferencias conllevan a la diversidad de fenotipos de virulencia. *Shigella* produce las enterotoxinas, SHET 1, codificada en el cromosoma de *S. flexneri* 2a y raramente en otros serotipos y SHET2 codificada en el plásmido de virulencia, encontrada en algunos serotipos y en *Escherichia coli* enteroinvasiva, ambas inducen acumulación de fluido en el modelo de asa de conejo, tanto in vivo como in vitro lo cual está involucrado en la diarrea acuosa inicial durante la infección temprana. Por último, la toxina Shiga (enterotóxica, neurotóxica y citotóxica) se ha encontrado únicamente en *S. dysenteriae* 1 y está codificada en el cromosoma. Esta toxina está relacionada con el desarrollo del síndrome urémico hemolítico (Nigoyi, 2005).

Estructura antigénica de serotipos y subserotipos en Shigella flexneri

Al día de hoy, el “International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the taxonomy of *Enterobacteriaceae*” reconoce 13 serotipos y subserotipos de *S. flexneri*: 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, X e Y (Ewing, 1949; Brenner, 1984) (**Tabla 1**).

Tabla 1: Serotipos y subserotipos de *Shigella flexneri*.

Esquema basado en Ewing, 1949 y revisado por Brenner, 1984.

Serotipo	Serología									
	Antígenos de tipo						Antígenos grupales			Fórmula antigénica
	I	II	III	IV	V	VI	3,4	6	7,8	
1a	+						+/-			I:(3,4)
1b	+						+/-	+		I:(3,4),6
2a		+					+/-			II:(3,4)
2b		+							+	II:7,8
3a			+				+/-	+	+	III:(3,4),6,7,8
3b			+				+/-	+		III:(3,4),6
4a				+			+/-			IV:(3,4)
4b				+				+		IV:6
5a					+		+/-			V:(3,4)
5b					+				+	V:7,8
6						+				VI:-
X									+	-:7,8
Y							+			-:3,4

“+”: aglutinación positiva con el antisuero específico; “+/-” y () : puede o no detectarse el antígeno por serología.

Estos serotipos se basan en la estructura y combinación de ciertos determinantes presentes en el antígeno somático O del lipopolisacárido de la membrana externa (LPS), ya que esta bacteria no posee antígenos flagelares (H) o capsulares (K).

La estructura básica del antígeno O, que se refiere al denominado serotipo Y, se compone de repeticiones de un tetrasacárido compuesto por 1 residuo N-acetil-D-glucosamina y 3 residuos L-Ramnosas (excepto serotipo 6). La diversidad de serotipos y subserotipos está dada por la adición de residuos glucosil u O-acetil con una unión específica en distintas L-Ramnosas de la estructura básica, donde cada modificación corresponderá a un determinante antigénico (**Figura 2, A**). Estos, se clasifican en factores de tipo (FT), designados con números romanos (I, II, III, IV, V y VI) y factores grupales (FG), designados con números

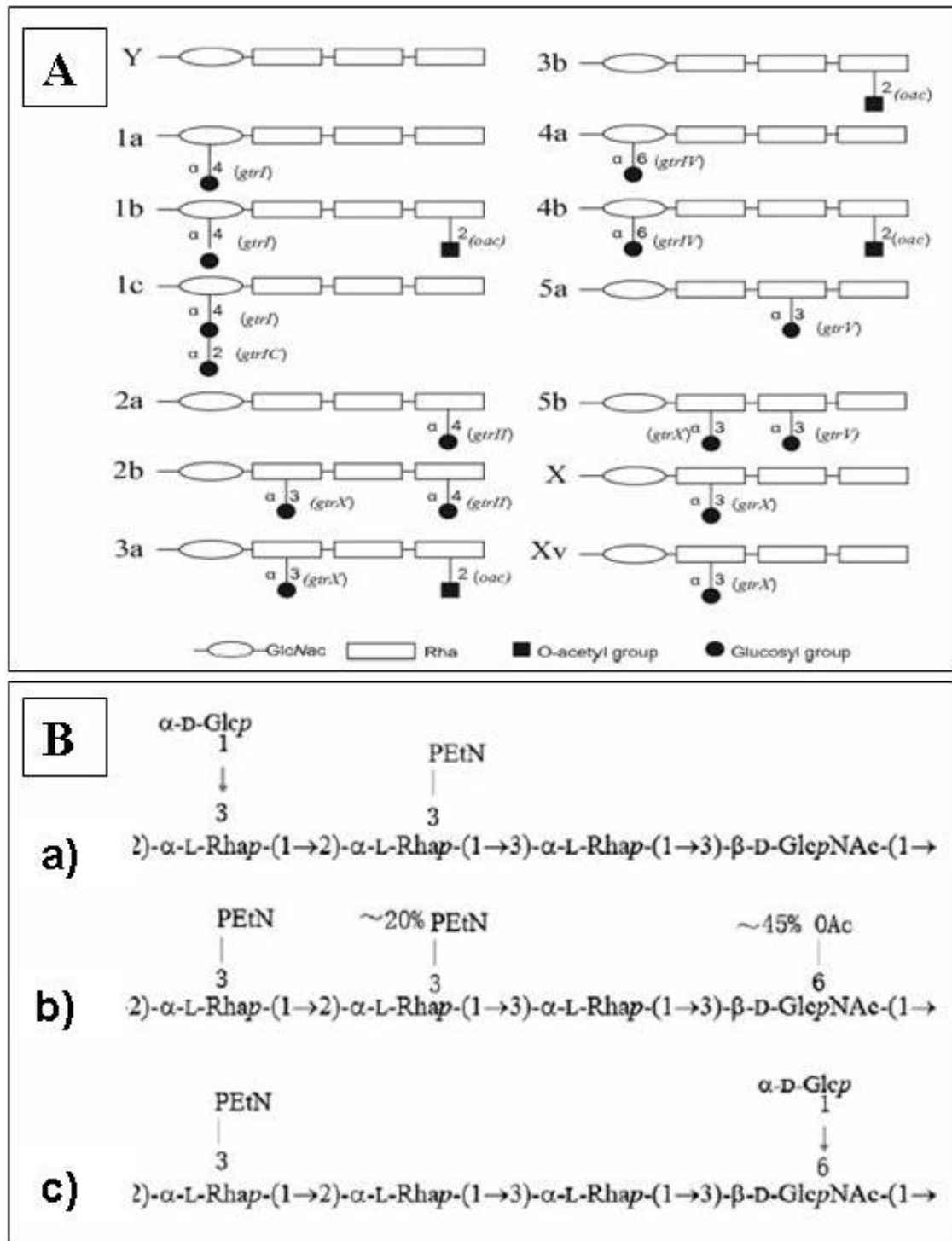
arábigos (3,4; 6 y 7,8). Los factores de tipo son encontrados en un solo serotipo (por ej. factor de tipo I, determina a los serotipos 1a y 1b), mientras que los factores grupales pueden encontrarse en distintos serotipos (por ej. FG 7,8 se encuentra en los serotipos 2b, 3a, 5b y X) (Carlin y col., 1989) (**Tabla 1**). Esta estructura del antígeno somático O, confiere la especificidad de la respuesta inmune contra un dado serotipo (Allison y Verma, 2000).

Sin embargo, esta clasificación y esquema de serotipificación se encuentra desactualizado, ya que en los últimos años se han identificado nuevas combinaciones antigénicas y nuevos determinantes antigénicos que dieron lugar a nuevas variantes o serotipos provisionales.

Uno de ellos, es el determinante antigénico denominado “E1037”, que corresponde a un residuo de fosfoetanolamina unido al tetrasacárido repetitivo del LPS en la Ramnosa^{II} o Ramnosa^{III} en posición 3, dependiendo en que serotipo se encuentre (Sun y col., 2013). Este antígeno, se ha identificado en *S. flexneri* serotipo Y, X y 4a; estas combinaciones de serotipo y antígeno “E1037” fueron denominadas como Y variante (**Yv**), X variante (**Xv**), y 4a variante (**4av**), también se reportó este antígeno en algunos aislamientos del serotipo 6 (Sun y col., 2012) (**Figura 2, B**).

Otro determinante antigénico, no contemplado en el esquema original de Ewing y Brenner, es el denominado “1c” que define al serotipo provisional 1c. Está definido por la adición de un disacárido, de dos grupos glucosil, al tetrasacárido repetitivo del LPS y es propuesto por la comunidad científica como serotipo 7, con dos subserotipos (Jakheta y col., 2014; Stagg y col., 2008; Stagg y col., 2009; Taludker y col., 2003).

Figura 2: Composición química de las modificaciones en los antígenos O de los diferentes serotipos de *S. flexneri*



Los distintos serotipos difieren en la adición, con una unión específica, de un grupo glucosil, O-acetil o fosfoetanolamina a diferentes azúcares de la unidad repetida de tetrasacárido del LPS.

A) Estructura del Antígeno O de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, Y, X y sus subserotipos. Los genes específicos se indican entre paréntesis. Figura adaptada de Sun y col., 2011.

B) Estructura del Antígeno O en los serotipos propuestos: **a)** Xv **b)** Yv **c)** 4av. Figura adaptada de Sun y col., 2012.

Bases genéticas de la seroconversión en *Shigella flexneri*

Los genes localizados en el loci *rfb/rfc* están involucrados en la biosíntesis del esqueleto básico del antígeno O (serotipo Y). Una vez completa la cadena del Antígeno O, es transferida al core del Lípido A por la ligasa Rfa y una vez ensamblada la molécula del LPS, es transportada a la membrana externa.

Las bases genéticas de la seroconversión o cambio de serotipo en una cepa determinada de *S. flexneri*, están dadas por la adquisición y expresión de genes codificados en el ADN de bacteriófagos que se integran en sitios específicos del genoma hospedador de *S. flexneri*. Hasta el momento se han descrito 7 bacteriófagos, SfI, Sflc, SfII, Sf6, SfIV, SfV y SfX responsables de todas las modificaciones en el antígeno O conocidas hasta el momento (Sun y col., 2012). La glucosilación de los antígenos O, está dada por 3 genes, *gtrA* y *gtrB* (conservados en todos los serotipos) y *gtr* “type”. Este último comprende diferentes alelos que codifican para una glucosiltransferasa específica de cada serotipo, estos son los genes *gtrI*, *gtrII*, *gtrIV*, *gtrV* y *gtrX* que dan los serotipos 1, 2, 4, 5 (codifican para los FT I, II, IV y V) y X (codifican para el FG 7,8), respectivamente. Por otra parte, la O-acetilación en Ramnosa¹ depende del gen *oac* que codifica para una O-acetil transferasa, cuya acción resulta en la síntesis del FG 6 (serotipos 1b, 4b) y además correspondiente a la modificación del tipo 3 (serotipos 3a y 3b) (Allison y Verma, 2000; Sun y col., 2011) (**Figura 2, A**).

La modificación con fosfoetanolamina (antígeno “E1037”) está dada por una transferasa específica codificada en un gen plasmídico, *opt* (antes denominado *lpt-O*) (Sun y col., 2012; Sun y col., 2013).

Serotipificación por aglutinación con antisueros específicos en *Shigella flexneri*

El diagnóstico serológico, se realiza por aglutinación en placa enfrentando el aislamiento en estudio con un antisuero policlonal específico, producido mediante la inoculación en conejos de cultivos bacterianos inmunizantes desnaturalizados por calor y absorbidos con cepas heterólogas para lograr especificidad. Para determinar los serotipos de *S. flexneri*, pueden utilizarse antisueros de tipo policlonales, que determinan los serotipos 1 al 6. Además, en combinación con la aglutinación de antisueros de grupo (3,4; 6 y 7,8) pueden identificarse los subserotipos.

En Argentina, el INPB produce los antisueros policlonales necesarios para la

serotipificación referencial de *Shigella* en el marco de la Red de Diarreas y Patógenos de Transmisión Alimentaria (Red de Diarreas), proveyendo de estos insumos al Laboratorio de Referencia Nacional (LNR) del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS “Carlos G. Malbrán” (INEI-ANLIS) y a los laboratorios de la red. El LNR cuenta con los antisueros polivalentes para detección de las 4 especies de *Shigella*, y en el caso de *S. flexneri* los antisueros monovalentes para los serotipos 1 al 6.

También existen antisueros monoclonales para *S. flexneri* (MASF) para la identificación de serotipos y subserotipos de *S. flexneri*, los cuales no presentan reacción cruzada pero son de difícil acceso en la región de América Latina debido a su elevado costo. Entre ellos se encuentran el MASF-B que reconoce el antígeno putativo 1 presente en todas las cepas de *S. flexneri*; MASF I, II, IV-2, V y VI específicos para los serotipos 1, 2, 4, 5, y 6 respectivamente; MASF IV-I que reconoce el epítipo “E1037” presente en los serotipos Xv, Yv, 4av; MASF 1c específico para *S. flexneri* serotipo provisional 1c; MASF Y-5, MASF 6 y MASF 7,8 específicos para los FG 3,4; 6 y 7,8 respectivamente. (Carlin y col., 1989) (**Tabla 1**).

Serotipificación molecular

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos de serotipificación molecular en bacterias, incluyendo *Shigella*, basados en distintas estrategias para la detección de los genes responsables de la expresión de proteínas involucradas en la biosíntesis de los antígenos que dan especificidad de serotipo en cada microorganismo. Algunos de estos métodos, comprenden aquellos basados en el método de “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR) (Arrach y col., 2008; Sun y col., 2011; Tanmoy y col., 2016), PCR “*Real-Time*” (Gentle y col., 2016) o en microarrays de ADN (Li y col., 2006). Otros, utilizan programas informáticos que comparan los patrones de RFLP (polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción) de ciertos locus (Coimbra y col., 2010); tecnología Luminex (Carter y col., 2016; Fitzgerald y col., 2007) y más recientemente, secuenciación de genoma completo (Gentle y col., 2016; Hyden y col., 2016).

En el LNR se implementó la PCR múltiple para la serotipificación molecular de todos los serotipos conocidos de *S. flexneri* desarrollada por Sun y col en 2011, como se detalla más adelante en el punto **2.2 de la sección Materiales y Métodos**.

Shigella flexneri: Nuevas variantes y serotipos emergentes en los últimos años en el mundo

En 1988, se identificaron en Rusia aislamientos que fueron denominados *S. flexneri* 4c, dado que mostraban aglutinación positiva con los antisueros de tipo IV de Denka Seiken pero no podían clasificarse como subserotipo “a” o “b” conocidos hasta el momento (**Tabla 1**), ya que mostraban aglutinación con el FG 7,8, por lo cual se les asignó el subserotipo “c” (Pryamukhina y Khomenko, 1988). Sin embargo, esta denominación nunca fue incluida en el esquema de serotipificación.

Luego, en 2010, se reportó la emergencia de aislamientos de *S. flexneri* multirresistentes en China, denominados como Xv -por X variante-, el cual mostró una prevalencia mayor a la del serotipo 2a que había sido el mayoritario en el periodo 2002 – 2007 en la provincia de Henan (Ye y col., 2010). Se demostró que estos aislamientos derivaban del serotipo X, presentando el FG 7,8 y habiendo adquirido adicionalmente el antígeno “E1037” (Ye y col., 2010) (**Tabla 2**). Dado que estos aislamientos no aglutinaban con el antisuero monoclonal (MASF IV-2) y si con el antisuero comercial Denka Seiken de tipo IV (específico para el serotipo 4), quedó en evidencia que éste último reconocía antígenos adicionales, presumiblemente al antígeno “E1037” (Sun y col., 2012). Esto sugiere que los aislamientos denominados 4c en Rusia, correspondían en realidad a los identificados como Xv en China, ya que fueron identificados con el antisuero IV de Denka Seiken y no con el monoclonal.

Por otra parte, en Bangladesh se han identificado aislamientos de serotipo 4 (confirmados con MASF IV) que además poseen el antígeno “E1037”, que fueron denominados inicialmente “*S. flexneri* Type 4” (Taludker y col., 2001; Taludker y col., 2002). Este mismo subserotipo se encontró también en China, donde se propuso la designación “4av” -por 4a variante- (Sun y col., 2012), además de en otros países como Australia y Rusia (Perepelov y col., 2009), (**Tabla 2**).

También se identificó la presencia del antígeno “E1037” en aislamientos de *S. flexneri* Y, los cuales han sido reportados en China como *S. flexneri* Yv -por Y variante- (Sun y col., 2013), (**Tabla 2**).

Otro serotipo emergente, corresponde a aislamientos que poseen el antígeno denominado 1c por algunos autores (Taludker y col., 2003), y propuesto como serotipo 7a por otros investigadores (Foster y col., 2011), (**Tabla 2**). Una variante de este serotipo que aglutina con el MASF 1c y presenta además el FG 6 ha sido propuesta como *S. flexneri* 7b

(Foster y col., 2011), (**Tabla 2**). *S. flexneri* portador del antígeno 1c, se ha aislado en diversos lugares como, Bangladesh, Egipto, Indonesia, Pakistán y Vietnam (Stagg y col., 2008; Stagg y col., 2009; Taludker y col., 2002).

Finalmente, otro serotipo recientemente reportado corresponde al denominado “1d”, el cual posee el FT 1 y el FG 7,8 (Luo y col., 2012; Shashkov y col., 2013), (**Tabla 2**).

En resumen, existen hasta la actualidad al menos 20 serotipos y subserotipos de *S. flexneri* identificados, caracterizados y aislados en al menos un país, aunque la mayoría de ellos ya han sido recuperados en varias regiones del mundo (**Tabla 2**). Esto evidencia la necesidad de una actualización y armonización de la taxonomía y nomenclatura vigente de *S. flexneri* propuesta por Ewing en 1949 y revisada por Brenner en 1984 (**Tabla 1**), la cual dado los avances en el conocimiento de las estructuras antigénicas así como genéticas y de genómica, ha quedado obsoleta, dando lugar a que distintos grupos en el mundo propongan nomenclaturas diferentes para serotipos que son en esencia el mismo (por ej.: 4c y Xv; Type 4 y 4av).

Tabla 2: Serotipos y subserotipos de *Shigella flexneri*. Esquema basado en serología y PCR incorporando los serotipos emergentes.

Serotipo	Serología							PCR														
	Antígenos de tipo							Antígenos grupales				Fórmula antigénica	wzx1-5	gtrI	gtrIC	gtrII	oac	gtrIV	gtrV	gtrX	opt	wzx6
	1	2	3	4	5	6	MASF 1c	3,4	6	7,8	MASF IV-I / AA479 ⁽¹⁾											
1a	+							+/-				I:(3,4)	+	+								
1b	+							+/-	+			I:(3,4),6	+	+		+						
1d	+									+		I:7,8	+	+							+	
2a		+						+/-				II:(3,4)	+			+						
2b		+								+		II:7,8	+			+					+	
3a			+					+/-	+	+		III:(3,4),6,7,8	+			+					+	
3b			+					+/-	+			III:(3,4),6	+			+						
4a				+				+/-				IV:(3,4)	+				+					
4b				+						+		IV:6	+			+	+					
4av ⁽²⁾				+				+/-			+	IV:(3,4),E1037	+				+				+	
5a					+			+/-				V:(3,4)	+					+				
5b					+					+		V:7,8	+					+	+			
6						+						VI:-	-								+	
6b						+					+	VI:E1037	-								+	+
7a (1c)										+		VII:-	+		+							
7b										+		VII:6	+		+		+					
X										+		-:7,8	+								+	
Xv ⁽²⁾										+	+	-:7,8,E1037	+								+	+
Y									+			-:3,4	+									
Yv ⁽²⁾									+		+	-:(3,4),E1037	+									+

1) Se encontró correlación entre el antisuero “AA479” y el MASF IV-I que detecta al antígeno “E1037”, propuesto como antígeno grupal por encontrarse en múltiples serotipos.

(2) estos serotipos muestran reacción cruzada con el antisuero de tipo IV comercial Denka Seiken, con antisuero el monoclonal (MASF IV-I) o de tipo 4 de producción local del INPB no se obtiene aglutinación en estos serotipos.

“+” y “-”: resultado positivo o negativo para la aglutinación con el antisuero específico o para amplificación por PCR para el gen específico;

“+/-”: detección por serología variable.

Epidemiología molecular y Subtipificación

La epidemiología molecular surgió como consecuencia de la integración entre la biología molecular y la investigación epidemiológica tradicional. Puede definirse como “una ciencia enfocada al estudio a nivel molecular, de la etiología, distribución y prevención de enfermedades genéticas, infecciosas y ambientales en las poblaciones humanas, de animales y de plantas y sus posibles interacciones”.

La aplicación de la biología molecular a la identificación de subtipos microbianos y sus relaciones permite principalmente identificar y confirmar brotes, identificar la fuente de contaminación y rutas de diseminación, evaluar si un aislamiento es parte del brote o si se relaciona con casos esporádicos, confirmar la asociación con un vehículo o vector, determinar si una infección es nueva o recurrente y realizar análisis de clonalidad para establecer relaciones genéticas entre dos o más microorganismos, comparando perfiles de ADN o “*fingerprinting*” de varios aislamientos a la vez (Manual “X Curso Epidemiología Molecular en la Vigilancia de las Infecciones Bacterianas”, 2013).

En relación al estudio de brotes, en particular de enfermedades de transmisión alimentaria (E.T.A), pueden ser definidos como “un incidente que involucra a dos o más personas, quienes manifiestan una enfermedad similar, los mismos síntomas, excretan los mismos patógenos, y se observa una asociación epidemiológica de tiempo, lugar y persona que sugiere la exposición a una misma fuente de infección”. Se pueden diferenciar los brotes epidémicos, en los cuales además se detecta un aumento en el número de casos esperado para un determinado tiempo y lugar. La asociación se establece en términos de: tiempo (aparición de casos con síntomas similares al cabo de horas o días), lugar (alimentos del mismo origen, lugar de consumo, asistencia a un mismo evento social o familiar, residencia en la misma zona, etc.) y persona (comer los mismos alimentos, tener la misma ocupación, etc.) (Manual “X Curso Epidemiología Molecular en la Vigilancia de las Infecciones Bacterianas”, 2013).

Numerosos métodos aplicados a la subtipificación molecular de bacterias se han desarrollado desde hace más de 20 años constituyendo una valiosa herramienta para la epidemiología molecular. Comenzando con aquellos basados en la amplificación de distintos tipos de secuencias de ADN mediante PCR. Por ejemplo, de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP-PCR), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RADP-PCR), polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP-PCR) y

polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP-PCR) entre otros (Olive y Bean, 1999); hasta llegar a los basados en secuenciación completa del genoma como los estudios de polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”) (den Bakker y col., 2011; Sabat y col., 2013; Stasiewicz y col., 2015) u otras tecnologías como Mapeo de Genoma Completo (WGM por “Whole Genome Mapping”, antes denominado “Optical Mapping”), (Fey y col., 2012; Kotewicz y col., 2008; Schwartz y col., 1993). Si bien estas últimas, y en particular las basadas en secuenciación, han avanzado mucho y comienzan a ser utilizadas no sólo en investigación sino también en vigilancia y epidemiología molecular en todo el mundo, en las últimas décadas han sido desarrollados una variedad de otros métodos, que aún en la actualidad siguen siendo utilizados ampliamente como técnicas de referencia o entre ellos, “Pulsed-field Gel Electrophoresis” o Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE), “Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysys” y (MLVA) “MultiLocus Sequence Type” (MLST).

En cuanto a MLVA, está basado en el análisis del polimorfismo de un cierto número de secuencias repetitivas en tándem (VNTRs) seleccionadas para cada microorganismo (usualmente serotipo específico) (Sabat y col., 2013). Se desarrollaron numerosos protocolos para *Shigella* (Gorgé y col., 2007; Liang y col., 2007) e incluso para *S. flexneri*, aunque en este caso, no es posible contar con un solo protocolo que incluya a todos los serotipos, lo cual hace difícil su implementación para vigilancia o estudios de brotes, además se ha encontrado que el poder de resolución entre los aislamientos de *S. flexneri* fue similar al encontrado mediante PFGE (Wang y col., 2009).

Otra técnica ampliamente utilizada para subtipificación es MLST, la cual se basa en la secuenciación de 7 genes “housekeeping”, altamente conservados. Es por esto que se ha encontrado mayor utilidad de este método en estudios filogenéticos donde se evidencian cambios de larga data, a diferencia de MLVA o PFGE más utilizados en contextos de brotes y vigilancia en tiempo real (Choi y col., 2007; Jenke y col., 2011).

PFGE, es considerada la técnica “Gold standard” para estudios de epidemiología molecular de bacterias patógenas, y fue la metodología escogida para subtipificar bacterias en el marco de la Red PulseNet (PN) de epidemiología molecular para la vigilancia de infecciones bacterianas transmitidas por alimentos. Esta red creada por el Centro para el Control de las Enfermedades (CDC), de USA (Gerner-Smidt y col., 2006; Swaminathan y col., 2006; www.pulsenetinternational.org), se ha extendido a todas las regiones del mundo

como PulseNet Internacional. En Argentina, el LNR, junto a OPS-OMS (Organización Panamericana de la Salud-Organización Mundial de la Salud), actúa como coordinador de PulseNet América Latina y Caribe desde sus inicios en la región durante el año 2004.

La técnica de PFGE consta de un protocolo básico que consiste en la lisis de las células bacterianas para la liberación del ADN cromosomal, su corte con una o dos enzimas de restricción apropiadas, la electroforesis de esos fragmentos de ADN, seguidos por su tinción, visualización y posterior análisis para establecer la relación genética entre los aislamientos. Los perfiles genéticos generados son altamente discriminatorios (comparados con otros métodos basados en PCR) estables y reproducibles. Lo interesante, es que a partir de la obtención de perfiles genéticos a través de protocolos estandarizados y validados, hace posible la creación de una base de datos para su comparación intra e inter-laboratorio, lo que permite el análisis de subtipos circulantes a nivel regional (Ribot y col., 2006, Campos y col., 2010; Brengi y col., 2012; Pichel y col., 2012).

En el marco de esta red, en el LNR, se estableció en 2006 una Base de Datos Nacional (BDN) de perfiles genéticos de aislamientos de *Shigella* spp. obtenidos por PFGE utilizando el protocolo estandarizado para *S. sonnei* (Ribot y col., 2006). Los brotes por *S. flexneri* también se analizaban con este mismo protocolo, pero los resultados no fueron óptimos para esta especie. Durante el período 2008-2011, se llevó a cabo en el marco de la Red PN Internacional el desarrollo y estandarización de un protocolo de PFGE para *S. flexneri* con el objeto de contar con un protocolo especialmente desarrollado para este serogrupo, que arrojará resultados robustos y reproducibles. Una vez finalizado este proceso de estandarización, el protocolo propuesto, fue sometido a una validación internacional multilaboratorial, liderada por el LNR, de la cual participaron 9 laboratorios pertenecientes a PN Internacional (PN Asia, PN Europa, PN USA y PN Latinoamérica y Caribe) (Pichel y col., 2012).

Desde 2009, se utiliza este nuevo protocolo para realizar la subtipificación molecular de aislamientos asociados a casos esporádicos y de brotes. Surgió así, la necesidad de crear una nueva base de datos para *S. flexneri*, que además incluyera datos retrospectivos de perfiles genéticos circulantes en el país en años previos para contar con un historial contra el cual comparar los nuevos aislamientos y realizar estudios de relación genética y diseminación témporo-espacial.

Otra metodología que puede ser utilizada para estudios de epidemiología molecular es

el Mapeo de Genoma Completo (WGM). Mediante esta tecnología, se puede obtener un mapa de restricción del genoma completo (“Whole Genome Map”) ordenado y de alta resolución de un aislamiento (bacterias, levaduras, hongos), realizando la lectura sin corrida electroforética, PCR o secuenciación (<http://opgen.com/genomic-services/what-is-whole-genome-mapping>).

Mediante el uso de una enzima de restricción de alta frecuencia de corte (entre 300 y 500 sitios) se crea un patrón único específico de un genoma, con miles de moléculas que son luego ensambladas creando el mapa del genoma completo. Constituye una herramienta para la finalización del ensamblado de secuencias completas, genómica comparativa, verificación de la tipificación, y para estudios de epidemiología de alta resolución (Onmus-Leone y col., 2013; Schwartz y col., 1993). También, mediante un programa propio del sistema, pueden crearse los mapas de restricción del genoma completo “*in silico*” de cualquier cepa de interés o de referencia contra la cual interese comparar las cepas en estudio, siempre y cuando se disponga de su secuencia genómica completa, por ejemplo en GenBank, en este caso, no es necesario contar con el cultivo.

De este modo, se pudo comparar en el presente trabajo un aislamiento de *S. flexneri* Xv de origen chino, cuya secuencia estaba disponible en GenBank, con cepas de origen argentino que fueron analizadas por Mapeo de Genoma completo.

***Shigella* en Argentina**

Vigilancia epidemiológica y prevalencia de Shigella spp. en Argentina

En Argentina, los casos de diarrea aguda son de notificación obligatoria, la notificación clínica se realiza semanalmente en la modalidad agrupada por edad a través del módulo C2 del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS). Por otra parte, los laboratorios de las instituciones de salud que participan en el Sistema de Vigilancia Laboratorial (SIVILA) del SNVS, notifican los casos estudiados por coprocultivo, y aquellos positivos, también por grupo de edad. Los casos de diarreas causados por bacterias conforman entre el 10 y el 25% de los coprocultivos positivos. Entre las diarreas bacterianas que se vigilan, se encuentran las producidas por *Bacillus cereus*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* y *Shigella*. Este último género constituye el agente bacteriano más frecuentemente aislado en casos de diarrea aguda con coprocultivo positivo (aproximadamente el 65%), siendo *S. flexneri* el serogrupo principal (aproximadamente el

75%). (Boletín Integrado de Vigilancia, N° 128 SE28, 2012; N° 203 SE 3, 2014).

El LNR de la Red de Diarreas para *Shigella* spp. está ubicado en el Servicio Enterobacterias del INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán”. La misión de esta red es fortalecer el sistema de vigilancia de las diarreas y patógenos de transmisión alimentaria a través de la organización de una red nacional, con componentes de las áreas humana y de alimentos, para obtener un diagnóstico microbiológico confiable, oportuno y reproducible que pueda ser utilizado en el mejoramiento de la atención del paciente y en la prevención de brotes.

En el marco de la Red de Diarreas, existen pautas para la derivación de muestras, las cuales fueron revisadas en 2013, estableciéndose que debían remitirse al LNR: los aislamientos confirmados como *S. sonnei* y *S. flexneri* serotipo 1, 2, 3 y “Atípicos AA479” (en el siguiente párrafo de esta introducción se profundiza sobre estos aislamientos) recuperados durante 3 días definidos al mes, lo cual se estimó que correspondía a aproximadamente el 10% mensual de estos serotipos más frecuentes; el 100% de los aislamientos confirmados como serotipo 6 y el 100% de los “no tipificables” (*S. flexneri* con serotipo sin determinar), a fin de completar su caracterización y realizar estudios de subtipificación.

En este contexto, en el LNR se estudiaron 9151 aislamientos de *Shigella* spp. durante el período 2004-2014. Estos aislamientos fueron de origen humano, principalmente recuperados de muestras de materia fecal de casos de diarrea, pero también de muestras de fluido vaginal de casos de vaginitis en niñas (N= 78, 0.85%) (Della Gáspera y col., 2012), de sangre en casos sepsis (N= 15, 0.16%) (Brenge y col., 2013) y orina en casos de infección urinaria (N= 3, 0.03%). Uno solo de los aislamientos recibidos, identificado como *S. sonnei*, fue aislado de una pasta de avellana utilizada para elaborar una rosca vienesa de elaboración casera, en el marco de un brote alimentario que involucró a 5 afectados, miembros de una familia. En el estudio de este brote, los análisis de PFGE realizados tanto en el aislamiento de origen alimentario como de los casos clínicos mostraron un idéntico perfil genético, confirmando al alimento como fuente de infección (Della Gáspera y col., 2015). Este constituye el primer hallazgo de aislamiento de *Shigella* en alimentos remitido al LNR, ya que si bien con frecuencia los estudios epidemiológicos realizados sugieren un alimento, principalmente al agua, como fuente probable de infección, nunca se pudo recuperar *Shigella* spp. de una fuente alimentaria en los brotes estudiados en el LNR (Pichel y col., 2007; Brenge y col., 2010).

La mayoría de los 9151 aislamientos de *Shigella* spp. analizados entre 2004 y 2014 (9055, 99%), fueron derivados en el marco de la red por los laboratorios de referencia jurisdiccional de las provincias. En este periodo, el serogrupo prevalente fue *S. flexneri*, representando el 71.2% (6511 aislamientos), seguido por *S. sonnei* con el 26.1% (2385 aislamientos). *S. boydii* representó el 2.3% del total (209 aislamientos), de los cuales el 86.1% fueron del serotipo 2, pero también se identificaron en el país al menos una vez los serotipos 4, 10, 5 y 14 en ese orden de frecuencia. Por último, *Shigella dysenteriae* (0,5%), fue el menos frecuentemente aislado, con 46 aislamientos remitidos al LNR, entre los cuales se identificaron los serotipos 2 y 3 (56,5 y 34,8 %), y en algunas ocasiones el serotipo 5.

Dentro de la especie *S. flexneri*, del total de 6511 aislamientos estudiados en el LNR, la frecuencia por serotipo fue: *S. flexneri* 2 (50,8 %), *S. flexneri* 1 (14.2%), *S. flexneri* 3 (14.1 %), *S. flexneri* “Atípicos AA479”, (9.9%), *S. flexneri* 6 (4.0%), *S. flexneri* 5 (0.9%), *S. flexneri* 4 (0.8%) y no tipificables (3.8%).

Emergencia de aislamientos de S. flexneri “Atípicos” en Argentina – Resultados preliminares

En relación a los aislamientos “no tipificables”, recibieron esta denominación aquellos identificados como *S. flexneri*, por bioquímica y aglutinación positiva con el antisuero polivalente Osh-B, pero de los cuales no pudo determinarse el serotipo, con los antisueros de tipo 1 al 6 producidos en el INPB ni con el uso adicional de antisueros comerciales (Denka Seiken, Japón) empleados para confirmación de resultados dudosos, cuando estuvieran disponibles. Cabe destacar que el uso de antisueros comerciales es fundamental para identificar por serología los serotipos X e Y, los cuales solo presentan aglutinación positiva con los FG 7,8 y 3,4 respectivamente. Sin embargo estos antisueros no se incluyen de forma habitual en el esquema de serotipificación debido a que no son producidos regularmente por el INPB, y los reactivos comerciales suelen estar disponibles en cantidad limitada, en consecuencia estos serotipos quedaban en ocasiones sin ser identificados por serología.

Entre 2004 y 2008, los aislamientos que el LNR no pudo tipificar, fueron solo 11 (0.3%) de los aislamientos estudiados. Pero en 2009 el número de estos aislamientos ascendió, constituyendo el 13 % de los estudiados ese año (58 aislamientos), mientras que en 2010 fue un 29,6 % (209 aislamientos).

Este hallazgo, coincidió con el comienzo del proyecto denominado “MIDAS” (“Models of Infectious Disease Agent Study”), el cual comenzó a desarrollarse en 2009 como una colaboración entre el Departamento Bacteriología del INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán” y un grupo de investigación del Departamento de medicina poblacional de la Universidad de Harvard. En este proyecto se implementó una novedosa herramienta de detección de brotes (programa informático denominado “SaTScan”) utilizando la información de tipificación y resistencia a antimicrobianos de *Shigella* spp. de la base de datos de la Red WHONET Argentina (Stelling y col., 2010). En sus inicios contó con los datos de 7 laboratorios de 3 provincias (Neuquén, Río Negro, La Pampa), y desde enero de 2012, se incorporaron 12 laboratorios de otras 3 provincias (Córdoba, San Luis y Mendoza) (Viñas y col., 2013). Este programa fue utilizado para realizar estudios prospectivos de vigilancia en tiempo real. En el marco de este proyecto, también se detectó un rápido aumento y diseminación de aislamientos de *S. flexneri* “no tipificables”. Entre enero de 2009 y marzo de 2011, los aislamientos de *S. flexneri* “no tipificables” cargados en la base WHONET en el marco del proyecto “MIDAS” constituyeron el 42.3 % del total de aislamientos de *S. flexneri* caracterizados en las tres provincias participantes en el proyecto en su etapa inicial. Estos aislamientos comenzaron a ser enviados al LNR para su caracterización y subtipificación por PFGE.

A raíz de estos eventos, y a fin de contar con una herramienta diagnóstica para identificar al nuevo serotipo emergente en Argentina, el Servicio Antígenos y Antisueros del INPB-ANLIS desarrolló un antisuero policlonal por inoculación en conejos de un cultivo elegido al azar de una de las cepas “no tipificable” tomada como prototipo (cepa N° 479/09). Esta cepa presentaba un patrón de PFGE compartido con otros aislamientos “no tipificables” analizados hasta ese momento. El antisuero denominado “AA479” comenzó a utilizarse en el LNR, posteriormente fue distribuido a los laboratorios incluidos en el proyecto “MIDAS”, y más tarde a toda la Red de Diarreas. En base a estudios posteriores, se determinó que este antisuero detecta el determinante antigénico “E1037” descrito en las cepas denominadas provisionalmente como Xv, Yv y 4v por Sun y col. (Van Der Ploeg y col., 2015; Sun y col., 2012).

Desde el segundo semestre de 2010, el LNR comenzó a usar este antisuero para la serotipificación de *S. flexneri*. Así, durante este año, de 209 aislamientos “no tipificables” con los antisueros de tipo, se analizaron 40 con el nuevo antisuero “AA479, obteniéndose resultados positivos. A estos aislamientos se los comenzó a denominar “**Atípicos AA479**”. En

los subsiguientes años, se continuó identificando aislamientos “Atípicos AA479”: en 2011 mostraron aglutinación positiva para el antisuero “AA479” 190 de un total de 194 “no tipificables”; en 2012 fueron 180 de un total de 187 “no tipificables”; en 2013 y 2014 todos los aislamientos pudieron ser tipificados, dentro de los cuales se identificaron 122 y 109 “Atípicos AA479”, respectivamente.

En este punto vale aclarar, que debido al aumento en la prevalencia de aislamientos “Atípicos AA479” recibidos desde el 2010, con el fin de optimizar los reactivos, se estableció un flujograma de prueba de los antisueros siguiendo la tendencia de prevalencia de serotipos. De este modo se estableció el orden de prueba de cada antisuero hasta obtener un resultado positivo: en primer lugar el antisuero 2, continuando con el antisuero “AA479”, 1, 3, 6, 4 y 5. Por lo tanto, cuando se obtenía aglutinación con el antisuero “AA479”, no se continuaba el test con los subsiguientes antisueros y se definía su tipificación como *S. flexneri* “Atípico AA479”.

A fin de profundizar el estudio de estos aislamientos, se caracterizó fenotípicamente una selección que incluyó 16 *S. flexneri* “Atípicos” junto a tres aislamientos de *S. flexneri* 4, dos de *S. flexneri* X, y tres de *S. flexneri* Y, como cepas de referencia para su comparación, basándonos en los resultados obtenidos por Ye y col., en 2010. Se realizaron pruebas bioquímicas básicas para clasificación de *Shigella* spp. (Edwards y Ewing, 1986) y caracterización serológica con antisueros locales (incluido el “AA479”), comerciales (Denka Seiken, Japón, factores de tipo y grupales) y MASF IV-I (Reagensia AB, Suecia). Entre los 16 aislamientos “Atípicos AA479” estudiados, todas las pruebas arrojaron resultados fenotípicos concordantes con los descritos en aislamientos emergentes en China de los denominados serotipo Xv (15 aislamientos) y 4av (1 aislamiento) (Ye y col., 2010; Sun y col., 2012).

Cabe destacar que en cuanto a la resistencia a los antimicrobianos, los aislamientos Xv identificados en China, presentaban un perfil de multirresistencia, con resistencia a Ampicilina y Acido Nalixídico, Cloranfenicol, Tetraciclina y Trimetoprima/Sulfametoxazol (Ye y col., 2010), sin embargo, en este aspecto según la vigilancia realizada por la Red WHONET, hasta el momento no se observó en los aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos AA479” autóctonos perfiles de multirresistencia inusuales, sino que dichos aislamientos mostraron perfiles habituales en frecuencia y espectro de antimicrobianos de la especie (resistencia a Ampicilina y Trimetoprima/Sulfametoxazol) (Galas y col., 2010).

En 2011, se profundizó la caracterización molecular de aislamientos “Atípicos

AA479”, con estudios realizados durante una pasantía en la Agencia de Protección y Promoción de la Salud de Ontario, Laboratorio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud de Canadá (OAHPP-NIH, Canadá), en colaboración con el Dr. Roberto Melano. Los resultados obtenidos forman parte de este trabajo.

Los eventos antes mencionados a nivel mundial y local en relación a la emergencia de nuevos serotipos de *S. flexneri*, junto a observaciones similares descritas en *S. boydii* (Ansaruzzaman y col., 2005; Grimont y col., 2007) y *S. dysenteriae* (Shmilovitz y col., 1985; Ansaruzzaman y col., 1995; Taludker y col., 2007) en diversas regiones del mundo, motivaron la organización de la “Reunión Internacional de *Shigella*”, llevada a cabo en mayo de 2012, en Buenos Aires. El LNR coordinó su organización junto con el Centro Internacional para la Investigación de Enfermedades Diarreicas, Bangladesh (ICDDR, B) y la OPS-OMS. Participaron 36 profesionales de 14 países, principalmente de Laboratorios de Referencia en Patógenos Bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae*, abarcando expertos en diversas áreas como identificación y caracterización fenotípica y genotípica, desarrollo de vacunas, vigilancia, epidemiología y genómica. Entre los temas de relevancia expuestos y discutidos, se incluyeron la emergencia de aislamientos “Atípicos” en el mundo; caracterización, revisión y actualización de la nomenclatura vigente y herramientas para el diagnóstico molecular, en especial de la especie *S. flexneri*. En relación a este último tópico, se conformó un grupo de trabajo colaborativo con el objetivo de evaluar y validar una PCR múltiple desarrollada y estandarizada por el grupo del National Institute for Communicable Disease Control and Prevention (CDC), China (Sun y col., 2011). Esta PCR puede identificar tanto los serotipos y subserotipos tradicionales descritos en el esquema vigente (Ewing, 1949; Brenner, 1984) como también los determinantes antigénicos encontrados en las variantes emergentes en el mundo en los últimos años y en Argentina (Luo y col., 2012; Sun y col., 2012; Sun y col., 2013; Taludker y col., 2001; Taludker y col., 2002; Taludker y col., 2003; Ye y col., 2010).

El LNR formó parte de este grupo de trabajo como participante y coordinador del proyecto junto al CDC-China, quienes hicieron en los últimos años una gran contribución al estudio y diagnóstico molecular de dichas variantes. A mediados de 2014 se concluyeron las pruebas de validación internacional de esta PCR múltiple de la cual participaron 7 laboratorios internacionales, se analizaron los resultados de 100 muestras ensayadas por PCR (78 cepas de colecciones internacionales y 22 cepas autóctonas seleccionadas por cada laboratorio de su propia colección). Luego se realizó la puesta a punto en el LNR para su

incorporación como técnica de serotipificación molecular. Con su incorporación, pudo obtenerse una caracterización más precisa y en un mayor número de cepas “Atípicas AA479” circulantes en el país según se presenta en este trabajo, con el fin de establecer a que variante pertenecían.

Justificación del proyecto. Impacto e implicancias en las actividades y programas del LNR en Salud Pública.

Por todo lo expuesto en la introducción, queda en evidencia que en Argentina *Shigella* spp. es uno de los principales agentes etiológicos causales de brotes y casos esporádicos de diarreas, siendo el serogrupo predominante *S. flexneri*.

En el LNR se realiza desde 2004 vigilancia epidemiológica molecular en el marco de la Red PulseNet de todos los aislamientos asociados a brotes y una selección de casos esporádicos por PFGE de *Shigella* spp. A fines de 2009 se comenzó a usar un protocolo desarrollado específicamente para *S. flexneri*. Luego, se creó y alojó en el LNR la nueva BDN de perfiles genéticos, pero sin contar con datos retrospectivos de aislamientos circulantes en el país ni con un análisis global de la diversidad genética y diseminación témporo-espacial de clones circulantes en el país, a lo cual las actividades desarrolladas en este trabajo contribuyen. Este marco de análisis retrospectivo tendrá impacto directo en las actividades de vigilancia epidemiológica, para la prevención y control de *S. flexneri*.

Por otra parte, a partir de la emergencia y rápida diseminación de una variante atípica de *S. flexneri*, en el LNR se han realizado ensayos de caracterización fenotípica y genotípica de una selección de estos aislamientos. Sin embargo, no se había logrado completar, hasta ahora, la clasificación de esta variante. Con este fin, se propuso el desarrollo de una pasantía en la OAHPP-NIH de Canadá para realizar un análisis por mapeo de genoma completo. Por último, se propuso la aplicación de un protocolo de PCR para la serotipificación molecular, para conseguir identificar las diversas variantes descriptas en la bibliografía internacional.

En su conjunto, las actividades desarrolladas en el presente trabajo, contribuirán al fortalecimiento de la vigilancia de la shigelosis, así como la clasificación de cepas Atípicas de *S. flexneri*, ambas actividades de relevancia para nuestras funciones como Laboratorio de Referencia Nacional y Centro de Referencia Regional de América del Sur.

***OBJETIVOS
GENERALES
Y
ESPECÍFICOS***

OBJETIVOS GENERALES

Parte 1- Estudiar la diversidad genética y diseminación témporo-espacial de aislamientos de *Shigella flexneri* incorporados en la base de datos de perfiles genéticos de PFGE, incluyendo diferentes serotipos recuperados de casos de diarrea esporádicos y asociados a brote en Argentina, durante el período 2004 – 2014.

Parte 2- Profundizar la caracterización de aislamientos “Atípicos” de *S. flexneri* emergentes en el país, mediante técnicas moleculares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS – Parte 1

1.1- Obtener, analizar e incorporar a la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos de *Shigella flexneri*, los patrones electroforéticos de una selección de aislamientos recuperados de casos de diarrea esporádicos y asociados a brote, de distintos serotipos y regiones geográficas del país, durante el período 2004-2014.

1.2- Realizar dendogramas comparativos de los perfiles genéticos obtenidos para estudiar la diversidad genética y distribución témporo-espacial de los subtipos circulantes identificados de cada serotipo.

1.3- Estudiar la diversidad genética y distribución témporo-espacial de aislamientos estudiados en un contexto de brote.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS - Parte 2

2.1- Profundizar la caracterización molecular de aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos AA479” mediante el estudio de perfiles genéticos por PFGE y mapas de restricción genómico obtenidos por Mapeo de Genoma Completo. Comparar estos mapas de restricción con el mapa creado “*in-silico*” de un aislamiento perteneciente al denominado serotipo Xv identificado en China.

2.2- Completar la caracterización de los aislamientos “Atípicos AA479” de Argentina por serotipificación molecular con PCR múltiple, para identificar en un número mayor de cepas a que variante pertenecen.

2.3- Estudiar la relación genética por PFGE de las variantes identificadas por PCR.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

Parte 1 - Estudio de la diversidad genética y diseminación témporo-espacial de aislamientos de *S. flexneri* incorporados a la Base de datos de perfiles genéticos de PFGE.

1.1 Selección de aislamientos de S. flexneri para su incorporación a la base de datos de perfiles genéticos circulantes en Argentina.

Periodo 2004-2008: Se analizaron retrospectivamente 46 aislamientos antes estudiados con el protocolo para *S. sonnei* (Ribot y col., 2006). La selección incluyó 13 aislamientos asociados a 5 brotes (de entre 7 brotes y 20 aislamientos totales) y 33 de casos esporádicos. La selección incluyó aislamientos de los serotipos 1, 2, 3, 4, 6, Y y “Atípicos AA479” (**Tabla 3**).

Periodo 2009- junio de 2014: desde 2009 se comenzó a utilizar el nuevo protocolo de PFGE para *S. flexneri*, pero aún no se realizaba vigilancia activa, es por eso que la mayor cantidad de aislamientos corridos de ese año corresponden a aislamientos emergentes “Atípicos” (no se disponía aún del antisuero “AA479”), además de aislamientos asociados a brote (11 aislamientos de *S. flexneri* 2), (**Tabla 3**). A partir de 2010 comenzó a analizarse un número mayor de aislamientos. Los criterios de selección para el análisis por PFGE fueron establecidos en el LNR incluyendo el estudio de todos los aislamientos asociados a sospecha de brote y una selección de aislamientos de casos esporádicos de distintas regiones del país y serotipos para contar con diversidad de lugar de aislamiento y serotipos. Se analizó un total de 794 aislamientos remitidos al LNR en este periodo (**Tabla 3**).

En total, se seleccionaron 840 aislamientos de los serotipos 1, 2, 3, 4, 6, Y, X, y Atípicos “AA479” (**Tabla 3**), recuperados entre 2004 y junio de 2014. El origen de los aislamientos fue principalmente de muestras de materia fecal, pero también de fluido vaginal (N= 22), sangre (N= 3) y de orina (N= 1).

Se definió como aislamientos “Atípicos AA479” aquellos que siendo identificados como *S. flexneri* por pruebas bioquímicas y aglutinación con el antisuero polivalente OshB, mostraron también reacción positiva con el antisuero “AA479”. Una selección de estos aislamientos fueron estudiados posteriormente por PCR para ampliar su caracterización, estos resultados se muestran más adelante en la **Sección 2.2 de la Parte 2** de este trabajo.

Tabla 3: Número de aislamientos ingresados a la Base de Datos de perfiles genéticos de PFGE de *S. flexneri*.

Serotipo	Esporádicos (E)		2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total Serotipo	%
	Brote (B)														
<i>S. flexneri</i> 1	E		1		3			1	12	17	20	35	19	108	12,9%
	B														
<i>S. flexneri</i> 2	E		3	6		1		21	52	21	58	58	35	285	33,9%
	B				3		1	11		2	5 ⁽¹⁾	2 ⁽¹⁾	6		
<i>S. flexneri</i> 3	E			1	3		1	1	18	21	14	15	4	87	10,4%
	B			3			2					4 ⁽²⁾			
<i>S. flexneri</i> 4	E			1	1				1					3	0,3%
	B														
<i>S. flexneri</i> 6	E		2	1					2	4	10	8	2	33	3,9%
	B					4									
<i>S. flexneri</i> X	E							1	3		2	2	1	9	1,1%
	B														
<i>S. flexneri</i> Y	E						1	1	2	1	5	11	1	25	3,0%
	B												3		
<i>S. flexneri</i> "Atípicas"	E		0	1	2	2	3	28	48	45	61	59	24	290	34,5%
	B									4		9 ⁽²⁾	4		
<i>Total Año</i>			6	13	12	7	8	64	138	115	170	188	99	840	100,0%

Se distinguen los aislamientos recuperados de casos esporádicos (E) y de casos asociados a brote (B), por año de aislamiento y serotipo identificado.

(1) Aislamientos asociados a un mismo brote extendido en el tiempo.

(2) Incluye aislamientos asociados a dos brotes distintos.

1.2 Subtipificación molecular por PFGE

Los perfiles genéticos se obtuvieron utilizando el protocolo estandarizado y validado para *S. flexneri* de la Red PN Internacional (Pichel y col., 2012). A continuación, se detallan brevemente los pasos principales del protocolo (**Figura 3**).

Suspensión celular

Se preparó cada suspensión celular en un tubo “*eppendorf*” con 1 ml de buffer de suspensión celular (BSC: Tris 100 mM: EDTA 100 mM, pH 8) tomando parte del crecimiento de la placa de agar con un hisopo humedecido en BSC girando suavemente para que las células se dispersen en forma homogénea y se minimice la formación de aerosoles. Se ajustó la concentración de cada suspensión celular en espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm. para llegar a una densidad óptica (absorbancia) de 1, ya sea diluyendo con BSC o agregando células adicionales para un volumen final de 200µl.

Bloques de agarosa y Lisis enzimática

Se adicionó a los 200 µl de cada suspensión celular, 20 µl de Proteinasa K (20mg/ml) y a continuación 200 µl de agarosa fundida al 1% (SeaKem Gold, Lonza, USA) en TE 1X (Tris 10 mM: EDTA 1 mM, pH 8). Inmediatamente se distribuyó parte de la mezcla en un pocillo de un molde reutilizable (**Figura 3**). Se dejó solidificar a temperatura ambiente por 10 min. Se sumergió cada bloque de agarosa en un tubo plástico rotulado con 5 ml de buffer de lisis celular (Tris 50 mM: EDTA 50 mM, pH 8 + Sarcosyl 1%) y 25 µl de Proteinasa K (20mg/ml). Se incubaron los tubos en un baño termostático a 54°C con agitación constante por 2 horas. Luego se realizaron 2 lavados con agua calidad molecular estéril para eliminar los detritos celulares, y 4 lavados con TE 1X cada 10 min. Se conservó cada bloque de agarosa conteniendo el ADN genómico en un tubo individual rotulado con TE 1X a 4°C hasta realizar la restricción enzimática. Además, se conservó cada cultivo en freezer a -80°C en caldo Tripticasa Soya y glicerol al 20% para poder realizar futuros ensayos de ser necesario (por ej. PCR).

Digestión enzimática del ADN genómico

Se colocó una porción del bloque de agarosa de aprox. 2 mm en un tubo plástico de 1.5 ml. Se agregaron 200 µl de la mezcla de restricción: buffer de la enzima en concentración final 1X, 30 U/muestra de la enzima de restricción y agua calidad molecular c.s.p. 200 µl. Las

enzimas de restricción usadas para la digestión del ADN fueron: *NotI* (Fermentas, Termo Scientific, Lituania; o Invitrogen, Life Technologies, USA) como primaria y *XbaI* (Fermentas, Termo Scientific, Lituania) como secundaria para confirmar la relación genética, principalmente en casos asociados a brotes. Se utilizó como cepa estándar para la normalización de patrones con el programa BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica, la cepa patrón utilizada en los protocolos de PFGE de PulseNet Internacional *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 (Ribot y col., 2006) cuyo ADN fue digerido siempre con la enzima *XbaI* (Fermentas, Termo Scientific, Lituania) de acuerdo al protocolo estandarizado de la Red PN. Se incubó a 37°C por 4 horas, (**Figura 3**).

Gel de Agarosa

Se eliminó la mezcla de restricción y se colocaron los bloques de agarosa en cada diente del peine para geles de 10 o 15 calles, donde se colocaron 3 o 4 cepas estándar, respectivamente, para la posterior normalización del gel en el BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Se agregó la agarosa fundida al 1% (SeaKem Gold, Lonza, USA) disuelta en buffer Tris-Borato EDTA (TBE) 0.5X (100 ml en un gel de 10 calles, 150 ml en un gel de 15 calles). Se dejó solidificar antes de colocar el gel en la cuba electroforética conteniendo 2200 ml de buffer TBE 0.5X, (**Figura 3**).

Corrida electroforética

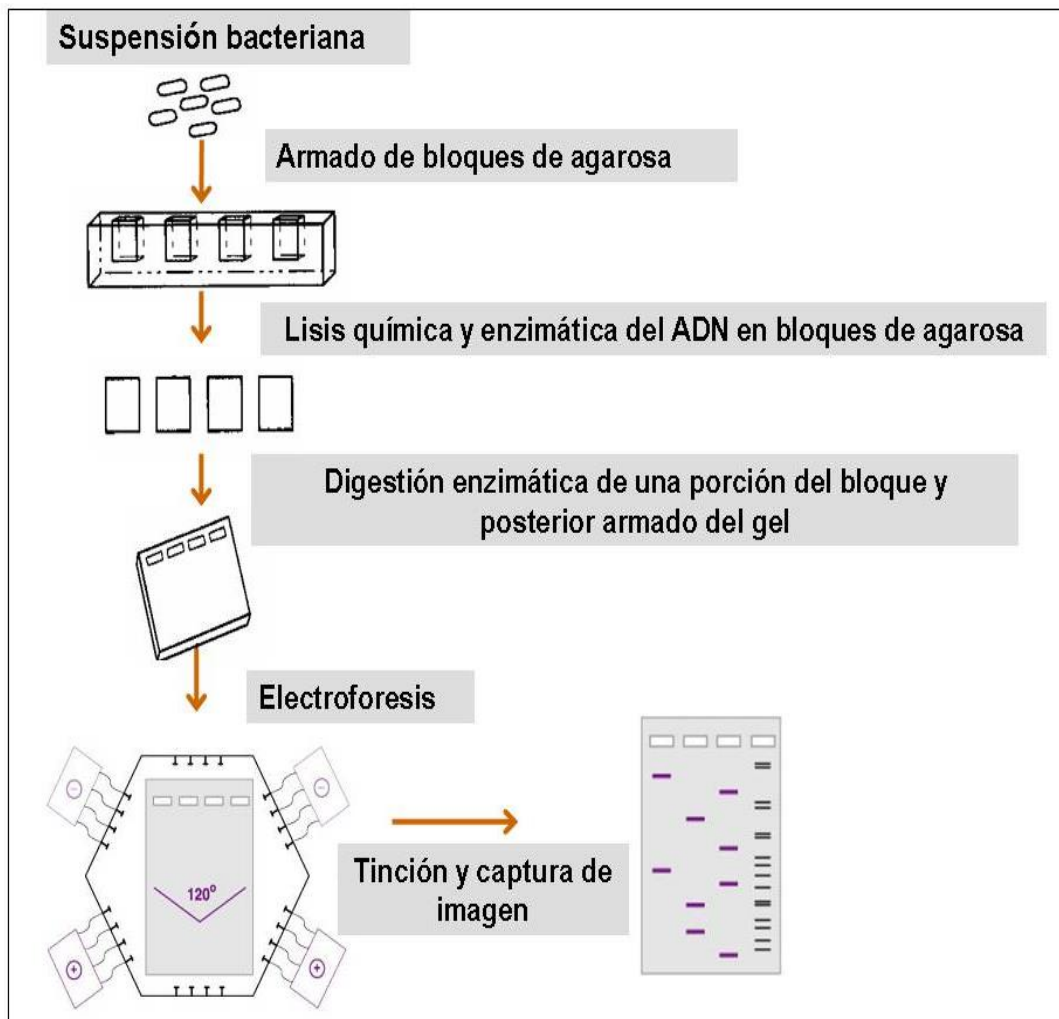
La corrida electroforética se realizó en un equipo CHEF DRIII System (BioRad Laboratories, Hercules, California, USA) bajo las siguientes condiciones: tiempo de pulso inicial de 5 seg., tiempo de pulso final de 35 seg., voltaje de 6, ángulo de 120°, tiempo de corrida de 17 o 18 h. (gel de 10 calles y de 15 calles, respectivamente), módulo de enfriamiento a 14°C y la bomba fija en 70 para un flujo de 1 L/minuto, (**Figura 3**).

Tinción y captura de imagen

La tinción del gel se realizó con una solución de Bromuro de Etidio (Invitrogen, Life Technologies, USA) diluyendo 100 µl de la solución concentrada (10 mg/ml) en 1000 ml de agua destilada o en una solución de Gel Red (Biotium, USA) diluyendo 80 µl y 3,4 g NaCl en 400 ml de agua destilada (**Figura 3**).

La imagen se capturó con el Gel-Doc System (BioRad, Hercules, California, USA) mediante el programa Quantity One v.4.5.1 de BioRad Laboratories. Se guardó la imagen del gel como archivo *.tiff para su análisis con el programa BioNumerics (**Figura 3**).

Figura 3: Esquema del protocolo de PFGE para *S. flexneri*



1.3 Base de datos y normalización de los geles contra un perfil estándar

Se creó una nueva base de datos denominada “*Shigella flexneri*” con el programa BioNumerics v. 4.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Hasta el 2014, se utilizó en esta base de datos un marco de análisis o “script” provisorio (este marco aporta una corrida “patrón” de la cepa estándar de referencia para la normalización de los geles de PFGE) desarrollado por CDC, USA. Para el ingreso de los geles de PFGE a la base de datos se cargó cada imagen *.tiff y antes de analizar cada perfil electroforético se realizó una etapa de normalización en la cual se alinea cada banda de la cepa patrón incluida en varias posiciones en el gel con el Estándar Global de la BDN (Hunter y col., 2005) (**Figura 4**). El script específico, constituye el Estándar Global y determina de qué forma debe correr la cepa estándar bajo las condiciones establecidas por cada protocolo. En 2014, se actualizó la versión

del BioNumerics a v5.1 y se recibió un nuevo “script” con modificaciones en algunas de las bandas de la cepa estándar consideradas para la normalización, respecto al utilizado hasta el momento. Por este motivo, todas las imágenes *tiff que habían sido cargadas hasta el momento, debieron ser reingresadas a la base de datos y normalizadas contra el nuevo Estándar Global, así, los perfiles de PFGE fueron verificados con este nuevo marco de análisis.

Figura 4: Normalización de un gel de PFGE en BioNumerics previo al análisis de los perfiles electroforéticos.



La cepa utilizada como patrón, *Salmonella entérica* serovar Braenderup H9812 (calles 1, 5, 10 y 15) se alinea con el Estándar Global de la BDN (bandas de la izquierda con sus respectivos pesos moleculares). **Arriba:** previo a la normalización. **Abajo:** posterior a la normalización, las líneas celestes y amarillas a lo largo de cada calle indican una adecuada normalización del gel, en este caso, la intensidad de los colores es tenue debido a una correcta normalización.

1.4 Ingreso de los perfiles genéticos y análisis de relación genética

Una vez normalizada la imagen de cada gel, se marcaron las bandas de cada perfil. Luego, se ingresaron los datos epidemiológicos disponibles: fecha de aislamiento, origen de la muestra, serotipo, provincia, ciudad, etc. El análisis de relación genética se realizó por medio de dendogramas utilizando el coeficiente de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA con tolerancia en la posición de bandas y optimización del 1,5%. A cada perfil de bandas distinto, se le asignó un código de patrón siguiendo los lineamientos de la Red PN con el siguiente formato: por ej. ARJZXN11.0001 donde AR= Argentina, JZX= *Shigella flexneri*, N11= *NotI* o X01= *XbaI*, 0001= número consecutivo asignado a cada perfil de bandas determinado.

Del mismo modo, en el caso de aislamientos asociados a brote, una vez que el mismo fue confirmado tanto epidemiológicamente como por PFGE, se asignó un código, siguiendo la siguiente denominación: por ej. **ARIM1307NEJZX-1O** donde ARIM= Argentina Instituto Malbrán, 1307= brote ocurrido en julio de 2013, NE= provincia de Neuquén, JZX= *Shigella flexneri*, 1O = primer brote del 2013 (“Outbreak”).

Por último, para establecer un parámetro de la diversidad genética del serogrupo y de cada serotipo, se calculó un índice (I) dividiendo el total de aislamientos de un determinado serotipo por la cantidad de perfiles de PFGE distintos encontrados dentro del mismo. Así, un I igual a 1 muestra que todos los aislamientos mostraron perfiles genéticos diferentes y un I igual a 100 que todos los aislamientos mostraron idénticos perfiles.

Parte 2 - Caracterización molecular de una selección de aislamientos “Atípicos” de *S. flexneri*

2.1 Comparación de genomas por PFGE y Mapeo de Genoma Completo (“Whole Genome Mapping” o WGM)

Los perfiles genéticos de los aislamientos “Atípicos” por PFGE se obtuvieron siguiendo el protocolo estandarizado para *S. flexneri* (Pichel y col., 2012) como se detalló en el punto **1.2 de Materiales y Métodos**. El análisis y dendogramas se realizaron como se detalló en los puntos **1.3 y 1.4 de Materiales y Métodos**.

Los estudios de Mapeo de Genoma Completo, se llevaron a cabo durante una pasantía realizada en la OAHPP-NIH, Canadá, en junio de 2011, en colaboración con el Dr. Roberto Melano.

Aislamientos

Para estos estudios, se seleccionaron 4 cepas de *S. flexneri* de Argentina: un aislamiento de serotipo X (Nº 730/09), un aislamiento de serotipo 4a (Nº 1944/06) y dos aislamientos “Atípicos AA479” (Nº 479/06 y 79/10). Todos ellos, habían sido analizados en un estudio preliminar cuando se comenzaron a detectar los aislamientos “Atípicos” (ver sección *Introducción, Emergencia de aislamientos de S. flexneri “Atípicos” en Argentina– Resultados preliminares*). Los aislamientos “Atípicos” habían sido caracterizados por serología como: *S. flexneri* X y *S. flexneri* 4 y además positivos para “AA479” y MASF IV-I (cepas Nº479/09 y 79/10, respectivamente), concordante con los serotipos Xv y 4av postulados en la bibliografía (**Tabla 4**).

Además, se utilizó la secuencia genómica de la cepa *S. flexneri* Xv 2002017 (número de acceso de GenBank CP001383) perteneciente a un aislamiento de China para la obtención del mapa de genoma completo in-sílico.

Tabla 4: Aislamientos seleccionados para el estudio por Mapeo de Genoma Completo (WGM).

Cepa	Año	Lugar	Resultados de serología							Serotipo
			1, 2, 3, 5, 6, FG6 (INPB)	4 (INPB)	IV (DS)	FG 3,4 (INPB/DS)	FG 7,8 (INPB/DS)	"AA479" (INPB)	MASF IV-1 "E1037" (Reagensia)	
1944/06	2006	CABA	-	+	+	+	-	-	-	<i>S. flexneri</i> 4a
79/10	2009	Jujuy	-	+	+	-	-	+	+	<i>S. flexneri</i> "Atípica AA479" (concordante con "4av")
730/09	2009	Río Negro	-	-	-	-	+	-	-	<i>S. flexneri</i> X
479/09	2009	Neuquén	-	-	+	-	+	+	+	<i>S. flexneri</i> "Atípica AA479" (concordante con "Xv")

FG = antisuero de factor grupal; **DS** = antisuero monovalentes comercial marca Denka Seiken, Japón; **INPB** = antisuero monovalente producido por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos; **MASF IV- I** = antisuero monoclonal que detecta el determinante antigénico "E1037" presente en aislamientos 4av, Yv y Xv.

Mapeo de Genoma Completo (WGM , “Whole Genome Mapping”)

Estos estudios se realizaron con los insumos provistos por la OAHPP-NIH, Canadá y los procedimientos establecidos por OpGen inc., USA.

Por medio de esta tecnología, el ADN obtenido por lisis celular conforma una librería de fragmentos mayores a 200 kb, los cuales se capturan en canales formados entre una superficie fluida de agarosa y una lámina de vidrio cargada positivamente. El ADN se siembra para llenar los canales por capilaridad (**Figura 5, B**). Debido a la interacción electrostática entre las cargas positiva y negativa del vidrio y las moléculas, el ADN se inmoviliza y adopta una conformación elongada, dejándolo accesible para la restricción enzimática.

Los Mapas de Restricción de Moléculas Únicas “SMRMs” se obtienen con una digestión enzimática in-situ tras lo cual se registran y miden los fragmentos derivados con un microscopio de fluorescencia automatizado (“Optical Mapper”), los sitios de corte se identifican como “gaps” debido a que las hebras de ADN al cortarse se retraen. Con esta información, el “Optical Mapper” podrá ensamblar todos los “SMRMs” hasta lograr circularizar un mapa consenso (“Optical Map”) del genoma completo (<http://opgen.com/Stories/what-is-whole-genome-mapping>), (**Figura 6, Figura 7**).

Los pasos de este procedimiento se detallan a continuación:

Extracción de ADN

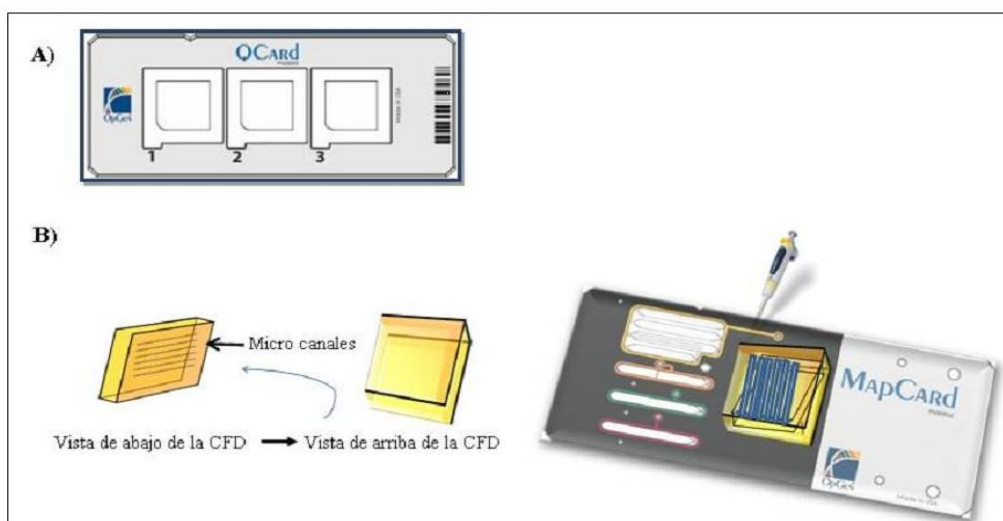
Se realizó la extracción del ADN bacteriano utilizando el kit comercial Argus™ HMW DNA Isolation Kit (OpGen inc., USA). Brevemente, a partir de una colonia pequeña (~2mm) suspendida en 500 µl de buffer de lavado celular (Argus™ HMW DNA Isolation Kit, OpGen inc., USA), se centrifugó a 5000g x 5 min. a T° amb. El pellet obtenido se resuspendió en 100 µl de buffer de aislamiento (Argus™ HMW DNA Isolation Kit, OpGen inc., USA) y se mezcló por inversión muy suavemente para resuspender las células. Se incubó a 56 °C x 30 min. hasta que se aclaró la solución y se centrifugó a 5000g x 5 min. a T° amb. Se obtuvo en el sobrenadante el ADN “stock”, el cual fue diluido con buffer de dilución (Argus™ HMW DNA Isolation Kit, OpGen inc., USA) en 3 proporciones (1:5, 1:10, 1:20) y refrigerado a (4-8) °C por 18 hs. Fue importante minimizar la ruptura mecánica del ADN mediante pipeteo con puntas de pipeta de orificio ancho, ya que lo deseado eran fragmentos de ADN mayores a 200kb.

Control de calidad y sembrado del ADN en la tarjeta óptica

Una vez obtenido el ADN stock y sus diluciones, se realizó un control de la calidad de los fragmentos para asegurar óptimos resultados al continuar con el procedimiento. Para ello, se ensambló la tarjeta óptica “Q Card” (Argus™ Q Card Kit, OpGen inc., USA), (**Figura 5A**) colocando la superficie de vidrio (Argus™ Surface, OpGen inc., USA) y la superficie fluida formadora de canales “CFD” (“Channel Forming Device”, Argus™ Map Card II Kit for Microbial, OpGen inc., USA). Se sembraron 2,5 μ l de ADN (“stock”), el cual llenó los canales paralelos del CFD (**Figura 5B, izq**) por capilaridad, quedando capturado, inmovilizado y linear. Se retiró la CFD y se adicionaron 125 μ l del colorante intercalante de ADN JOJO-1 (Argus™ Stain Kit, OpGen, USA). Se visualizó la muestra colocando la tarjeta con aceite de inmersión en el “Optical Mapper” (Argus Optical Mapping System, OpGen Inc, USA), (**Figura 6**). Se observó visualmente tanto el largo de los fragmentos como su cantidad. Una muestra de calidad aceptable para continuar con el protocolo consiste en fragmentos mayores a 200 kb y en una concentración de aproximadamente 10 moléculas por cuadro. En este último caso se procedía con una nueva “Q-Card” usando una dilución del ADN stock.

La tarjeta óptica o “Map Card” se ensambló de igual modo que tarjeta de calidad, colocando la “CFD” y sembrando 2,5 μ l de ADN (**Figura 5B, derecha**).

Figura 5: Mapeo de Genoma Completo: tarjeta de control de calidad del ADN y siembra del ADN en la tarjeta óptica.



- A)** El control de calidad del ADN se realiza en una tarjeta (Q Card) que consta de 3 posiciones, en este paso, se selecciona la concentración óptima para continuar con el procedimiento. **B)** En esta tarjeta óptica “MapCard” se ensambla la superficie formadora de canales “CFD” donde se deposita el ADN por capilaridad, se retira la “CFD” y se cubre el ADN con un cubreobjetos, quedando preparada para la restricción enzimática.

Digestión enzimática del ADN genómico

Se seleccionó la enzima de restricción con el programa “Argus Enzyme Chooser” (OpGen Inc, USA). Este programa realiza digestiones virtuales sobre secuencias de referencia, y selecciona aquellas enzimas que generen un tamaño de fragmentos promedio de entre 6 y 12 kb y un tamaño máximo menor a 80 kb. En este caso se usaron las secuencias genómicas de *S. flexneri* disponibles en GenBank: *S. flexneri* 2a str, 2457T; *S. flexneri* 2a str, 301; *S. flexneri* 5 str, 8401). Las enzimas recomendadas fueron *AflIII* y *NcoI*, se utilizó esta última dada su disponibilidad en el laboratorio.

Se realizó la restricción enzimática insertando la tarjeta óptica con el ADN en el procesador (**Figura 6**), se cargaron los reactivos en la tarjeta: 250 µl de Buffer de reacción (220 µl de agua, 25 µl buffer de enzima, 2,5 µl BSA y 2,5 µl Tritón X-100); 250 µl de solución de enzima (265 µl agua, 25 µl buffer de enzima, 2,5 µl BSA, 2,5 µl Tritón X-100 y 5 µl de enzima *NcoI*)(Argus™ Enzyme Kit *NcoI*, OpGen inc., USA); 250 µl del colorante intercalante JOJO-1 y 600 µl de Antifide (protector del colorante JOJO-1); (Argus™ Stain Kit, OpGen, USA) para la tinción de los fragmentos de ADN genómico obtenidos.

Procesamiento de los fragmentos de ADN para obtener el mapa de restricción genómico

Luego de la digestión enzimática, se colocó aceite de inmersión en la tarjeta óptica antes de ubicarla en el equipo “*Optical Mapper*” (Argus Optical Mapping System, OpGen Inc, USA), (**Figura 6**). Se señaló el primer y último canal para indicarle al equipo donde sacar las fotografías. El equipo obtuvo las imágenes de los “*SMRMs*” por microscopía de fluorescencia, estas fueron procesadas automáticamente usando su propio programa de adquisición de imágenes (OpGen Inc.), el cual detecta los sitios de corte y calcula el tamaño de los fragmentos resultantes de la restricción usando un algoritmo de conversión de unidad de imagen digital (píxel) a kilobases (**Figura 7**).

Los “*SMRMs*” solapantes entre sí fueron alineados y ensamblados en un genoma consenso por un programa propio bajo parámetros preestablecidos (Argus Assembly software, OpGen inc., USA). Dado que con estos parámetros, no se conseguía la circularización del genoma completo, se modificó de 12 a 10 el parámetro de cantidad de sitios de restricción requeridos para incluir a una molécula de ADN en el análisis (se bajó 2 unidades para que fuesen incluidas mayor cantidad de moléculas, ya que algunos genomas no lograban circularizar por falta de información al ser el valor preestablecido más restrictivo (**Figura 7**).

Por último, utilizando el programa “*Map Solver*”, se compararon los mapas genómicos obtenidos de cada aislamiento para obtener un dendograma de similitud genética mediante el

método UPGMA

También se compararon los mapas genómicos de los aislamientos de Argentina con el mapa óptico “in-sílico” generado con el programa “Map Solver” (OpGen Inc., USA) a partir de la secuencia publicada en GenBank del aislamiento *Shigella flexneri* Xv (N°2002017) de origen chino (NCBI CP001383).

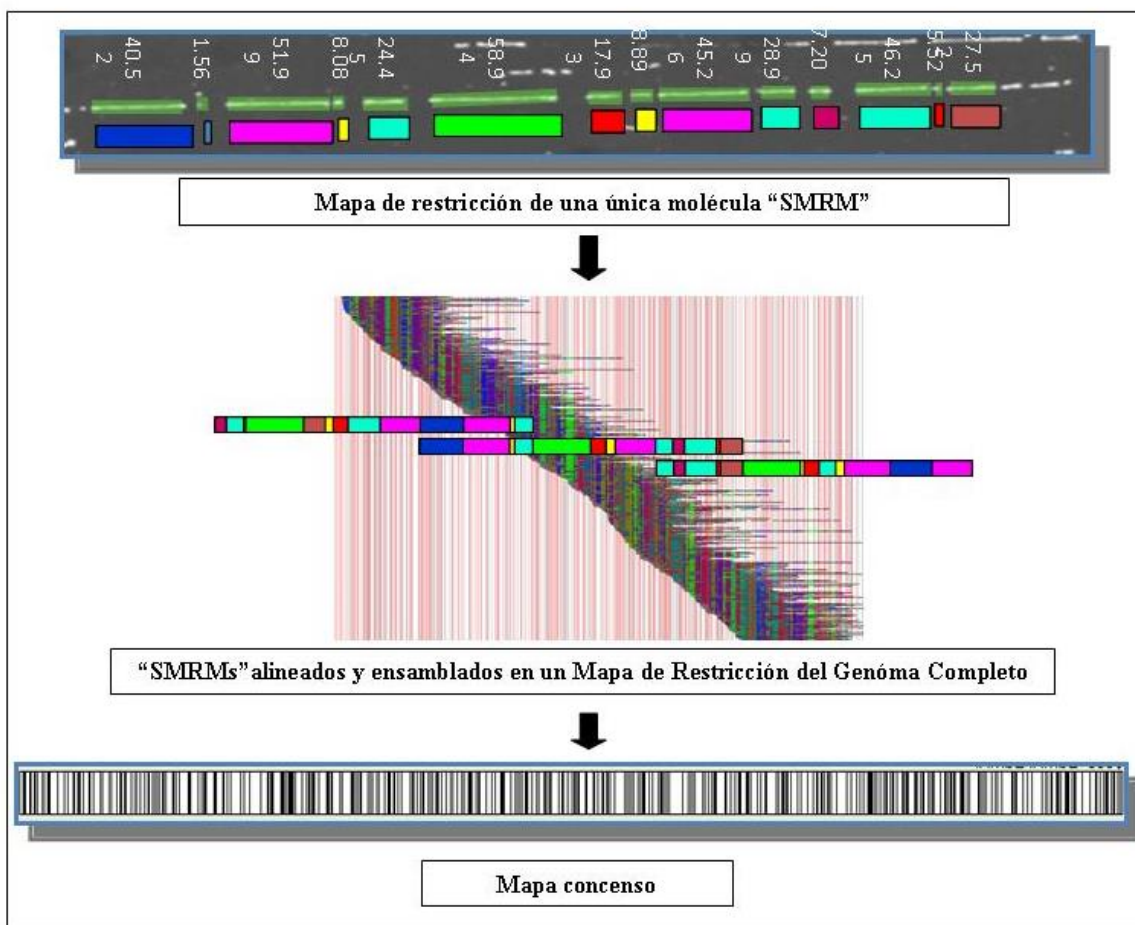
Figura 6: Equipamiento para el Mapeo de Genoma Completo.



Equipamiento del “Argus Optical Mapping System”, OpGen Inc, USA

Arriba: procesador para la digestión enzimática. **Medio:** imagen de los fragmentos de ADN luego de la digestión enzimática y tinción. **Abajo a la izquierda:** equipo para colocar aceite de inmersión en la tarjeta óptica; **Abajo a la derecha:** tarjeta óptica colocada en una de las tres posiciones disponibles en el “Optical Mapper” (Argus Optical Mapping System, OpGen Inc, USA).

Figura 7: Mapeo de Genoma Completo: procesamiento de los fragmentos de ADN obtenidos de la restricción enzimática.



Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia son analizadas por un programa de adquisición de imágenes que obtiene el tamaño de los fragmentos dentro de cada Mapa de Restricción de Moléculas Únicas o "SMRMs". El programa de ensamblaje alinea y ensambla los "SMRMs" en un genoma consenso.

2.2 Serotipificación molecular por PCR múltiple

Aislamientos

Se analizaron por PCR 79 aislamientos de *Shigella flexneri* "Atípicos" positivos para el antisero "AA479" remitidos al LNR entre 2005 y 2014 (**Tabla 5**). Estos aislamientos fueron seleccionados abarcando distintos perfiles de PFGE con al menos un aislamiento representativo de cada de cada ciudad donde se identificó al menos un caso "Atípico AA479" y también de cada brote estudiado de dichos aislamientos. De los patrones de PFGE mayoritarios, se analizó más de un aislamiento en caso de haber de distintas ciudades y años.

Tabla 5: Aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos AA479” estudiados por PFGE y PCR.

Serotipo		2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Total 2005-2014
<i>S. flexneri</i> "Atípica AA479"	PFGE	1	2	2	3	28	48	49	61	68	28	290
	PCR	1	2	2	2	4	12	12	16	18	10	79

Protocolo de PCR

Para complementar los resultados obtenidos por serotipificación tradicional (aglutinación en placa), se implementó un protocolo de PCR para determinar la presencia de genes involucrados en la biosíntesis de los antígenos somáticos específicos de serotipo en *S. flexneri*. El protocolo utilizado corresponde a una adaptación del método publicado por Sun y col. en 2011, posteriormente complementado por el mismo grupo en 2012, con el diseño de cebadores específicos para la detección del gen plasmídico *opt*. (Sun y col., 2011; Sun y col., 2012). Las secuencias específicas de los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 6**. El protocolo original desarrollado por Sun y col, fue sometido a evaluación y validación internacional como ya se detalló (**Introducción, pág. 27**). Si bien se obtuvo una muy buena correlación entre los resultados de la serotipificación fenotípica y genotípica por PCR, se identificaron algunas cuestiones a considerar en el protocolo, por lo que para la puesta a punto en nuestro laboratorio se realizaron modificaciones detalladas más adelante en la sección “**Amplificación de secuencias específicas**”.

Extracción de ADN

Los templados de ADN se prepararon por el método de hervido, a partir de cultivos puros crecidos en LB agar o TSA, 18 h., a 37°C. Se tomaron 2 a 3 colonias y se suspendieron en 100 µl de agua calidad molecular, se hirvió la solución durante 10 minutos a 100°C, se dejó enfriar por 5 min. y se centrifugó 10 min. a 13.000 g y 4°C. Se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo.

Amplificación de secuencias específicas

Se realizaron tres modificaciones principales respecto al método original: por un lado se separó a 2 de los genes (*gtrX* y *gtrIC*) en una segunda reacción (PCR2) a la que se le sumó el gen *opt* que no estaba incluido previamente; se aumentó la concentración final de los cebadores de este último gen; y por último se puso a punto la PCR1 con una marca comercial alternativa y más económica de mezcla de reacción y la PCR2 con taq polimerasa recombinante.

Estos cambios se debieron a que en los estudios de validación internacional del protocolo se observó que los productos de los genes *gtrI* y *opt* migraban en posiciones similares, 1122 y 1098 pb, respectivamente, lo cual en ocasiones dificultaba la lectura pudiendo confundir a los serotipos 1d y Xv (positivo para *gtrI* y *gtrX*; y positivo para *opt* y *gtrX*, respectivamente). Además, un laboratorio reportó obtener resultados negativos del gen *opt* en la reacción múltiple y resultado positivo si se realizaba reacción simple solo para este gen. Este mismo inconveniente surgió en nuestro laboratorio cuando se hicieron pruebas utilizando otra marca comercial de mezcla de reacción, distinta de la utilizada en el método original y en la validación (Quiagen), la cual resultaba muy onerosa para ser implementada en la rutina. Así, se puso a punto la segunda reacción (PCR2) incluyendo a los 3 genes de factores grupales: *gtrX*, *gtr1C* y *opt*, con una concentración final de este último aumentada y utilizando taq polimerasa recombinante (**Tabla 6**).

Para la **PCR 1**, se usó una mezcla de reacción comercial lista para usar (Kapa 2GFast Multiplex Mix PCR Kit, Biosystems). En volumen final de 25µl y concentración final de 1X conteniendo 1U de Taq polimerasa Hot Start, 0,2 mM de desoxinucleótidos y 3,0 mM de Cl₂Mg₂. Todos los cebadores de reacción se usaron en concentración final de 0,2 µM (**Tabla 6**) a partir de una mezcla con una concentración de 2 µM. Se agregaron 3 µl de templado. El protocolo de amplificación común a todas las PCR, de acuerdo a las recomendaciones del proveedor, tuvo las siguientes condiciones: 3 min. de desnaturalización a 95°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización de 15 seg. a 95°C, 30 seg. de apareamiento a 60°C y una extensión de 60 seg. a 72°C.

Para la **PCR 2**, se usaron 2,5U por reacción de Taq Polimerasa recombinante (Invitrogen o Fermentas) junto a su buffer en concentración final 1X y Cl₂Mg₂ en concentración final de 1,5 mM, desoxinucleótidos en concentración final de 0,2 mM, cebadores específicos para los genes *gtrX* y *gtr1C* en concentración final de 0,2 µM y cebador para el gen *opt-O* en 0,4 µM (**Tabla 6**) a partir de una mezcla con 2 mM (*gtrX* y *gtr1C*) y 4 µM (*opt*), se agregaron 3 µl de templado y agua calidad molecular para un volumen final de reacción de 25 µl. El protocolo de amplificación tuvo las siguientes condiciones: 3 min. de desnaturalización a 95°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización de 45 seg. a 94°C, 30 seg. de apareamiento a 55°C, una extensión de 90 seg. a 72°C, y una extensión final de 10 min. a 72°C.

PCR simple para el serotipo 6

Cuando no hubo amplificación para ninguno de los genes, incluso el gen *wzx*₁₋₅, se ensayó la PCR simple con cebadores específicos para el serotipo 6. Se usaron 2U por reacción de Taq Polimerasa recombinante junto a su buffer en concentración final 1X y Cl₂Mg₂ en concentración final de 1,5 mM, desoxinucleótidos en concentración final de 0,2 mM (**Tabla 6**), cebadores específicos para el gen *wzx*₆ en concentración final de 0,2 μM, 3 μl de templado y agua calidad molecular para un volumen final de reacción de 25 μl. La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones de ciclado: 3min. de desnaturalización a 95°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización de 45 seg. a 94°C, 30 seg. de apareamiento a 55°C, una extensión de 90 seg. a 72°C, y una extensión final de 10 min. a 72°C.

Tabla 6: Condiciones y concentraciones de los cebadores específicos de la PCR para los serotipos de *S. flexneri*.

PCR 1						
Gen target	Amplicón (pb)	cc. final	Especificidad de serotipo	O	Secuencia de cebadores (5´-3´)	Referencia
<i>wzx</i> ₁₋₅	782	0,2 μM	1 a 5, X, Y, Xv, Yv, 4av	F	CACTTGTTGGGTATGCTGG	Li y col., 2009
				R	CCGGCAAACAGATTAGAAA	
<i>gtrI</i>	1122	0,2 μM	1a, 1b, 1c	F	CTGTTAGGTGATGATGGCTTAG	Sun y col., 2011
				R	ATTGAACGCCTCCTTGCTATGC	
<i>gtrII</i>	1272	0,2 μM	2a, 2b	F	ATTTATTGTTATTGGGGTGGTGTG	Sun y col., 2011
				R	ATTTGTTCTTTATTTGCTGGTT	
<i>oac</i>	604	0,2 μM	1b, 3a, 3b, 4b	F	CTGTTCCGGCTTTGAAAGTGCTG	Sun y col., 2011
				R	CGTAGGCGTACATAGCAAAGCAAAGA	
<i>gtrIV</i>	378	0,2 μM	4a, 4b, 4av	F	ATGTTCCCTCCTTCTTCCTTT	Sun y col., 2011
				R	TCCTGATGCTACCTTATCCA	
<i>gtrV</i>	905	0,2 μM	5a, 5b	F	AATACGATTCTCCTGGTGCTAAAC	Sun y col., 2011
				R	TAGGGCATTGCTTGTATCTTTTCAT	
PCR 2						
<i>gtrX</i>	425	0,2 μM	2b, 3a, 5b, X, Xv	F	AATGCTGGATGGGATAATCACCTT	Sun y col., 2011
				R	GAGACGGCTTCTCCATGTTTTGCT	
<i>gtrIC</i>	518	0,2 μM	1c	F	AGGGAATGGCATTAGGGATCGG	Sun y col., 2011
				R	GCTGCAAGTGGTTTTTGTGGA	
<i>opt</i>	1098	0,4 μM	Xv, Yv, 4av	F	ATCTAGTATTGTTGGCGTTA	Sun y co., 2012
				R	CCTTTTCTTGTTGTTCTTATC	
PCR simple (serotipo 6)						
<i>wzx</i> ₆	739	0,2 μM	6	F	TTAAGAGCGATCATTTC	Li y col., 2009
				R	CCATCCAAGCGGACATT	

La PCR desarrollada por Sun y col., 2011 fue modificada separando algunos genes específicos de factores grupales en una segunda reacción (**PCR2**) y aumentando la concentración de los cebadores del gen *opt*.

cc.final= concentración de los cebadores en la reacción final, **O**= orientación de los cebadores, **F**= secuencia del cebador “forward”, **R**= secuencia del cebador “reverse”.

Corrida electroforética, tinción y fotodocumentación:

Los amplicones se sembraron en gel de agarosa al 1.5% en Buffer Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE, 40 mM, EDTA 1 mM). Una vez disuelta la agarosa, se agregaron 8 µl de Syber Safe (Invitrogen, Life Technologies, USA) en 100 ml de agarosa. Se agregó a cada tubo de reacción loading buffer en concentración final 1X y se sembraron 5 µl para la PCR 1 y 10 µl para la PCR 2 y PCR simple. Se hizo la corrida electroforética a 100V durante 40 min. Se capturó la imagen con el fotodocumentador Gel Doc System (BioRad, Hercules, California, USA).

Cepas control

En la **Tabla 7** se muestran las cepas control utilizadas en las 3 reacciones de amplificación realizadas, las cuales cubren todos los genes involucrados. Como control negativo de la reacción, se agregó un tubo extra con la mezcla de reacción sin templado de ADN.

Tabla 7: Cepas control utilizadas para las PCR múltiples de serotipos de *S. flexneri*.

Cepa	Genes	Tamaño del amplicón (pb)
PCR múltiple 1 (<i>wzx</i>₁₋₅, <i>gtrI</i>, <i>gtrII</i>, <i>oac</i>, <i>gtrIV</i>, <i>gtrV</i>)		
<i>S. flexneri</i> 1b	<i>gtrI</i> , <i>wzx</i> ₁₋₅ , <i>oac</i>	1122, 782, 604
<i>S. flexneri</i> 2b	<i>gtrII</i> , <i>wzx</i> ₁₋₅ , <i>gtrX</i>	1272, 782, 425
<i>S. flexneri</i> 4b	<i>wzx</i> ₁₋₅ , <i>oac</i> , <i>gtrIV</i>	782, 604, 378
<i>S. flexneri</i> 5a	<i>gtrV</i> , <i>wzx</i> ₁₋₅	905, 782
PCR múltiple 2 (<i>gtrX</i>, <i>opt</i>, <i>gtrIC</i>)		
<i>S. flexneri</i> Xv	<i>opt</i> , <i>wzx</i> ₁₋₅ , <i>gtrX</i>	1098, 782, 425
<i>S. flexneri</i> 1c	<i>gtrI</i> , <i>wzx</i> ₁₋₅ , <i>gtrIC</i>	1122, 782, 518
PCR simple serotipo 6 (<i>wzx</i>₆)		
<i>S. flexneri</i> 6	<i>wzx</i> ₆	739

Se señalan los genes amplificados en cada cepa control y el tamaño de amplicón esperado (en pares de bases). Entre paréntesis los genes detectados en cada reacción.

2.3 Relación genética por PFGE de las variantes “Atípicas” identificadas por PCR

Se realizaron dendogramas comparativos incluyendo a los aislamientos “Atípicos AA479” identificados por serotipificación molecular para establecer la relación genética entre las distintas variantes. Los dendogramas se realizaron como se detalló en la sección ***1.4 de Materiales y Métodos - Parte 1.***

RESULTADOS

PARTE 1

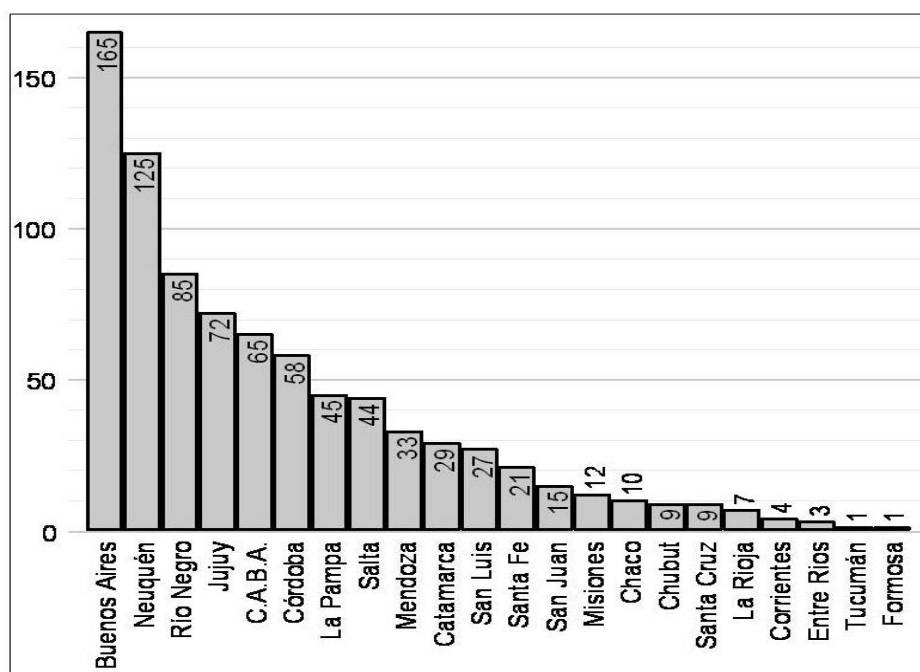
Parte 1 - Estudio de la diversidad genética de aislamientos de *S. flexneri* incorporados a la Base de datos de perfiles genéticos de PFGE.

En esta sección, se muestran los resultados del análisis de los perfiles genéticos obtenidos por PFGE de 840 aislamientos de *S. flexneri* recuperados entre enero de 2004 y junio de 2014 en Argentina.

1.1 Diversidad geográfica y temporal de los aislamientos incorporados a la BDN.

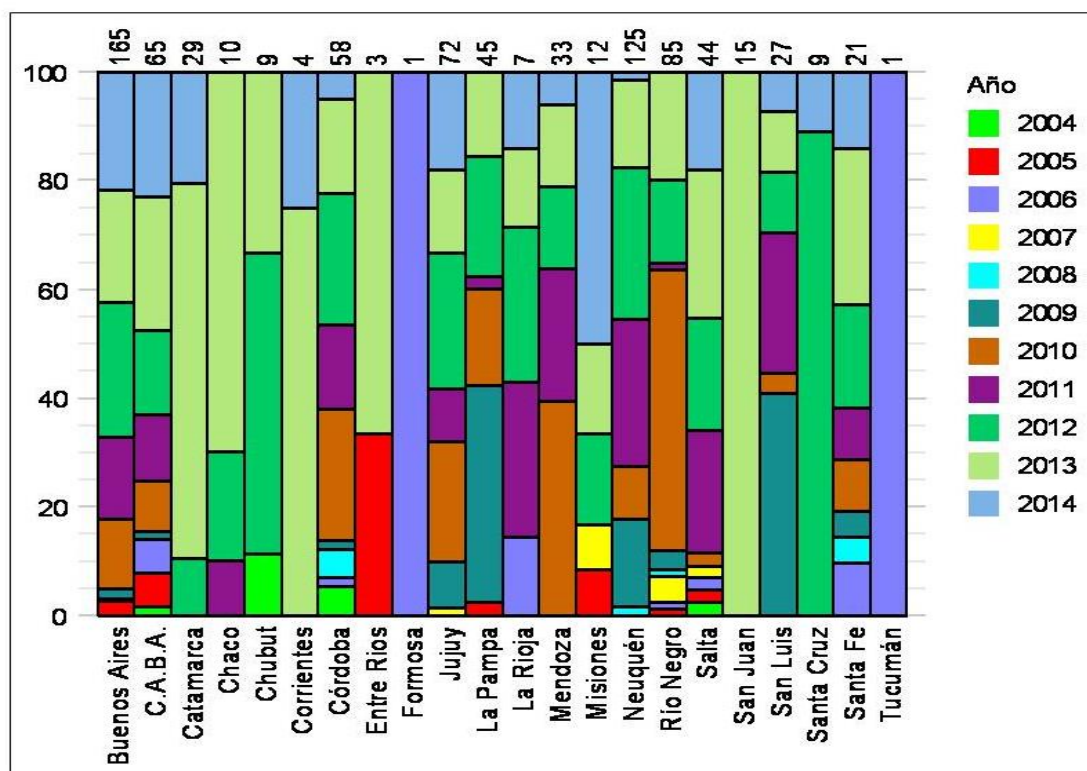
En la **Figura 8** se muestra la distribución por provincia de la cantidad de perfiles genéticos que fueron ingresados a la BDN, los cuales corresponden a aislamientos remitidos al LNR por laboratorios de 21 provincias y C.A.B.A. Las regiones más representadas fueron Buenos Aires, Neuquén, Río Negro, Jujuy, C.A.B.A., Córdoba, La Pampa y Salta, tanto en cantidad de cepas como en los años de aislamiento (**Figura 9**). Otras regiones, como San Juan y Catamarca, cuentan con un número considerable de aislamientos, pero correspondientes sólo a ciertos años del periodo estudiado (**Figura 9**).

Figura 8: Número de aislamientos ingresados a la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos de *S. flexneri* por lugar de origen.



Eje vertical: número de aislamientos, **Eje horizontal:** provincias. Cada barra vertical representa la cantidad de aislamientos ingresados a la BDN de cada provincia, se señala el número en el extremo superior de cada barra.

Figura 9: Número de aislamientos ingresados a la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos de *S. flexneri* por lugar de origen y año de aislamiento.



Eje vertical: número de aislamientos; **Eje horizontal:** provincias. Cada barra, además de representar el total de aislamientos ingresados de cada provincia, discrimina en distintos colores los años de aislamiento, teniendo en cuenta la fecha en que se aisló *S. flexneri* de la muestra.

1.2 Diversidad genética y ramas principales determinadas en el dendograma total.

Entre los 840 aislamientos de *S. flexneri* ingresados a la BDN, se identificaron 404 perfiles genéticos distintos (patrones de bandas) con la enzima primaria *NotI*, con similitudes entre 59.5 y 100%. El Índice de Diversidad calculado fue de 2,1.

Como primer análisis de la diversidad genética total encontrada, se analizó el dendograma completo compactado, pudiéndose definir principalmente ocho grupos o ramas de aislamientos más diferenciados (**Figura 10 A; Figuras A1 a A8 del Anexo**).

La rama 1, estuvo compuesta por 284 aislamientos que presentaron 104 perfiles de PFGE con similitud entre 80 y 100%. Estos aislamientos fueron recuperados entre 2005 y 2014. Dentro de esta rama se agruparon principalmente aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos AA479” (N=268), junto con 9 aislamientos del serotipo X (8 de ellos confirmados por PCR), cuatro del serotipo Y, y uno de los serotipos 1, 2 y 3 (**Figura 10 B; Figura, A1 Anexo**). El serotipo de estos últimos tres aislamientos mencionados, fue corroborado mediante PCR a partir de la misma colonia utilizada para el PFGE, mostrando resultados concordantes,

excepto el aislamiento de serotipo 3, que fue determinado por este método como serotipo 1 y subserotipo b, al igual que el otro aislamiento de serotipo 1. No se determinó en este trabajo la causa de esta discrepancia, que podría deberse a que el gen no fue expresado en la colonia estudiada, o el antígeno 1 no fue detectado por el antisuero.

La rama 2 comprendió un pequeño grupo de cinco aislamientos de serotipo 3 (tres pertenecientes a un brote de 2005 y dos de casos esporádicos) relacionados entre sí con el 84 a 97% de similitud. De este grupo, se desprende un aislamiento del serotipo 1 con solo 67% de similitud (verificado como serotipo 1 por PCR), q no mostró mayor identidad con el resto del árbol (**Figura 10 B; Figura A2, Anexo**).

La rama 3 agrupó 122 aislamientos cuyos perfiles de PFGE (80) mostraron similitudes entre 79 y 100%. La mayoría de estos aislamientos, recuperados en los años 2006, 2009 y 2010 a 2014 correspondieron al serotipo 1 (N=105), otros 16 al serotipo 3 (de los cuales nueve dieron positivo para el gen *gtrI* por PCR) y uno “Atípico AA479” (**Figura 10 B; Figura A3, Anexo**).

La rama 4, compuesta por 304 aislamientos recuperados entre 2004 y 2014 incluyó 123 perfiles de PFGE con similitudes entre 80 y 100%. Esta rama comprendió principalmente aislamientos del serotipo 2 (N=284), entre ellos 30 aislamientos asociados a seis brotes estudiados en ese periodo y 12 aislamiento involucrados en 2 posibles eventos en el marco del proyecto “MIDAS”. Estos últimos no contaron con estudio epidemiológico que permitiera la confirmación del brote, con lo cual se identificaron como un “*cluster*” de aislamientos (grupo de aislamientos de perfil indistinguible recuperados en un periodo de tiempo acotado) (ARIM1203RNJZX-1c y ARIM1201COJZX-1c). Además, se agruparon 19 aislamientos de serotipo Y, 3 de ellos asociados a un brote estudiado en 2014. Fueron confirmados por PCR 17 de estos aislamientos. Por último, se encontró en esta rama un aislamiento del serotipo 3 (confirmado por PCR como 3b), (**Figura 10 B; Figura A4, Anexo**).

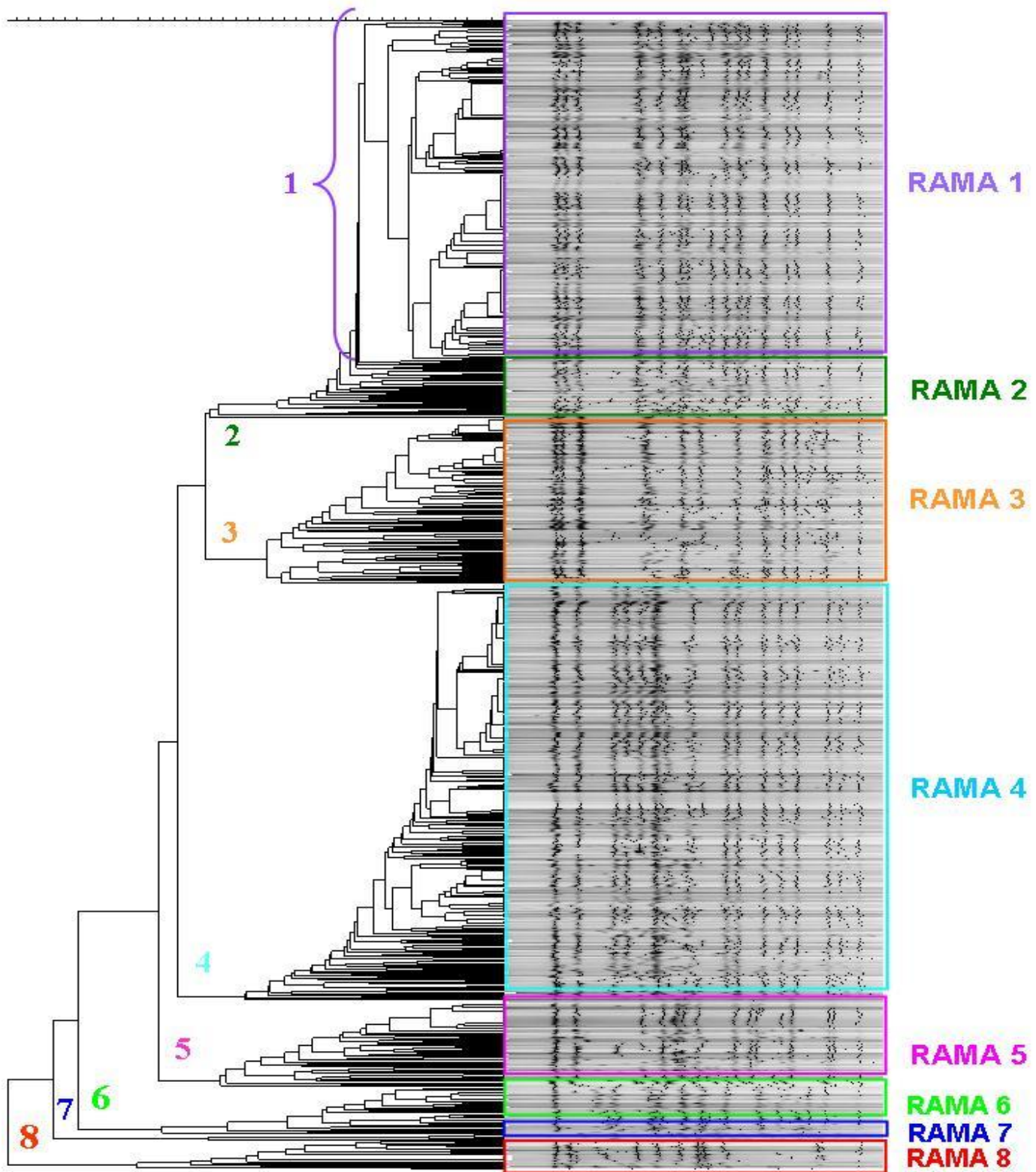
En la rama 5, se encontraron 64 aislamientos con 44 perfiles de PFGE diferentes y similitudes entre 77 y 100 %, de 2006, 2008 y 2010 a 2014. De éstos, 63 pertenecieron al serotipo 3, incluyendo seis aislamientos asociados a dos brotes estudiados y un aislamiento al serotipo 1 (confirmado por PCR como 1b), (**Figura 10 B; Figura A5, Anexo**).

En la Rama 6, se ubicaron los 33 aislamientos del serotipo 6, aislados en 2004, 2005, 2007 y 2010 a 2014. Mostraron similitud entre el 78 y 100 % e incluyeron cuatro aislamientos estudiados en un brote. También agrupó un aislamiento de serotipo 4a (confirmado por PCR) al final de la rama, con un 73% de similitud (**Figura 10 B; Figura A6, Anexo**).

Por último, se observaron dos pequeñas ramas diferenciadas, la Rama 7 compuesta por sólo cinco aislamientos “Atípicos AA479” de 2010 y altamente relacionados (94 a 100% de

similitud), y uno de serotipo 3 (confirmado por PCR como 3a). Este último mostró solo 74% de similitud con los anteriores (**Figura 10 B; Figura A7, Anexo**). Y la Rama 8, ubicada al final del dendograma, agrupó 21 aislamientos recuperados entre 2005 y 2014, con similitudes de entre el 70 y 100%. Incluyó 17 aislamientos “Atípicos AA479”, siendo este grupo el más alejado del resto de los aislamientos “Atípicos” fueron también estudiados en su totalidad por PCR, identificándose una nueva variante dentro de ellos (4av), estos resultados son desarrollados más adelante en las secciones **2.2** y **2.3** de los **Resultados-Parte 2**. Además agruparon dos aislamientos del serotipo 4a (confirmados por PCR) y dos del serotipo Y (confirmados por PCR) (**Figura 10 B; Figura A8, Anexo**).

Figura 10: Diversidad genética y ramas principales identificadas en el dendograma total.
A) Dendograma de relación genética por *NotI*-PFGE de 840 aislamientos de *S. flexneri* donde se observan 8 ramas principales.



En cuadros de colores se señalan los perfiles agrupados en cada rama identificada con un número.

Figura 10 B): Datos de los aislamientos incluidos dentro de cada rama identificada en la Figura 10 A).

RAMA N° aislam/perfiles	% similitud	Años	Serotipos	N	%
RAMA 1 284 / 104	80-100	2005 a 2014	Sf "Atípicos A479"	268	92,4
			Sf X	9	100
			Sf Y	4	16
			Sf 1 - 2 - 3	1 de c/u	0,9-0,3-1,1
RAMA 2 6/6	84-97	2005, 2008, 2014	Sf 3	5	5,8
	67	2004	Sf 1	1	0,9
RAMA 3 122/80	79-100	2006, 2009 y 2010 a 2014	Sf 1	105	97,3
			Sf 3	16	18,4
			Sf "Atípicos AA479"	1	0,3
RAMA 4 304/123	80-100	2004 a 2014	Sf 2	284	99,7
			Sf Y	19	76
			Sf 3	1	1,1
RAMA 5 64/44	77-100	2006, 2008 y 2010-2014	Sf 3	63	72,4
			1	1	0,9
RAMA 6 34/25	78-100	2004, 2005, 2007 y 2010 a 2014	Sf 6	33	100
	73		Sf 4	1	33,3
RAMA 7 6/4	94-100	2010	Sf "Atípicos AA479"	4	1,4
	74	2011	Sf 3	1	1,1
RAMA 8 21/17	70-100	2005 a 2014	Sf "Atípicos AA479"	17	5,9
			Sf 4	2	66,6
			Sf Y	2	8

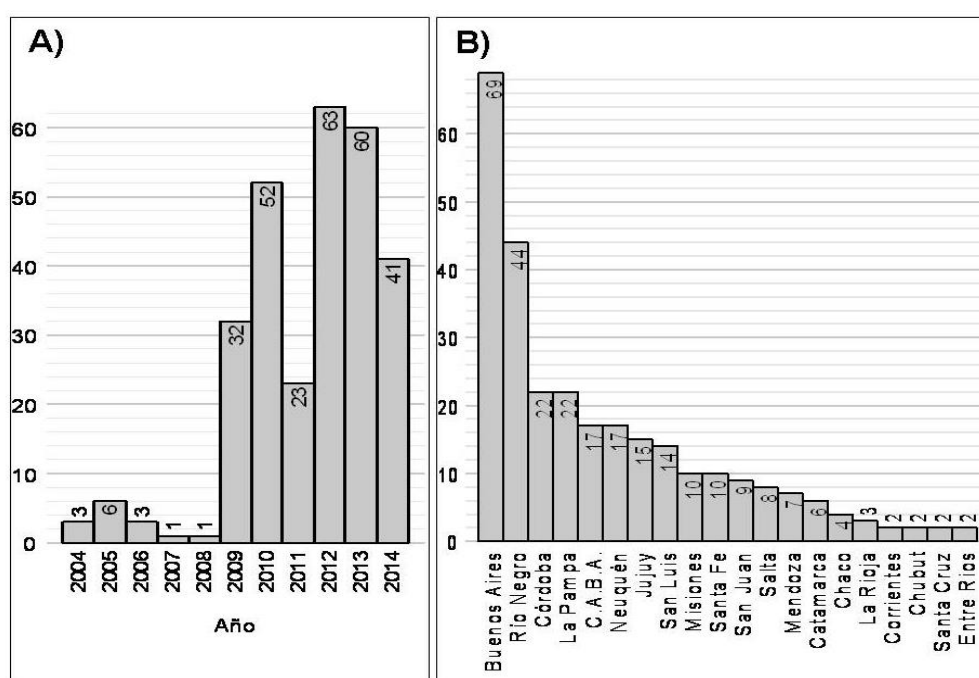
En las columnas, de izquierda a derecha, se señalan: Cantidad de aislamientos total y cantidad de perfiles de PFGE diferentes de cada rama (**N° aislam/perfiles**); el porcentaje (%) de similitud mínimo y máximo encontrado entre los aislamientos de cada rama; **Años** de aislamiento de los perfiles de cada serotipo incluidos en cada rama, **Serotipos** incluidos en cada rama; cantidad de aislamientos (**N**) de cada serotipo encontrado; porcentaje (%) del N indicado en cada línea respecto al total de aislamientos de dicho serotipo. Se señalan en negrita los serotipos que incluyen un % mayoritario de sus aislamientos en dicha rama.

1.3 Análisis de diversidad genética y distribución témporo-espacial de los subtipos circulantes identificados por PFGE, por serotipo.

1.3.1 *Shigella flexneri* serotipo 2

Se ingresaron a la BDN 285 aislamientos tipificados como serotipo 2, recuperados en 19 provincias y C.A.B.A., entre 2004 y Junio de 2014 (**Tabla 3, Figura 11 A y B**). Pueden verse los perfiles genéticos de estos aislamientos en las **Figuras A4 y A1 del Anexo**.

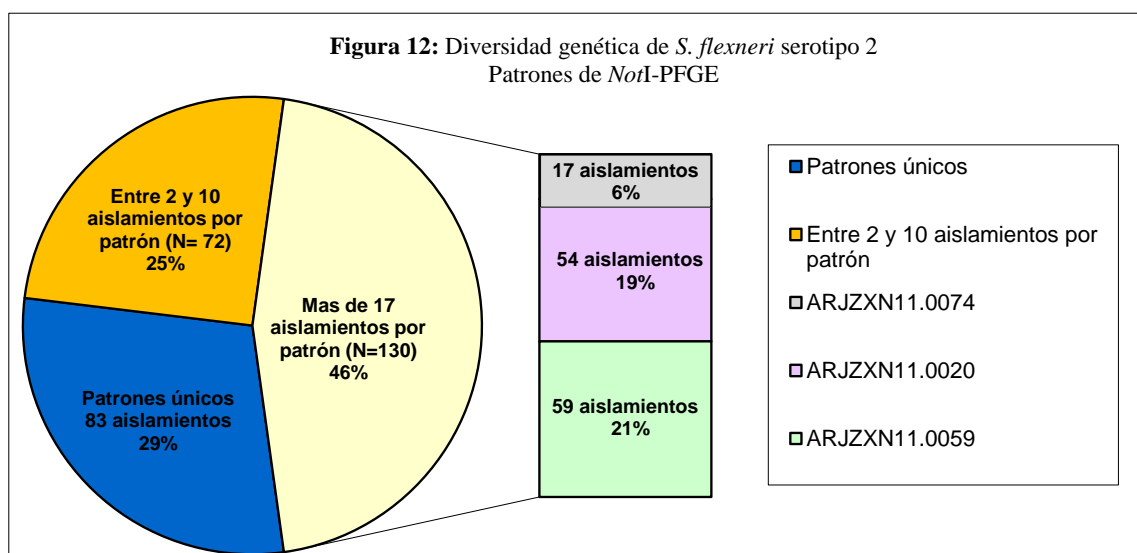
Figura 11: Aislamientos de *S. flexneri* serotipo 2 ingresados a la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos. **A)** Cantidad por año de aislamiento. **B)** Cantidad por provincia.



Eje vertical: número de aislamientos, **Eje horizontal:** En **A)** año de aislamiento, en **B)** provincias.

A) Cada barra representa la cantidad de aislamientos recuperados ese año. **B)** Cada barra representa la cantidad de aislamientos de cada provincia y C.A.B.A. Se señala el número en el extremo superior de cada barra.

Se realizó el dendograma de relación genética incluyendo a estos 285 aislamientos del serotipo 2, y se observó una diversidad genética entre el 78 y 100 % de similitud, con un índice de diversidad $I = 2,66$. Al analizar los perfiles de PFGE, se encontraron 107 patrones de bandas diferentes: 83 aislamientos mostraron un perfil de bandas único (patrones únicos); 12 patrones agruparon dos aislamientos cada uno; cuatro patrones estuvieron compuestos por tres aislamientos cada uno; tres patrones agruparon cada uno 4, 5 y 7 aislamientos; dos patrones fueron compartidos por 10 aislamientos cada uno; y se identificaron 3 patrones mayoritarios que incluyeron 17, 54 y 59 aislamientos respectivamente (**Figura 12**).



En las barras que se desprenden del gráfico principal, se señalan la cantidad y porcentaje correspondiente a los aislamientos de cada uno de los 3 patrones mayoritarios identificados dentro del serotipo.

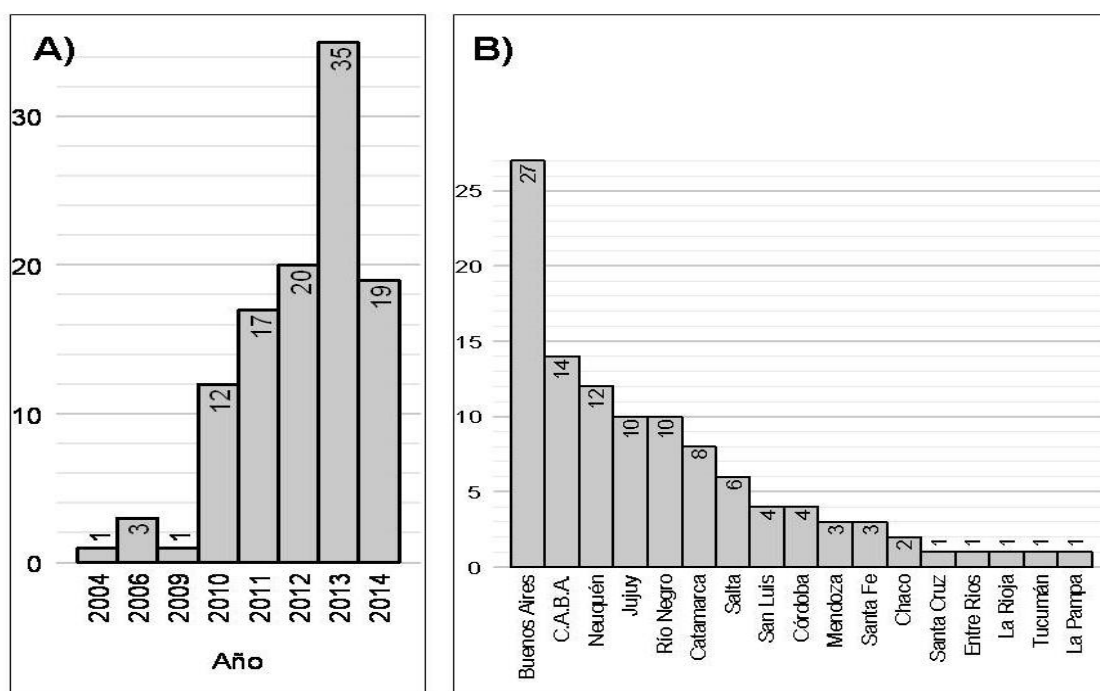
Respecto a los patrones que agruparon mayor cantidad de aislamientos, cabe mencionar el ARJZN11.0074 (**Figura 12**), integrado mayormente por aislamientos estudiados en el contexto de un brote ocurrido en San Luis en 2009 (N=11, **Tabla 8**), junto con seis aislamientos provenientes de Bs. As., Neuquén y Río Negro entre 2009 y 2014.

El patrón ARJZN11.0020, con 54 aislamientos (**Figura 12**), incluyó seis casos recuperados en C.A.B.A., 4 recuperados entre 2005 y 2014 y dos asociados a un brote ocurrido en 2006 (**Tabla 8**); 20 procedentes de Río Negro (Viedma y Cipolletti) recuperados entre 2009 y 2013. Este patrón también fue identificado en La Pampa desde el 2005 hasta 2012 y en otras 9 provincias se lo ha aislado al menos una vez. Por último, el patrón ARJZN11.0059, fue encontrado en 59 aislamientos (**Figura 12**). En 2011, 2012 y 2014 se estudiaron 15 aislamientos asociados a brotes ocurridos en C.A.B.A, Neuquén y Misiones, respectivamente (**Tabla 8**). En las tres provincias, ya se había encontrado el mismo subtipo en años anteriores a la ocurrencia de los eventos. Otra provincia donde se encontró este subtipo en varias oportunidades es Buenos Aires, con 16 aislamientos estudiados de seis ciudades, identificados entre 2010 y 2014. También en Río Negro se encontró este subtipo circulante desde 2010 en al menos tres ciudades; además fue identificado en otras siete provincias, además de las ya mencionadas (**Figura A4, Anexo**).

1.3.2 *Shigella flexneri* serotipo 1

Se incorporaron a la BDN los perfiles genéticos de 108 aislamientos de este serotipo provenientes de aislamientos recuperados en 16 provincias y C.A.B.A en 2004, 2006, 2009 y 2010 (**Tabla 3, Figura 13, A y B**). Pueden verse los perfiles genéticos de estos aislamientos en las **Figuras A1, A2, A3 y A5 del Anexo**.

Figura 13: Aislamientos de *S. flexneri* serotipo 1 ingresados a la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos. **A)** Cantidad por año de aislamiento. **B)** Cantidad por provincia.



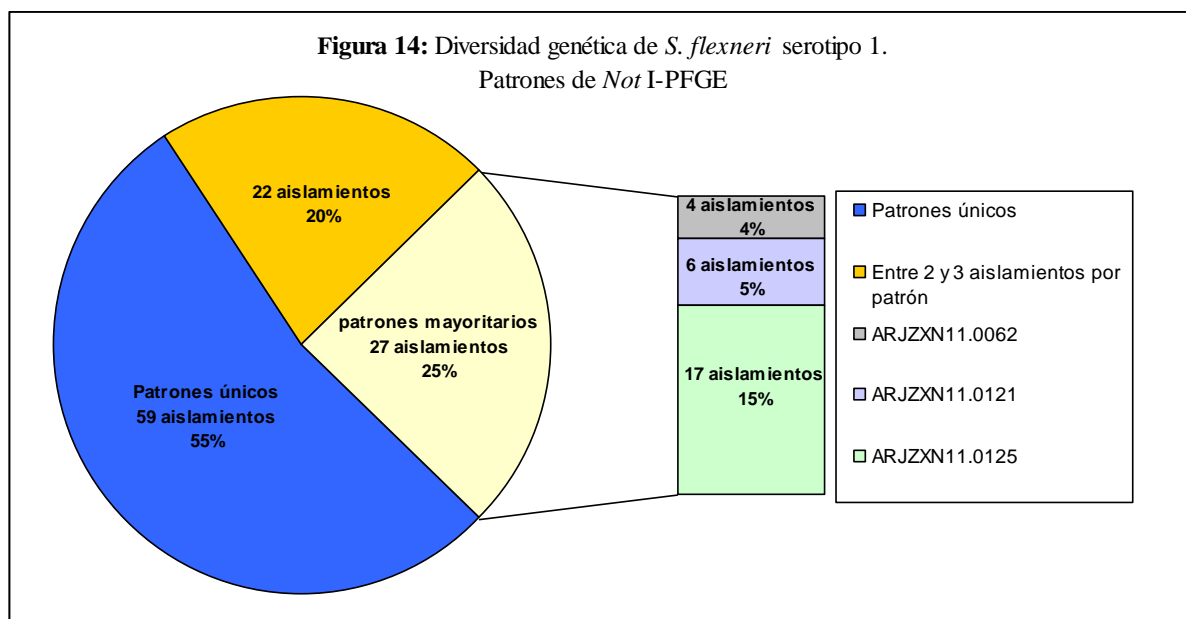
Eje vertical: número de aislamientos, **Eje horizontal:** En **A)** año de aislamiento, en **B)** provincias.

A) Cada barra representa la cantidad de aislamientos recuperados ese año. **B)** Cada barra representa la cantidad de aislamientos de cada provincia y C.A.B.A. Se señala el número en el extremo superior de cada barra.

Se encontraron 71 perfiles genéticos diferentes, entre los cuales se distinguen: 59 patrones únicos, cinco patrones con dos aislamientos cada uno, cuatro patrones de tres aislamientos cada uno, y tres patrones con 4, 6 y 17 aislamientos cada uno (**Figura 14**). El índice (I) calculado fue de 1,58.

Entre los tres subtipos mayoritarios, se encontraron el ARJZXN11.0062 con cuatro aislamientos (**Figura 14**) (Buenos Aires, 2011 (N=2); Chaco, 2012 y San Luis, 2013); el ARJZXN11.0121 con seis aislamientos en total (**Figura 14**), de Buenos Aires (N= 3, 2010 y 2013, de los cuales 2 fueron identificados por PCR como subserotipo 1b), Río Negro (N= 2,

2013) y Salta (2013), y el patrón ARJZXN11.0125, encontrado en 17 aislamientos (**Figura 14**) recuperados entre 2010 y 2014 en ocho provincias y C.A.B.A. (**Figura A3, Anexo**)

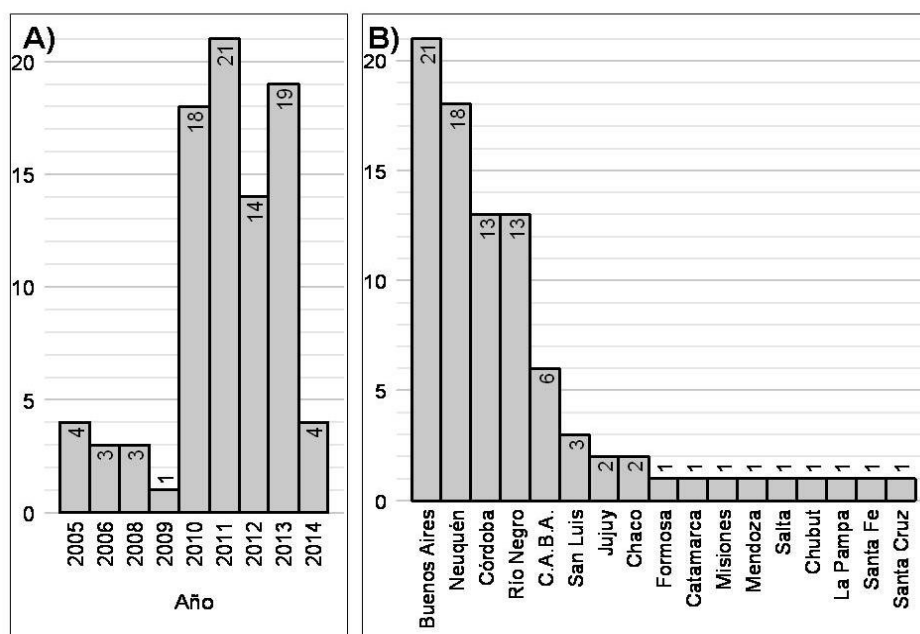


En las barras que se desprenden del gráfico principal, se señalan la cantidad y porcentaje, respecto al total, correspondiente a los aislamientos de cada uno de los 3 patrones mayoritarios identificados dentro del serotipo.

1.3.3 *Shigella flexneri* serotipo 3

Este serotipo estuvo representado por 87 aislamientos ingresados a la BDN. Se estudiaron aislamientos recuperados en 16 provincias y C.A.B.A entre 2005 y 2014 (excepto 2007), principalmente de Buenos Aires, Neuquén, Córdoba, Río Negro y C.A.B.A. De las restantes 12 provincias se analizaron 1 a 3 tres cepas en el periodo estudiado (**Tabla 3, Figura 15, A) y B**). Pueden verse los perfiles genéticos de estos aislamientos en las **Figuras A4, A2, A3, A4, A5 y A7 del Anexo**.

Figura 15: Aislamientos de *S. flexneri* serotipo 3 ingresados a la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos. **A)** Cantidad por año de aislamiento. **B)** Cantidad por provincia.



Eje vertical: número de aislamientos, **Eje horizontal:** En **A)** año de aislamiento, en **B)** provincias.

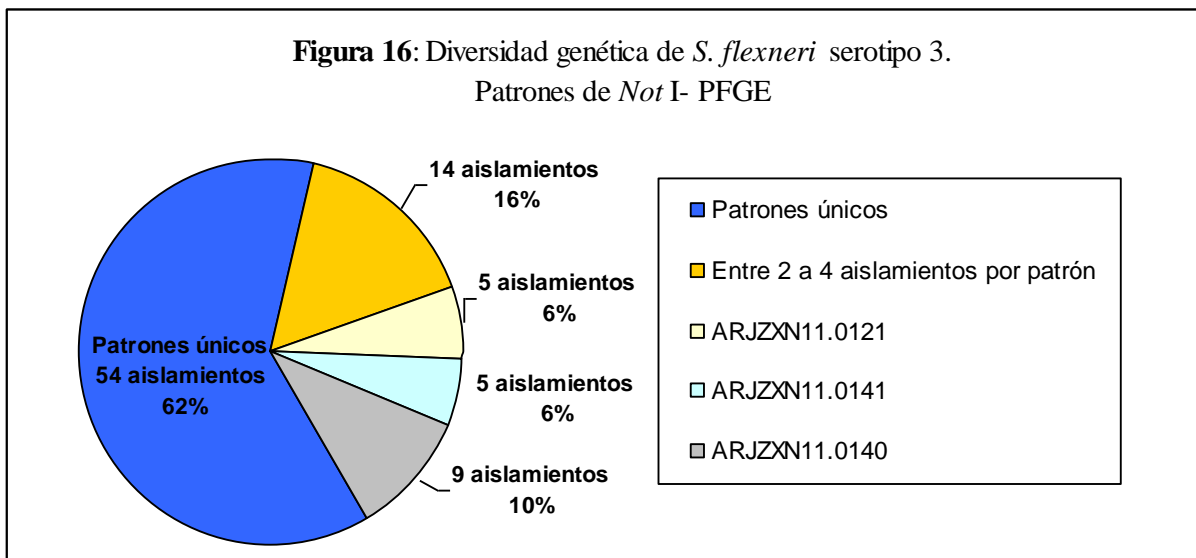
A) Cada barra representa la cantidad de aislamientos recuperados ese año. **B)** Cada barra representa la cantidad de aislamientos de cada provincia y C.A.B.A. Se señala el número en el extremo superior de cada barra.

De estos 87 aislamientos tipificados por serología como serotipo 3, se estudiaron 25 por PCR, ya que se observó que agrupaban con perfiles del serotipo 1. De éstos, 15 se confirmaron como serotipo 3 de los cuales 10 fueron identificados como subserotipo 3b (positivos para los genes *wzx₁₋₅* y *oac*) y 5 como subserotipo “3a” (*wzx₁₋₅*, *oac* y *gtrX*). Por otra parte, 10 aislamientos mostraron resultados compatibles con el serotipo 1, subserotipo “b” (positivos para los genes *wzx₁₋₅*, *gtrI* y *oac*).

La diversidad de subtipos genéticos encontrada fue de 63 perfiles de bandas diferentes, lo que arroja un índice de diversidad $I= 1,38$.

De los 63 perfiles, 54 fueron patrones únicos. Cinco patrones agruparon dos aislamientos cada uno, tres de ellos con casos asociados a brotes ocurridos en tres ciudades de Córdoba en 2008 y 2013 (ARJZXN11.0151, ARJZXN11.0292 y ARJZXN11.0293) (**Tabla 8**), mientras que otro patrón correspondió a dos aislamientos recuperados el mismo día en un hospital de San Luis en 2012, pero en este caso no hubo estudio epidemiológico que respalde el resultado y la ocurrencia del evento (ARJZXN11.0230). Un patrón fue identificado en cuatro aislamientos de las provincias limítrofes de Neuquén y Río Negro desde 2010; y tres patrones mayoritarios agruparon 5 y 9 aislamientos (**Figura 16**). Los patrones que agruparon 5 aislamientos fueron dos (**Figura 16**), ARJZXN11.0121 que incluyó un caso posteriormente

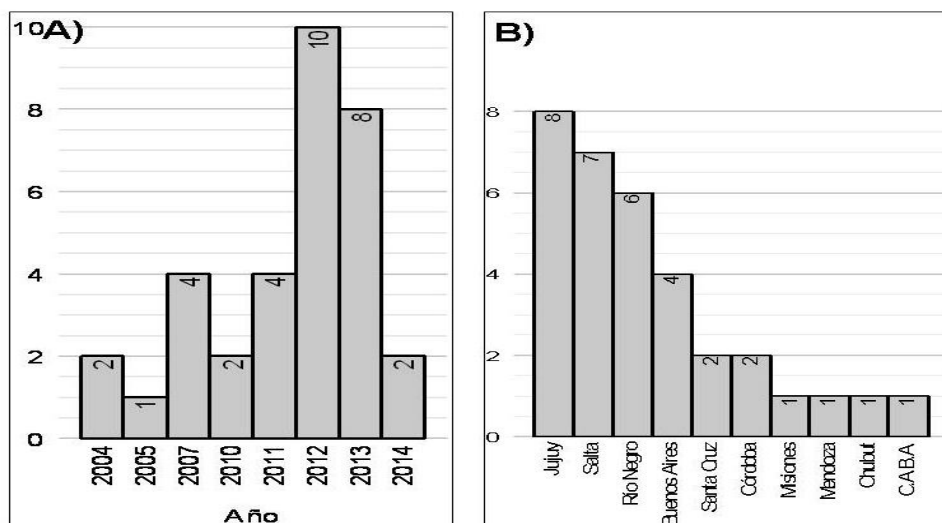
identificado por PCR como serotipo 1b, casualmente este patrón ya fue mencionado antes dado que fue encontrado en 6 aislamientos del serotipo 1, dos de ellos también tipificados como subserotipo 1b por PCR. El otro patrón, ARJZXN11.0141 (**Figura 16**), fue encontrado únicamente en 2010 y 2012 en Neuquén y Río Negro, respectivamente. Por último, el patrón que más aislamientos agrupó, fue el ARJZXN11.0140 (**Figura 16**), con 7 aislamientos de Neuquén recuperados en el transcurso de una misma semana en el año 2011; este grupo de casos constituyó un “cluster”, ya que no hubo estudios epidemiológicos que avalaran el posible nexo entre los casos evidenciado por los resultados de genotipificación. Este patrón también se encontró en aislamientos de dos casos esporádicos de C.A.B.A de 2013 (**Figura A3, Anexo**).



1.3.4 *Shigella flexneri* serotipo 6

Se incorporaron a la BDN 33 aislamientos del serotipo 6, remitidos por 9 provincias y C.A.B.A, durante los años 2004, 2005, 2007 y 2010 a 2014 (**Tabla 3, Figura 17**).

Figura 17: Aislamientos de *S. flexneri* serotipo 6 ingresados a la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos. **A)** Cantidad por año de aislamiento. **B)** Cantidad por provincia.

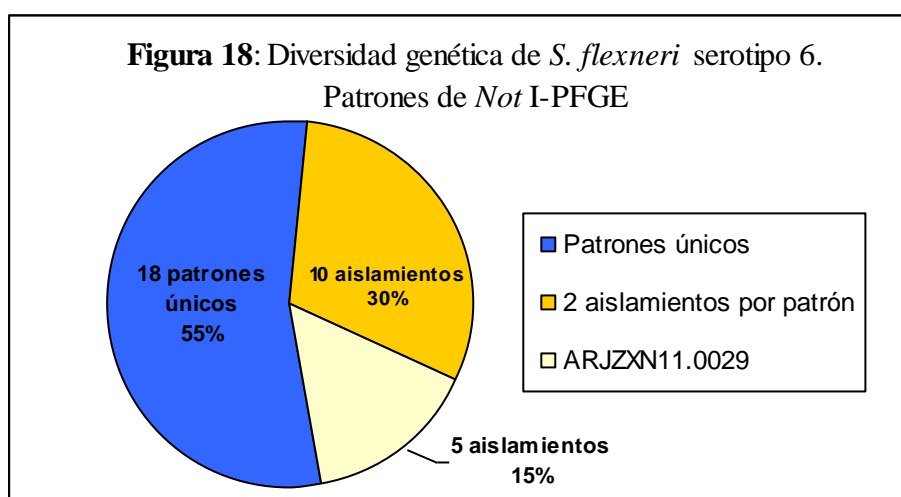


Eje vertical: número de aislamientos, **Eje horizontal:** En **A)** año de aislamiento, en **B)** provincias.

A) Cada barra representa la cantidad de aislamientos recuperados ese año. **B)** Cada barra representa la cantidad de aislamientos de cada provincia y C.A.B.A. Se señala el número en el extremo superior de cada barra.

Se encontraron 24 perfiles genéticos diferentes, con similitudes que fueron desde el 78 al 100%, de los cuales 18 fueron únicos (**Figura 18**). El índice de diversidad calculado fue $I=1,37$.

Además hubo cinco patrones que agruparon a dos aislamientos cada uno (**Figura 18**). Vale mencionar al ARJZXN11.0017 y ARJZXN11.0018 relacionados entre sí por un 90.3% de similitud, que correspondieron a cuatro casos estudiados en el marco de un brote ocurrido en Río Negro, Cipolletti en 2007. El patrón mayoritario, ARJZXN11.0029 (**Figura 18**), agrupó aislamientos de cuatro provincias entre 2010 y 2013 (**Figura A6, Anexo**).



1.3.5 *Shigella flexneri* serotipo 4

Este serotipo estuvo representado solo por tres aislamientos 4a (subserotipo determinado por PCR), que mostraron perfiles con 70,6 al 87 % de similitud entre sí (**Tabla 3**). Al ser todos los perfiles diferentes, el índice de diversidad calculado fue I= 1.

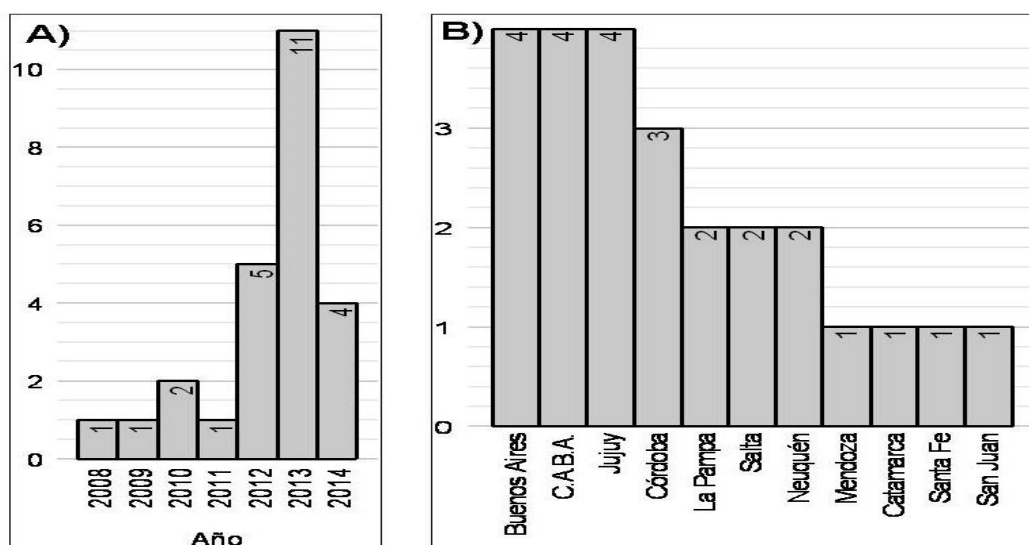
Los aislamientos fueron recuperados en Salta (Orán), C.A.B.A y Córdoba en 2005, 2006 y 2010 respectivamente (**Figura A7 y A8, Anexo**).

Más adelante, en la **Parte 2, punto 2.2 de Resultados**, se muestran los resultados de seis aislamientos adicionales, de los cuales uno fue inicialmente determinado como serotipo 4, mientras que otros 5 se tipificaron como “Atípicos” con el antisuero AA479, y posteriormente como parte de este trabajo, se identificaron por PCR como serotipo 4av.

1.3.6 *Shigella flexneri* serotipo Y

Este serotipo cuenta con 25 aislamientos ingresados en la BDN correspondientes a casos esporádicos y de brote recuperados en 10 provincias y C.A.B.A, a partir de 2008 (**Tabla 3, Figura 19**).

Figura 19: Aislamientos de *S. flexneri* serotipo Y ingresados a la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos. **A)** Cantidad por año de aislamiento. **B)** Cantidad por provincia.



Eje vertical: número de aislamientos, **Eje horizontal:** En **A)** año de aislamiento, en **B)** provincias.

A) Cada barra representa la cantidad de aislamientos recuperados ese año. **B)** Cada barra representa la cantidad de aislamientos de cada provincia y C.A.B.A. Se señala el número en el extremo superior de cada barra.

Se identificaron perfiles del serotipo Y dentro de ramas que agruparon mayormente perfiles de los serotipos “Atípicos” y 2 (**Figura 10 B, Figura A1, A4 y A8, Anexo**).

En su mayoría se encontraron perfiles genéticos diferentes con un índice de diversidad $I= 1,04$. Dentro de estos perfiles genéticos, 23 fueron patrones únicos con un rango de similitud amplio de entre el 58 y 100 %. Luego, el patrón ARJZXN11.0109 fue encontrado en dos aislamientos de distintas provincias y años (Santa Fe y La Pampa en 2010 y 2012, respectivamente). El otro patrón que se identificó en dos aislamientos fueron estudiados en el contexto de un brote familiar en 2014 (**Tabla 8**).

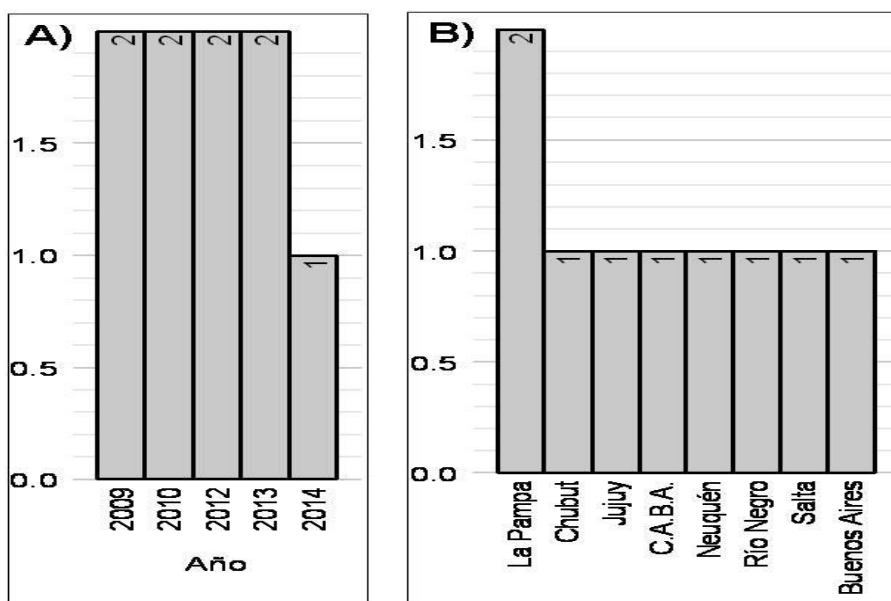
Hay que mencionar que recientemente, con la incorporación de la PCR múltiple al esquema de serotipificación, así como el uso de antisueros grupales comerciales en algunos casos, fue posible comenzar a determinar este serotipo circulante en el país. De este modo, 23 de los 25 aislamientos de este serotipo, fueron determinados por PCR múltiple, siendo positivos únicamente para el gen *wzx1-5*, mientras que en los otros dos aislamientos fue completada su tipificación utilizando antisueros grupales comerciales.

1.3.7 *Shigella flexneri* serotipo X

Se ingresaron subtipos genéticos de 9 aislamientos de este serotipo, remitidos por 7 provincias y C.A.B.A. entre 2009 y 2014 (**Tabla 3, Figura 20**), todos ellos dentro de la misma Rama que los “Atípicos AA479” (**Figura A1, Anexo**).

La diversidad genética fue de 7 patrones diferentes, 6 únicos y otro compartido por tres aislamientos recuperados en 2009 en Santa Rosa y en 2010 en C.A.B.A y Jujuy. Dos de estos 7 patrones, también se encontraron en aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos AA479”. El índice de diversidad fue $I= 1,28$.

Figura 20: Aislamientos de *S. flexneri* serotipo X ingresados a la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos. **A)** Cantidad por año de aislamiento. **B)** Cantidad por provincia.



Eje vertical: número de aislamientos, **Eje horizontal:** En **A)** año de aislamiento, en **B)** provincias.

A) Cada barra representa la cantidad de aislamientos recuperados ese año. **B)** Cada barra representa la cantidad de aislamientos de cada provincia y C.A.B.A. Se señala el número en el extremo superior de cada barra.

1.3.8 *Shigella flexneri* “Atípicos AA479”

Se ingresaron a la BDN los perfiles genéticos de 290 aislamientos tipificados como *S. flexneri* “Atípicos AA479”. Estos aislamientos fueron recuperados desde 2005 (solo 8 aislamientos previos al 2009) en 17 provincias y C.A.B.A (**Tabla 3, Figura 21, A) y B)**. Pueden verse los perfiles genéticos de estos aislamientos en las **Figuras A1, A3, A7 y A8** del **Anexo**.

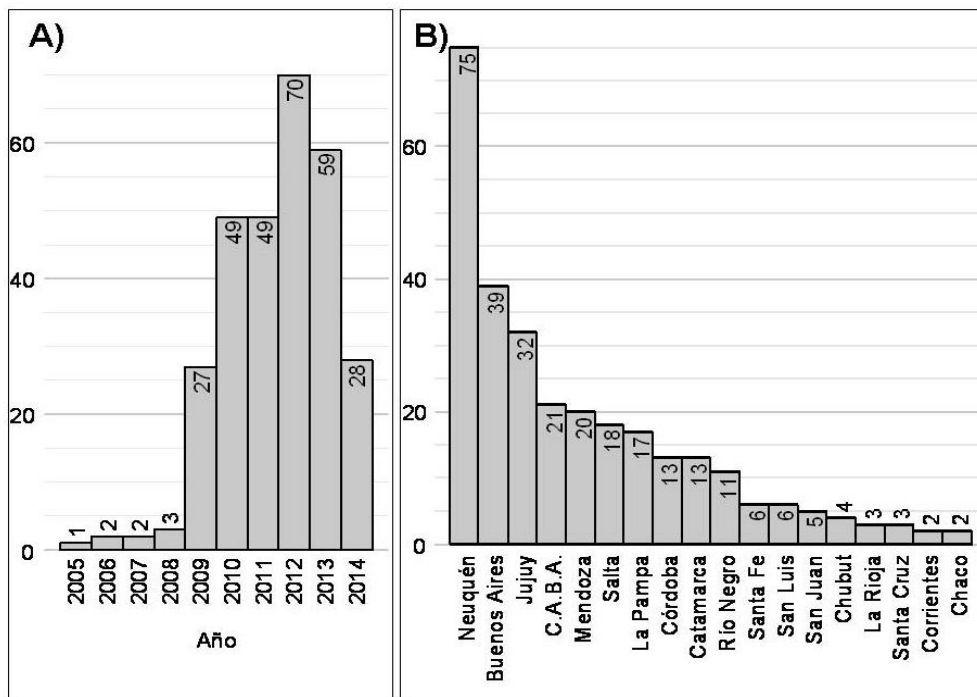
Al observar la tipografía general del dendograma de relación genética incluyendo solo a estos perfiles, se observaron 4 grupos bien diferenciados de patrones de bandas. El mayoritario, que agrupó al 92,4% de los aislamientos, incluyó perfiles de PFGE con similitudes de entre 81.5 y 100 %. Los otros tres grupos de patrones estuvieron diferenciados del principal con 63% de similitud. Características a destacar de estos tres pequeños grupos diferenciados, son que uno de ellos está compuesto solo por aislamientos recuperados durante 2010 en tres sitios distintos (Bs. As., Jujuy y Córdoba) (pueden verse en la **Figura A7, Anexo**), otro por aislamientos asociados a un estudio de brote en C.A.B.A durante 2014 y el último por aislamientos pertenecientes a dos variantes Atípicas que no son las más

frecuentemente aisladas, portadoras de los genes descriptos para las variantes denominadas Yv y 4av por Sun y col. (pueden verse en la **Figura A8, Anexo**), (ver más adelante detalles de los resultados de PCR en el punto **2.2 de Resultados – Parte 2**).

Entre los 290 aislamientos “Atípicos AA479”, se identificaron 112 perfiles genéticos diferentes, obteniéndose un índice de diversidad $I = 2,59$. De ellos, 83 fueron únicos; 11 patrones fueron presentados por dos aislamientos cada uno; cuatro patrones por tres aislamientos cada uno; siete patrones por cuatro aislamientos cada uno; y los patrones predominantes con 6, 8, 12, 23, 24, 35 y 37 aislamientos cada uno. (**Figura 22**).

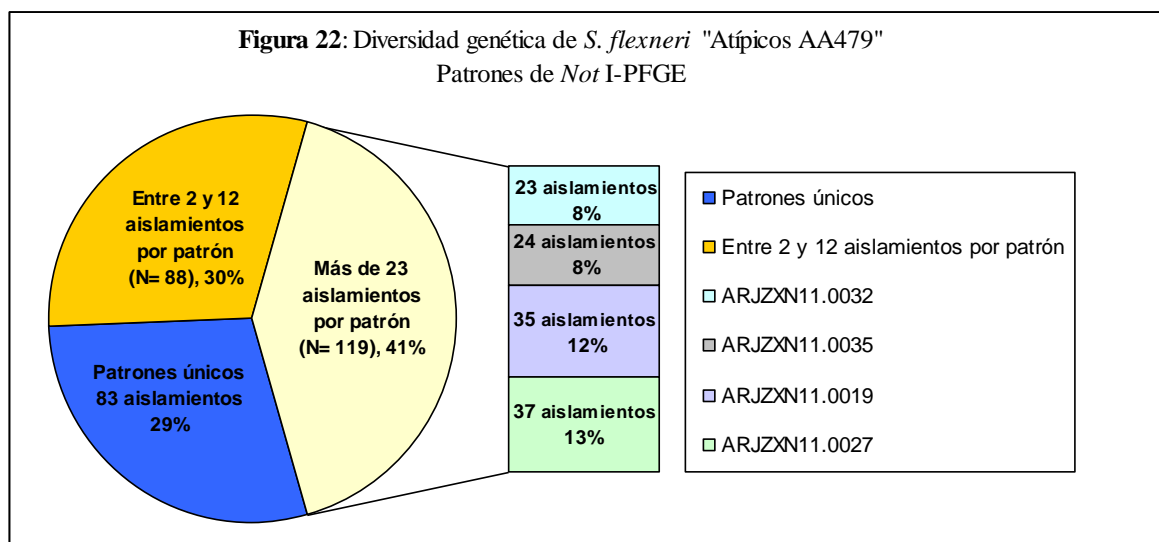
Figura 21: Aislamientos de *S. flexneri* serotipo “Atípicos AA479” ingresados a la Base de Datos Nacional de perfiles genéticos.

A) Cantidad por año de aislamiento. B) Cantidad por provincia.



Eje vertical: número de aislamientos, **Eje horizontal:** En **A)** año de aislamiento, en **B)** provincias.

A) Cada barra representa la cantidad de aislamientos recuperados ese año. **B)** Cada barra representa la cantidad de aislamientos de cada provincia y C.A.B.A. Se señala el número en el extremo superior de cada barra.



En las barras que se desprenden del gráfico principal, se señalan la cantidad y porcentaje, respecto al total, correspondiente a los aislamientos de cada uno de los 4 patrones mayoritarios identificados dentro del serotipo.

Entre los cuatro patrones con mayor número de aislamientos, el denominado con el código ARJZXN11.0032 (**Figura 22**), fue identificado en 23 aislamientos, recuperados en 10 provincias y C.A.B.A entre 2009 y 2014. De los cinco lugares de donde se analizó más de un aislamiento, en C.A.B.A. fue encontrado en distintos años (entre 2011 y 2013) y en Neuquén no solo en distintos años (2009, 2010, 2011 Y 2013) sino también en 3 ciudades (**Figura A1, Anexo**). El segundo patrón a mencionar, ARJZXN11.0035 (**Figura 22**), incluyó aislamientos recibidos de 7 provincias y C.A.B.A, entre 2010 y 2013. Este patrón incluyó dos aislamientos recuperados en el lapso de dos meses en muestras de fluido vaginal en una niña con vaginitis. También se encontró este patrón en cinco casos de diarrea asociados a un brote en San Juan durante 2013 (**Tabla 8**). En Mendoza, Neuquén y C.A.B.A se encontró este patrón en más de un año (**Figura A1, Anexo**). El patrón ARJZXN11.0019 (**Figura 22**), agrupó 35 aislamientos de 10 provincias y C.A.B.A entre 2010 y 2014. En las ciudades de Córdoba, Salta, Santa Rosa y Trelew se encontró este patrón en distintos años. Mientras que en las provincias de Buenos Aires, Jujuy, Neuquén y Río Negro se lo identificó en distintos años y ciudades. También agrupó con estos aislamientos 1 identificado como serotipo X (**Figura A1, Anexo**).

Por último, el patrón ARJZXN11.0027 (**Figura 22**), agrupó la mayor cantidad de aislamientos (N= 37) de 7 provincias entre 2009 y 2014. En Neuquén se identificó este patrón en aislamientos asociados a un brote ocurrido en 2012 (**Tabla 8**), y se vio que este subtipo genético circulaba en la región desde 2009. Además en Buenos Aires, La Pampa y Jujuy se lo encontró en distintas ciudades y años (**Figura A1, Anexo**).

1.4 Estudio de aislamientos asociados a brotes por PFGE.

Antes de 2009, cuando se utilizaba el protocolo de PFGE de *Shigella sonnei*, se estudiaron 20 aislamientos asociados a 7 brotes. Como parte de este trabajo y con el objeto de contar con los perfiles genéticos de estos aislamientos en la BDN, se volvieron a correr bajo el nuevo protocolo estandarizado y validado para *S. flexneri* con la primera enzima de restricción, *NotI*, 13 aislamientos asociados a cinco de estos brotes. De éstos, tres brotes fueron también estudiados con la segunda enzima de restricción, *XbaI* (**Tabla 8**).

Considerando todo el periodo 2004 – 2014, se ingresaron a la BDN los perfiles genéticos de 63 aislamientos asociados a 16 brotes distintos. En la **Tabla 8** se muestran los datos de los brotes estudiados por PFGE con el protocolo estandarizado y validado para *S. flexneri* e ingresados a la BDN.

En 8 brotes, los perfiles de bandas encontrados en los aislamientos asociados, mostraron un perfil de bandas indistinguible entre sí. Además, cuatro de estos brotes también se estudiaron con la segunda enzima de restricción, la cual confirmó el resultado obtenido con la primera enzima, mostrando un 100% de similitud entre los perfiles genéticos (3 brotes) y un 97.7% de similitud (1 brote). Estos resultados, sumados al vínculo epidemiológico de los casos, permitieron confirmar la existencia de cada brote, aunque no así la fuente de infección común, ya que si bien en algunos estudios epidemiológicos se sugería un alimento como fuente de infección, nunca se remitieron al LNR aislamientos para su estudio.

En los demás brotes estudiados, se encontró entre los aislamientos, más de un subtipo genético, pero altamente relacionados, en estos casos se consideraron dichos aislamientos parte del brote al interpretar los resultados en base a los datos epidemiológicos existentes (nexo entre los casos establecido por un estudio epidemiológico del brote).

Dentro de los 22 subtipos genéticos encontrados entre los aislamientos asociados a brotes, cinco fueron identificados también en aislamientos de casos esporádicos. Entre ellos, el patrón ARJZXN11.0059, que además es el perfil genético más frecuente de este serotipo, se encontró en tres brotes distintos así como en 46 casos esporádicos de *S. flexneri* serotipo 2. En las regiones donde ocurrieron los brotes (C.A.B.A., 2011; Neuquén, 2012-2013; Misiones, 2014) ya había sido identificado este subtipo genético con anterioridad, además de en otras 10 provincias desde 2004.

Otro subtipo que causó más de un brote fue el denominado ARJZXN11.0074, el tercer subtipo mayoritario del serotipo 2 (San Luis, 2009; Neuquén, 2012), que también se identificó en otros cinco casos esporádicos de Buenos Aires entre el 2010 y el 2014, y Río Negro en 2009, pero no hay en la BDN otros casos de Neuquén o San Luis. El patrón ARJZXN11.0020, el segundo mas representado en la BDN dentro del serotipo 2, agrupó además de dos aislamientos asociados a un brote en C.A.B.A. en 2006, otros 52 de casos esporádicos de 11 provincias desde 2005; también en C.A.B.A. ya circulaba este subtipo desde el año previo al brote y se siguió identificando hasta 2014. El patrón ARJZXN11.0035 encontrado en cinco aislamientos asociados a un brote en San Juan durante 2013, también se encontraba circulando en el país desde al menos 2010 en otras seis provincias y C.A.B.A., aunque no se estudiaron otros aislamientos de la misma provincia que hayan mostrado este perfil de bandas. Por último, el patrón ARJZXN11.00292, identificado en dos casos del brote en Gral. Cabrera, Córdoba, se encontró en otro aislamiento de la misma ciudad recuperado un mes después del brote comunitario.

Los restantes 17 patrones encontrados en los aislamientos asociados a brote estudiados, mostraron patrones únicos, no encontrándose en la BDN otros perfiles genéticos iguales.

Tabla 8: Brotes causados por *S. flexneri* ocurridos entre 2005 - 2014 estudiados por PFGE.

Mes Año	Serotipo	Provincia, ciudad	Aislamientos ingresados a la BDN NotI-PFGE	Patrones NotI-PFGE	% similitud NotI-PFGE	Aislamientos ingresados a la BDN XbaI-PFGE	Patrones XbaI-PFGE	% similitud XbaI-PFGE	Código de brote	Descripción
Agosto 2005	3	Buenos Aires, Ensenada	3	ARJZXX11.0159 ARJZXX11.0149 ARJZXX11.0133	92,90%	2	ARJZXX01.0061	100%	ARIM0508BAJZX-1o	Brote en un jardín de infantes, 20 afectados, 8 aislamientos remitidos al LNR. Alimentos sospechosos: facturas, leche.
Diciembre 2006	2	C.A.B.A.	3	ARJZXX11.0020 ARJZXX11.0103	93,30%	2	ARJZXX01.0020	100%	ARIM0612CFJZX-1o	Primos asistentes a un cumpleaños, 3 afectados, 3 aislamientos remitidos al LNR
Abril 2007	6	Río Negro, Cipolletti	4	ARJZXX11.0017 ARJZXX11.0018	90%	2	ARJZXX01.0020	95,5%	ARIM0704RNJZX-1o	Dos brotes familiares, 6 casos, 2 probables fuentes de infección. Un mismo subtipo en ambos brotes propagándose en la zona.
Agosto 2008	3	Córdoba, La Cumbrecita	2	ARJZXX11.0151	100%	NR	-	-	ARIM0806CBJZX-1o	Brote comunitario, 5 afectados.
Octubre 2008	2	Santa Fe, Santa Fe	1	ARJZXX11.0171	-	NR	-	-	ARIM0810SFJZX-2o	Asistentes a dos eventos sociales el mismo fin de semana con igual empresa de catering, 57 afectados en total. Se estudió 1 caso de cada brote remitido al LNR. 100% de similitud por PFGE.
Octubre 2009	2	San Luis, San Luis	11	ARJZXX11.0074	100%	11	ARJZXX01.0007	100%	ARIM0910SLJZX-1o	Brote comunitario. Al menos 30 afectados. No se recuperó <i>Shigella</i> de los alimentos estudiados.
Mayo 2011	2	C.A.B.A.	2	ARJZXX11.0059	100%	2	ARJZXX01.0006	100%	ARIM1105CFJZX-1o	Brote familiar, dos hermanos afectados.
Agosto 2011	"Atípico AA479"	San Luis, Salinas	4	ARJZXX11.0177	100%	4	ARJZXX01.0072	100%	ARIM1108SLJZX-2o	Brote comunitario en contexto de una fiesta. Estudios de agua dieron no apta para el consumo, aunq no se aisló <i>Shigella</i> . De los 4 casos remitidos, 3 con nexo epidemiológico.
Diciembre 2012	2	Nequén, Centenario	7	ARJZXX11.0059 ARJZXX11.0074	97%	NR	-	-	ARIM1212NEJZX-1o	Brote comunitario, asistentes a una fiesta de casamiento.
Febrero 2013	"Atípico AA479"	San Juan, Media Agua	5	ARJZXX11.0035	100%	NR	-	-	ARIM1302SJJZX-1o	Brote comunitario.
Junio 2013	3	Córdoba, Gral. Cabrera	2	ARJZXX11.0291 ARJZXX11.0292	90,3%	NR	-	-	ARIM1306CBJZX-2o	Brote comunitario, sospecha del agua pero no se recuperaron aislamientos. Se aisló <i>S. sonnei</i> y <i>S. flexneri</i> .
Julio 2013	3	Córdoba, Obispo Trejo	2	ARJZXX11.0293	100%	NR	-	-	ARIM1307CBJZX-3o	Dos casos, no se confirmó el nexo epidemiológico.
Julio 2013	"Atípico A479"	Neuquén, Junín de los Andes	4	ARJZXX11.0305 ARJZXX11.0306	97,1 a 100%	3	ARJZXX01.0035	100%	ARIM1307NEJZX-4o	Brote comunitario, reporte por aumento de número de casos.
Febrero 2014	2	Misiones, Oberá	6	ARJZXX11.0059 ARJZXX11.0096	97 a 100%	3	ARJZXX01.0096 ARJZXX01.0097	97,8 a 100%	ARIM1402MIJZX-1o	Brote comunitario, Barrio Santa Rita, detección de aumento del número de casos.
Agosto 2014	"Atípico AA479"	C.A.B.A.	4	ARJZXX11.0330	100%	4	ARJZXX01.0098 ARJZXX01.0099	97,7 a 100%	ARIM1408CFJZX-2o	Brote en un hogar.
Octubre 2014	Y	C.A.B.A.	3	ARJZXX11.0338 ARJZXX11.0348	96,7 a 100%	3	ARJZXX01.0102 ARJZXX01.0103	97,5 a 100%	ARIM1410CFJZX-3o	Brote familiar.

Estos perfiles se encuentran ingresados a la Base de Datos Nacional con el protocolo de *S. flexneri*.

El mes y año indicado corresponde a la ocurrencia del brote, el % de similitud para *NotI*-PFGE y *XbaI*-PFGE observado entre los aislamientos estudiados según el método UPGMA, coeficiente de Dice con una tolerancia del 1,5%, código de brote asignado a cada evento, breve descripción de las circunstancias de cada evento.

RESULTADOS
PARTE 2

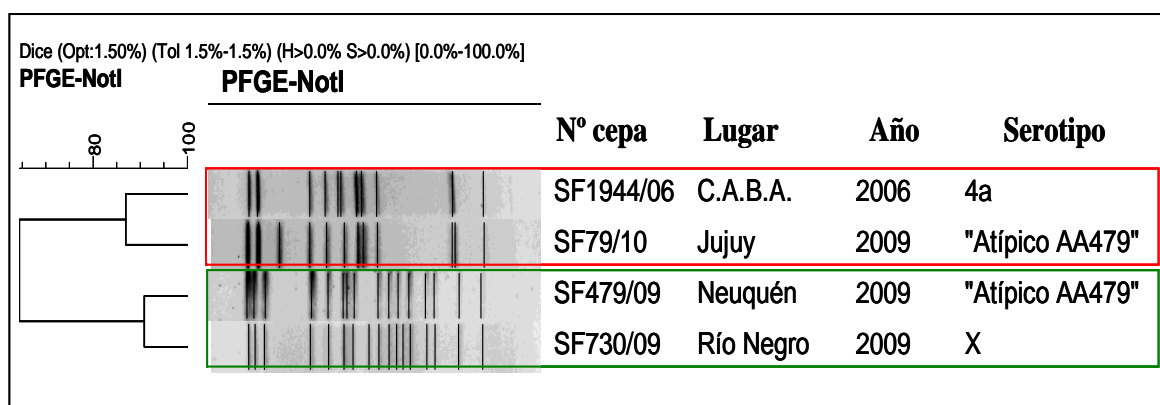
Parte 2- Caracterización molecular de una selección de aislamientos “Atípicos AA479” de *S. flexneri* por PFGE, Mapeo de Genoma Completo (“Whole Genome Mapping” o WGM) y PCR.

2.1 Comparación de genomas por PFGE y WGM

En esta sección, se presentan los resultados del estudio de cuatro aislamientos autóctonos incluyendo “Atípicos AA479” (cepas N° 479/09 y N° 79/10) y otros de serotipo X y 4 para su comparación (cepas N° 730/09 y N° 1944/06, respectivamente), seleccionados para una caracterización más profunda por PFGE y WGM (**Tabla 4**). Además, se incluyó en el análisis por WGM el mapa de restricción de la secuencia de la cepa *S. flexneri* Xv N° 2002017 (número de acceso de GenBank CP001383) perteneciente a un aislamiento de China.

Al generar los dendogramas de relación genética por PFGE de los cuatro aislamientos, se encontró entre el serotipo X y la cepa N° 479/09 una alta relación con 90,9% de similitud y dos bandas de diferencia (**Figura 23, cuadro verde**). Mientras que, el aislamiento de serotipo 4a y la cepa N° 79/10 mostraron relación entre sí con 87% de similitud y tres bandas de diferencia (**Figura 23, cuadro rojo**). Por el contrario, los dos aislamientos “Atípicos” (compatibles con Xv y 4av) mostraron perfiles de PFGE diferentes entre sí, con solo un 64,3% de similitud y 10 bandas de diferencia (**Figura 23**).

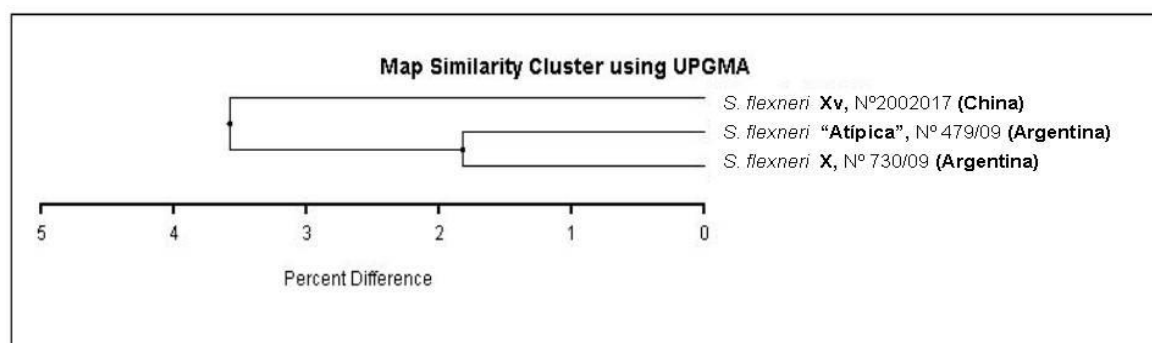
Figura 23: Dendograma de relación genética por *NotI*-PFGE de aislamientos autóctonos: *S. flexneri* serotipo X, 4a y “Atípicos AA479”.



Se señalan en cuadros rojo y verde los aislamientos que muestran mayor relación genética entre sí.

El análisis de los mapas de restricción por WGM de estos cuatro aislamientos de Argentina sumado al generado in-sílico de la secuencia de *S. flexneri* Xv de China, confirmó la relación genética encontrada por PFGE. Se vio que el aislamiento “Atípico AA479” autóctono N° 479/09 mostró más del 98% de similitud (1,8% de diferencia) con el aislamiento serotipo X autóctono, y más del 96% de similitud con la cepa Xv de China (**Figura 24**). Así, los resultados de PFGE y WGM sugieren que el aislamiento “Atípico AA479” probablemente corresponde a la misma variante identificada y estudiada en China, ambas relacionadas con el serotipo X de *S. flexneri*.

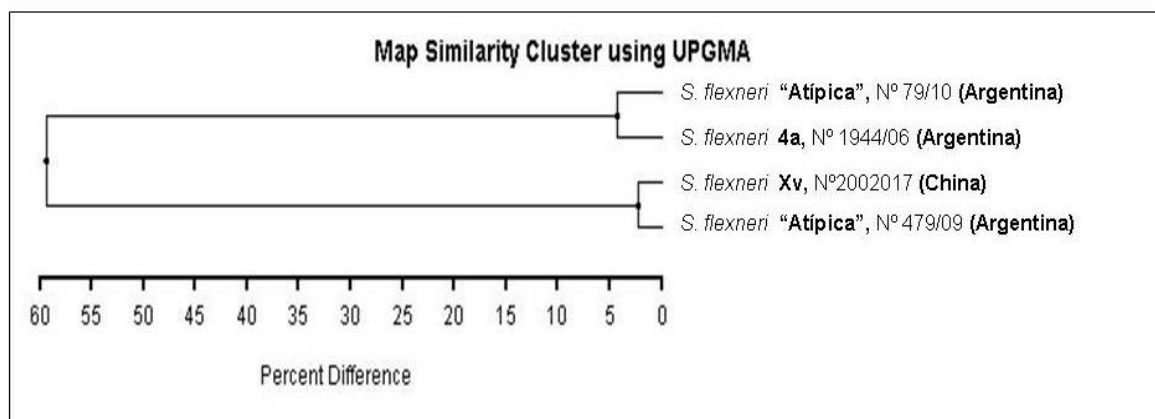
Figura 24: Dendograma de relación genética de los mapas de restricción por Mapeo de Genoma Completo de aislamientos autóctonos “Atípico AA479” y X junto a un aislamiento Xv de origen chino.



El Mapa de Genoma Completo del aislamiento N°2002017 fue generado in-sílico.

Por otra parte, el aislamiento de serotipo 4a y la cepa “Atípica AA479” N° 79/10 resultaron altamente relacionados con el 95% de similitud (5% de diferencia), y muy distantes de los aislamientos Xv de China y “Atípico AA479” N° 479/09, con solo el 40% de similitud (60% de diferencia), confirmando que se trata de linajes y serotipos diferentes aunque comparten el determinante antigénico “E1037” (**Figura 25**).

Figura 25: Dendograma de relación genética de los mapas de restricción por Mapeo de Genoma Completo de aislamientos autóctonos 4a y “Atípicas AA479” junto a un aislamiento Xv de origen Chino.



El Mapa de Genoma Completo del aislamiento N°2002017 fue generado in-silico.

2.2 Caracterización de aislamientos “Atípicos” por serotipificación molecular (PCR múltiple)

En esta sección, se muestran los resultados de serotipificación molecular por PCR múltiple, de 79 aislamientos seleccionados entre los 290 “Atípicos AA479” estudiados por PFGE en la **Parte 1** de este trabajo (**Tabla 5**).

Se identificaron: 59 aislamientos positivos para los genes *wxz₁₋₅*, *gtrX* y *opt* (**Figura 26, cuadro negro**); 14 positivos para *wxz₁₋₅* y *opt* (**Figura 26, cuadro verde**), y 6 positivos para los genes *wxz₁₋₅*, *gtrIV* y *opt* (**Figura 26, cuadro rojo**). Estas variantes serían compatibles con las identificadas como Xv, Yv y 4v, respectivamente.

Figura 26: PCR múltiple de *S. flexneri*, protocolo modificado a partir del desarrollado por Sun y col., 2011.

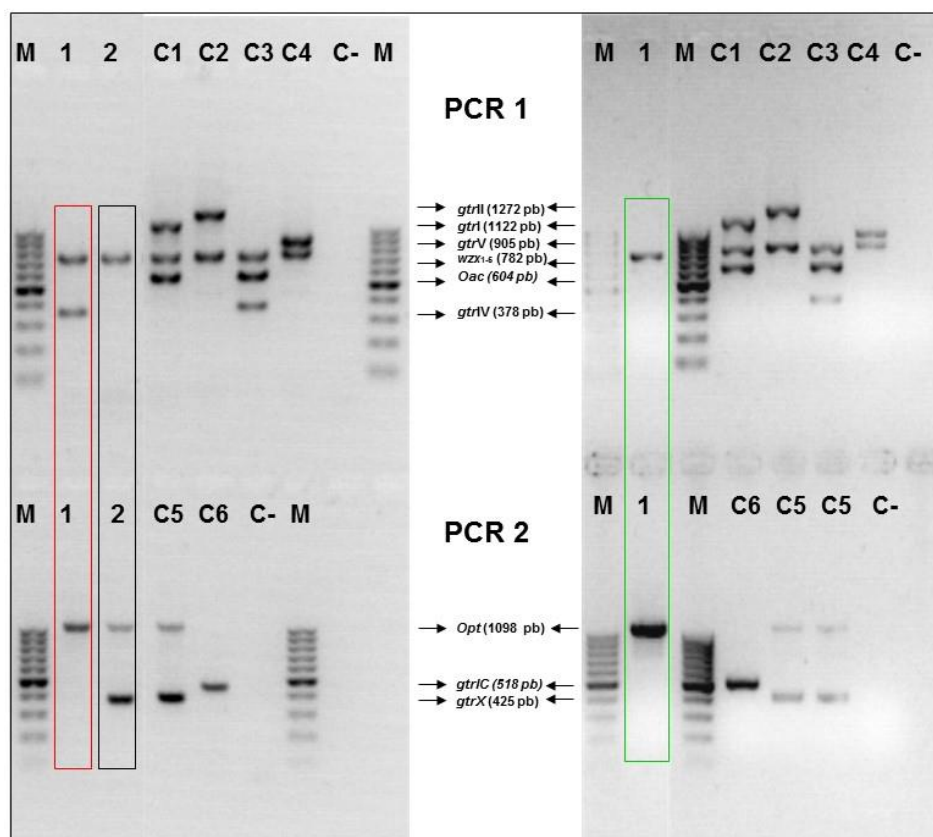


Imagen izquierda: calle 1, cuadro rojo: *S. flexneri* 4av, positivo para *wzx1-5*, *gtrIV* (PCR 1, arriba) y *opt* (PCR 2, abajo); calle 2, cuadro negro: *S. flexneri* Xv, positivo para *wzx1-5*, (PCR 1, arriba), *gtrX* y *opt* (PCR 2, abajo). **Imagen Derecha:** calle 1, cuadro verde: *S. flexneri* Yv, positivo para *wzx1-5* (PCR 1, arriba) y *opt* (PCR 2, abajo).

M: marcador de peso molecular 100bp. **C1:** cepa control *S. flexneri* 1b, **C2:** cepa control *S. flexneri* 2b, **C3:** cepa control *S. flexneri* 4b, **C4:** cepa control *S. flexneri* 5a, **C5:** cepa control *S. flexneri* Xv, **C6:** cepa control *S. flexneri* 1c, **C-:** control negativo (agua).

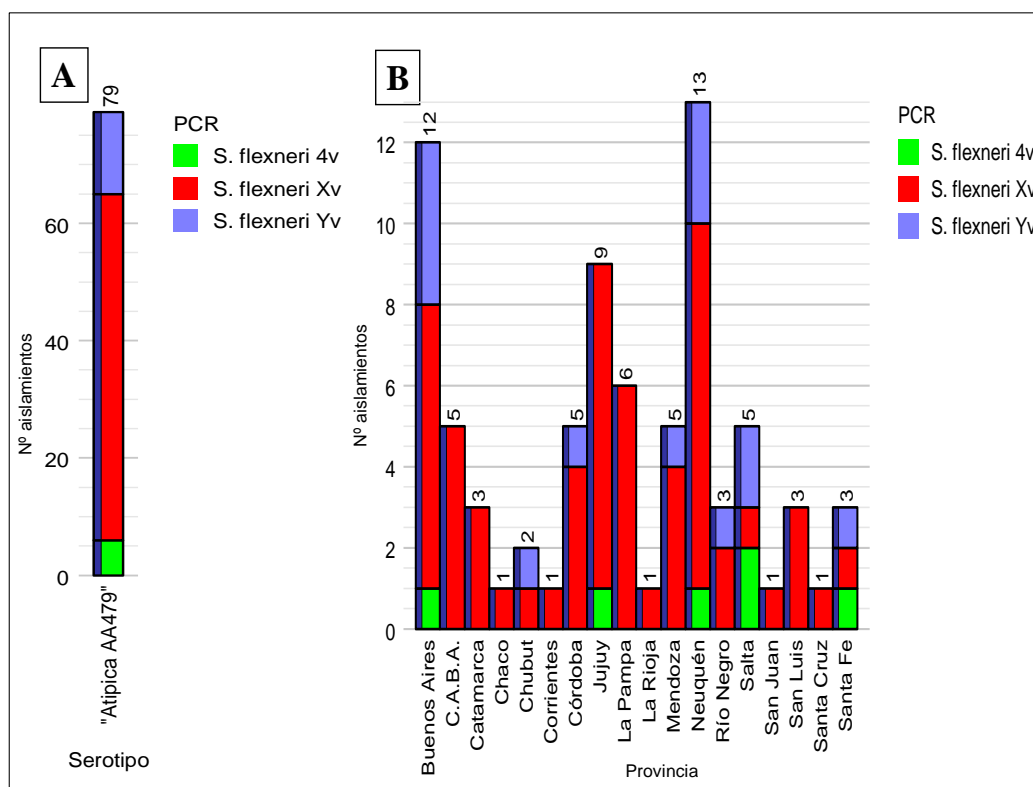
Como se detalló en la **Parte 1 - sección 1.3.8**, estos aislamientos fueron identificados en 17 provincias y C.A.B.A, en la **Figura 27** se muestran los resultados de PCR por provincia. En todas ellas se identificaron aislamientos compatibles con *S. flexneri* Xv, en ocho provincias compatibles con *S. flexneri* Yv y en cinco provincias compatibles con *S. flexneri* 4av.

Además, se determinó que los aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos AA479” estudiados por PFGE asociados a cuatro brotes (**Tabla 8**), fueron en todos los casos positivos para los genes *wzx1-5*, *gtrX* y *opt* (compatibles con Xv).

Figura 27: Aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos AA479” estudiados por PCR.

A) Cantidad de aislamientos de cada serotipo identificado por PCR.

B) Distribución por provincia de aislamientos “Atípicos AA479” estudiados por PCR.



En el extremo superior de cada barra se señala el número de aislamientos indicado por cada barra.

2.3 Relación genética por PFGE de las nuevas variantes “Atípicas AA479” identificadas por PCR.

Se realizaron nuevos dendogramas incluyendo solo aislamientos “Atípicos AA479” cuyo serotipo había sido identificado por PCR, a fin de analizar la relación genética entre los diferentes serotipos y subserotipos identificados dentro de este grupo.

Al estudiar la ubicación en el árbol total descrito en sección 1.2 de la Parte 1 de Resultados, de los 59 aislamientos de *S. flexneri* identificados por PCR como *S. flexneri* Xv, se vio que 53 se ubicaron en la Rama 1 (Figura A1, Anexo) que agrupaba a la mayoría de los aislamientos “Atípicos AA479”, otros 3 aislamientos estaban ubicados en la Rama 7 (Figura A7, Anexo) y los restantes 3 aislamientos ubicados en la Rama 8 (Figura A8, Anexo),

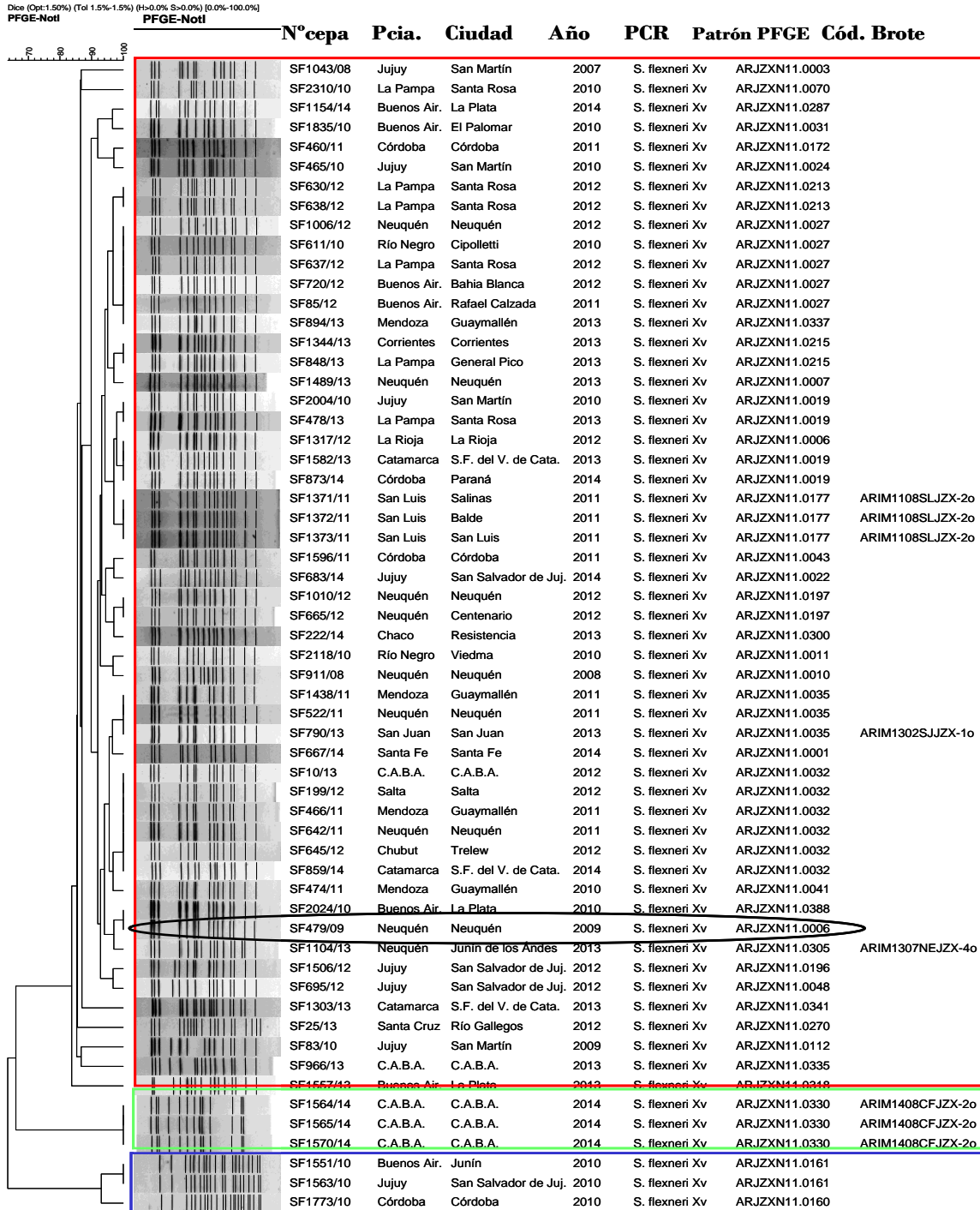
(Figura 10 A y B).

Comparando solo a los 59 aislamientos entre sí, se observó la misma tendencia: una gran rama principal con similitud entre el 84 y 100% que agrupó a 53 aislamientos (**Figura 28, Rama A**) que se correspondería con la Rama 1 del árbol general (**Figura 10**), y otros dos grupos de menor relación genética que comprendieron tres aislamientos cada uno. El primero, con 66% de similitud respecto a la rama A, incluyó 3 aislamientos recuperados con dos meses de diferencia en 2014 en el mismo Hospital Pediátrico de C.A.B.A (**Figura 28, Rama B**), incluidos en la Rama 8 del árbol total (**Figura 10**). Mientras que los tres aislamientos del otro grupo, fueron recuperados en el mismo año, 2010, pero en distintas provincias (**Figura 28, Rama C**), incluidos en la Rama 7 del árbol total (**Figura 10**).

Cabe mencionar que la cepa N° 479/09, utilizada para la obtención del antisuero diagnóstico y como prototipo en los análisis de WGM mostró un perfil de PFGE incluido en la rama mayoritaria **A**, como se ve en la **Figura 28**.

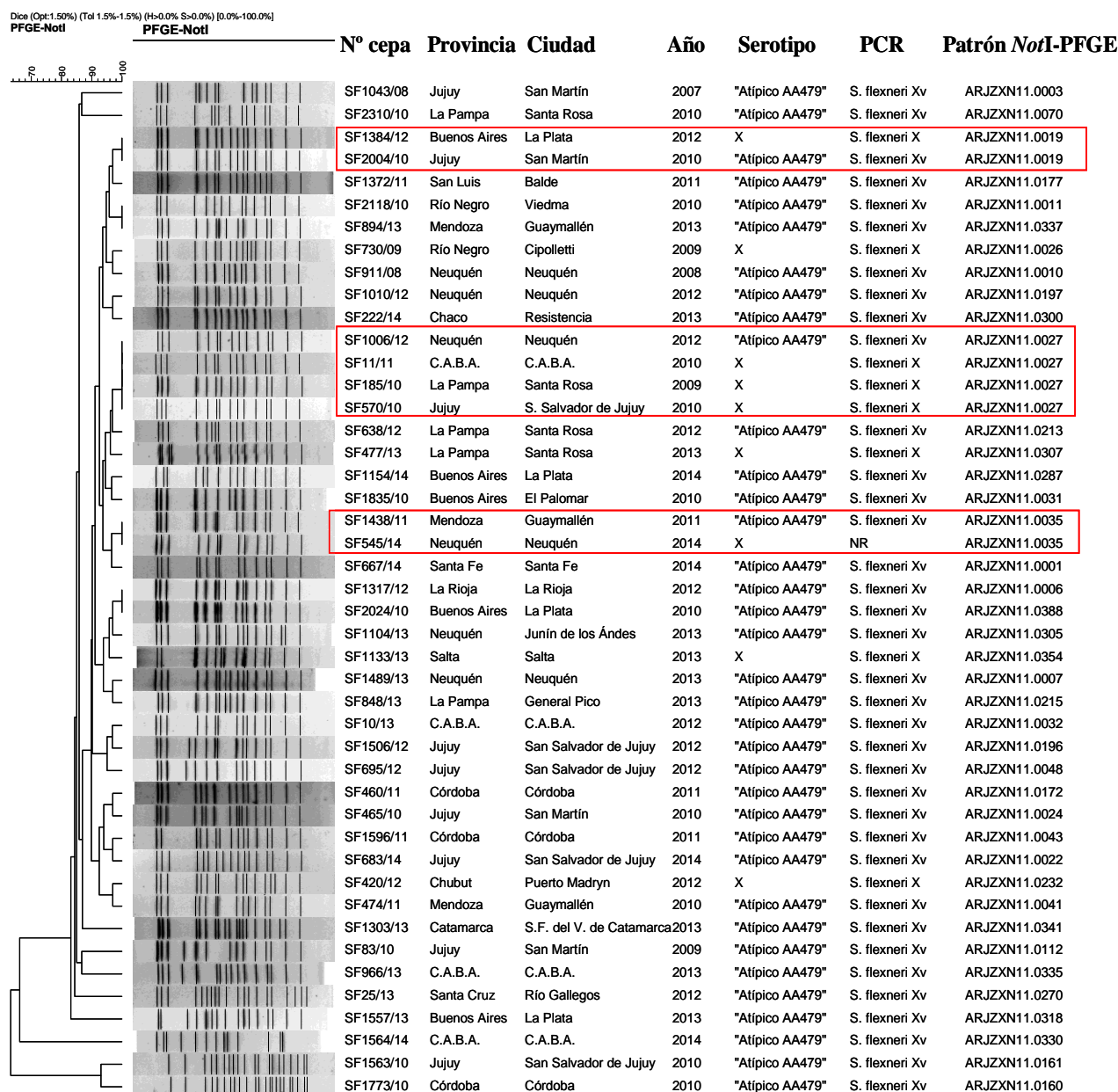
Al agruparlos junto con el serotipo X, se encontró que tres subtipos de los aislamientos compatibles con Xv mostraron 100% de similitud con patrones del serotipo X (**Figura 29, cuadros rojos**).

Figura 28: Dendograma de relación genética por *NotI*-PFGE de 59 aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos AA479” identificados por PCR como serotipo Xv.



Se señalan en cuadros tres ramas de agrupamiento de perfiles genéticos (A, B y C) y en oval negro la cepa Nº 479/09, utilizada como prototipo de aislamientos “Atípicos” emergentes en Argentina para su estudio por Mapeo de Genoma Completo y para la obtención del antisuero diagnóstico.

Figura 29: Dendograma de relación genética por *NotI*-PFGE de aislamientos de *S. flexneri* identificados por PCR como serotipo Xv y 9 aislamientos de serotipo X.

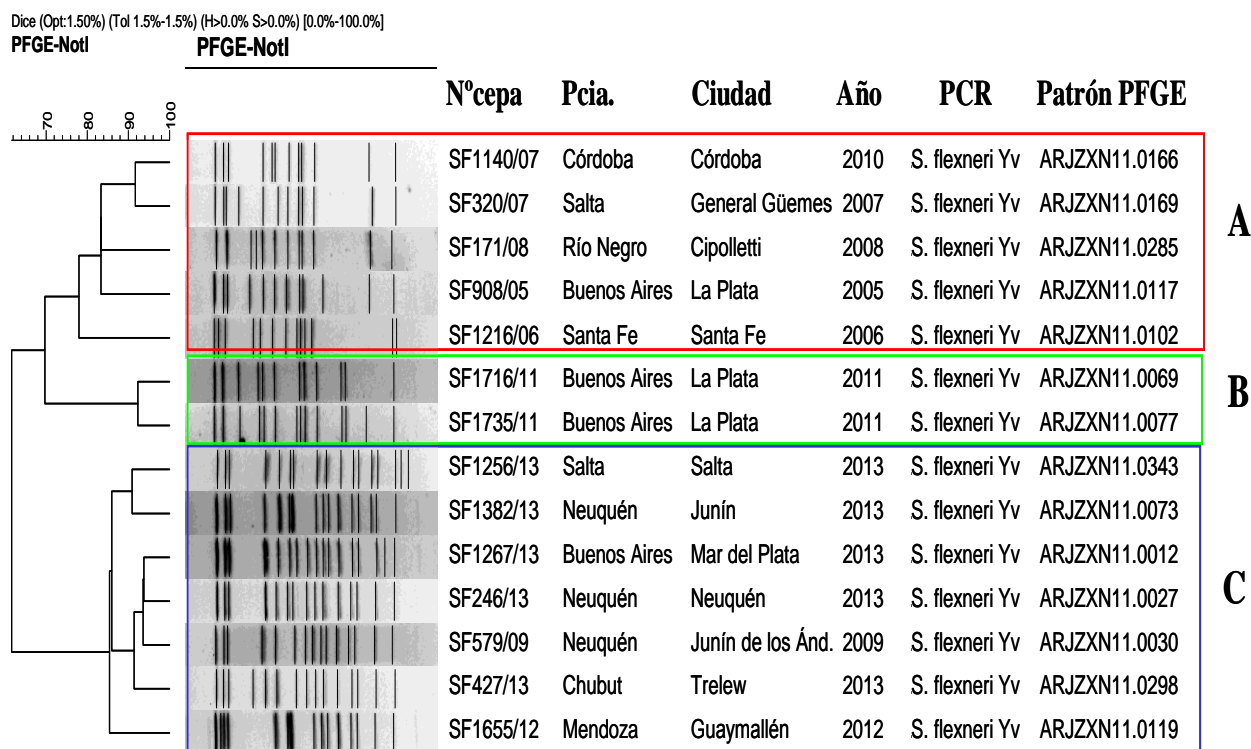


Se seleccionó un aislamiento de serotipo Xv representativo de cada patrón de PFGE obtenido. En cuadros rojos se señalan aislamientos de ambos serotipos que mostraron un patrón de bandas con 100% de similitud.

De los aislamientos identificados como positivos para *wxz*₁₋₅ y *opt* (compatible con Yv), en el árbol general seis de ellos mostraron mayor relación genética con los aislamientos de la Rama 1 (Figura 10, Figura A1, Anexo) y siete con los de la Rama 8 (Figura 10, Figura A8, Anexo). Uno solo de estos aislamientos (Nº 1655/12) se agrupó junto a cepas de serotipo 1 y 3 de la Rama 3 (Figura 10, Figura A3, Anexo).

Al hacer un dendograma de comparación entre los perfiles de los 14 aislamientos entre sí, se observaron dispuestos en tres grupos diferenciados. Un grupo con similitud entre sus perfiles mayor al 85%, con cinco aislamientos recuperados entre 2005 y 2010 en distintas provincias (**Figura 30, Rama A**). Otro, compuesto solo por dos aislamientos con 92% de similitud y una sola banda de diferencia, ambos de 2011 y remitidos por el mismo Hospital Pediátrico de La Plata (**Figura 30, Rama B**). El tercero, agrupó a siete aislamientos de variadas regiones y años (**Figura 30, Rama C**) (**Figura 30**).

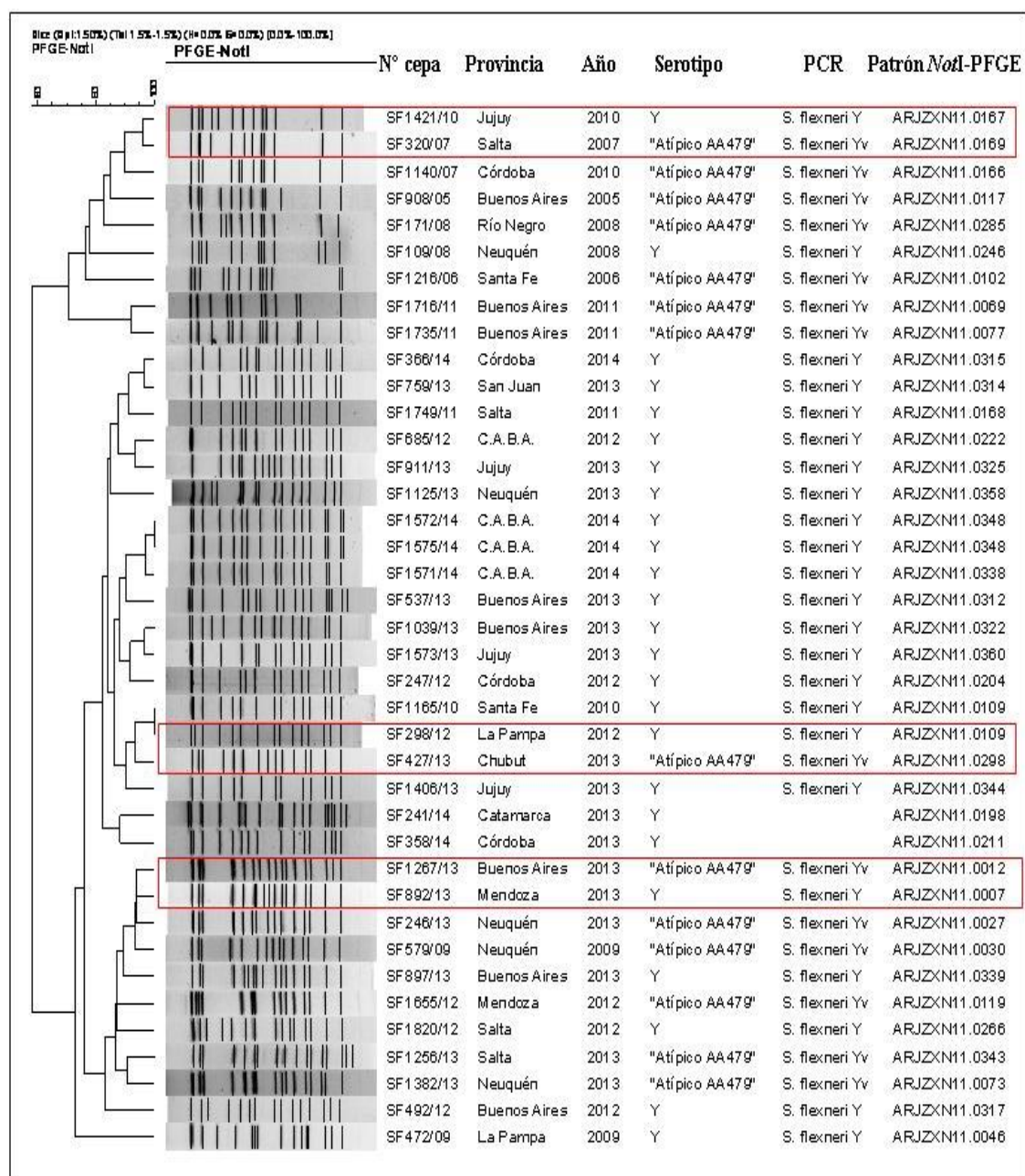
Figura 30: Dendograma de relación genética por *NotI*-PFGE de 14 aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos AA479” identificados por PCR como serotipo Yv.



Se señalan en cuadros rojo, verde y azul las ramas de agrupamiento de perfiles genéticos (**A, B y C**).

Cuando se compararon incluyendo los perfiles del serotipo Y, se encontraron perfiles con gran similitud (una sola banda de diferencia), pero ninguno mostró identidad del 100% (**Figura 31**).

Figura 31: Dendograma de relación genética por *NotI*-PFGE de 14 aislamientos de *S. flexneri* Yv y 25 aislamientos de serotipo Y.



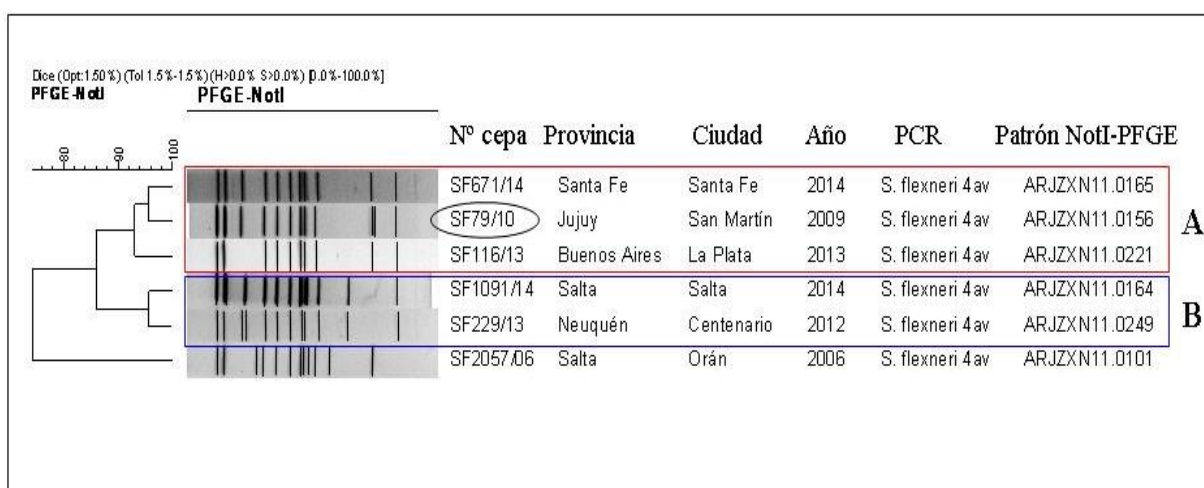
Se señalan en cuadros rojos aislamientos Y e Yv que mostraron perfiles con una sola banda de diferencia.

Por último, analizando la ubicación en el dendrograma general de los seis aislamientos “Atípicos AA479” identificados por PCR como compatibles con *S. flexneri* 4av, se observó que se ubicaron todos en la Rama 8 (Figura 10, Figura A8, Anexo), la más distante y de

menor similitud con el resto de los perfiles genéticos (ver **Resultados, Parte 1, punto 1.2**).

Al comparar estos aislamientos entre sí, se observaron dos ramas. Una con 3 aislamientos con más de 93% de similitud (1 a 2 bandas de diferencia), (**Figura 32, Rama A**) que incluyó cepas procedentes de Jujuy, Santa Fe y Buenos Aires, de 2010, 2013 y 2014; y otra compuesta por dos aislamientos de Salta y Neuquén con 95% de similitud y una banda de diferencia (**Figura 32, Rama B**). El aislamiento restante mostró un perfil genético diferente, con 74% de similitud con respecto a las dos ramas mencionadas y entre 4 y 8 bandas de diferencia con los demás subtipos; cabe destacar que este aislamiento fue también el más alejado en el tiempo, ya que se aisló en 2006 (**Figura 32**).

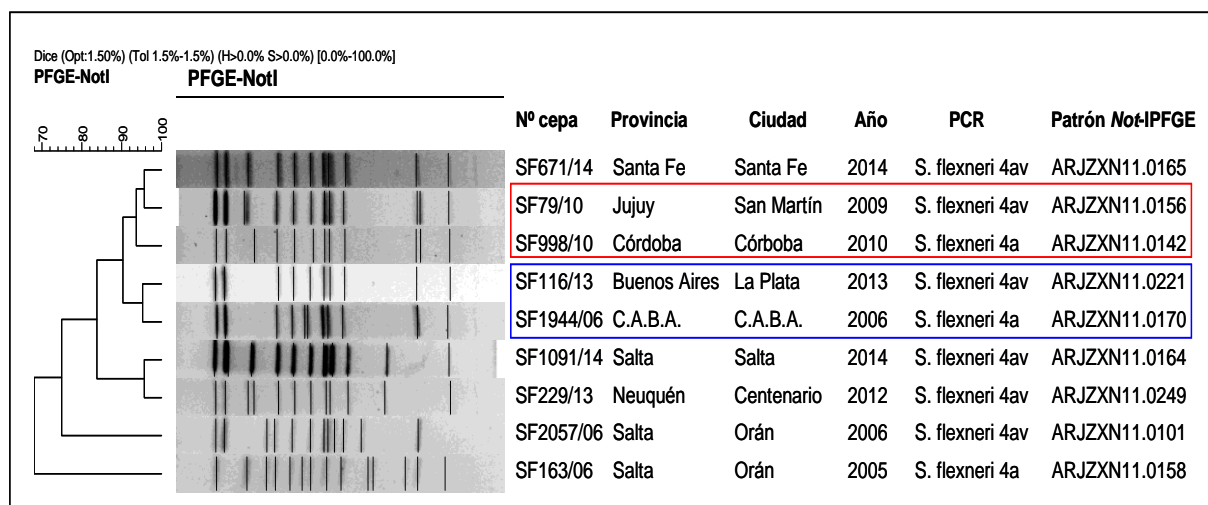
Figura 32: Dendograma de relación genética por *NotI*-PFGE de 6 aislamientos de *S. flexneri* “Atípicos AA479” identificados por PCR como serotipo 4av.



Se señalan en cuadros de color rojo y azul las ramas de agrupamiento de perfiles con mayor relación genética (**A** y **B**) y en óvalo negro el aislamiento N° 79/10, utilizado como prototipo de aislamientos “Atípicos AA479” emergentes en Argentina para su estudio por Mapeo de Genoma Completo.

Al incluir en la comparación también a los tres aislamientos de serotipo 4a, se observó alta relación genética entre los perfiles del 4av. En la **Figura 31**, se señalan dos grupos compuestos por ambos serotipos, en los dos casos con diferencia de una sola banda (**Figura 33**).

Figura 33: Dendograma de relación genética por *NotI*-PFGE de aislamientos de *S. flexneri* 4a y 4av.



Se señalan en cuadros rojo y azul los grupos de perfiles de ambos serotipos altamente relacionados entre si, con una sola banda de diferencia.

DISCUSIÓN

Las enfermedades diarreicas agudas constituyen una de las mayores causas de morbimortalidad en niños menores de 5 años, principalmente en los países en desarrollo, según datos de la Organización Mundial de la Salud

(http://www.who.int/immunization/highlights/2015/immunization_highlights_2015_full/en/index3.html).

Las diarreas bacterianas representan aproximadamente entre el 10 y el 20% de todas las diarreas. Dentro de estas, *Shigella* spp. es el patógeno bacteriano más frecuentemente aislado, y *S. flexneri* el serogrupo prevalente. En Argentina se observa el mismo escenario, según los datos recabados por el Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, el Sistema de Vigilancia Laboratorial y el Laboratorio de Referencia Nacional de la Red de Diarreas, *Shigella* es el principal agente etiológico aislado en muestras de casos de diarreas agudas en menores de 5 años y presenta un comportamiento estacional con aumento de casos en verano. También *S. flexneri* es el serogrupo prevalente a nivel global en el país, siendo causal de infecciones esporádicas y brotes (Boletín Integrado de Vigilancia N° 128 - SE 28, 2012; Boletín Integrado de Vigilancia N° 203 - SE 3, 2014).

Desde fines de la década de los '90, se incorporaron en el LNR técnicas de subtipificación molecular que permitieron desarrollar estudios de diversidad genética de diferentes patógenos de transmisión alimentaria, como *Salmonella* spp., *E. coli* productor de toxina Shiga y *Shigella* spp, entre otros. La aplicación de protocolos estandarizados de PFGE, en el marco de la Red PulseNet, fue de gran utilidad para implementar la vigilancia por epidemiología molecular de estos patógenos y ha sido aplicado además al estudio de brotes, como también para la caracterización de subtipos circulantes en el país y su comparación con los de otras regiones (Brenji y col., 2010; Brenji y col., 2012; Campos y col., 2011; Della Gáspera y col., 2015; Pichel y col., 2007; Viñas y col., 2012; Viñas y col., 2013).

En el presente trabajo, se pudo aplicar un protocolo de PFGE validado para *S. flexneri* (Pichel y col., 2012) para la subtipificación y análisis de la diversidad genética y diseminación témporo-espacial de una selección de aislamientos (algunos de ellos retrospectivamente) de distintos serotipos recibidos en el LNR. Como resultado, se logró obtener una Base de Datos Nacional (BDN) con 840 perfiles genéticos que cuenta con aislamientos recuperados durante 10 años en todo el país (2004-2014) constituyendo una herramienta valiosa en la vigilancia y estudio de brotes causados por este patógeno. Esta base de datos cuenta con aislamientos de 21 provincias y C.A.B.A, quedaron fuera del análisis Santiago del Estero y Tierra del Fuego por no enviar aislamientos (excepto 5 remitidos por Tierra del fuego en 2004 que no fueron

seleccionados por ser los únicos del periodo). En este aspecto, se destaca la importancia de mejorar y reforzar la vigilancia en estos lugares.

La diversidad genética de *S. flexneri* fue amplia, encontrándose 404 perfiles genéticos diferentes (subtipos), dentro de los cuales hubo aislamientos que solo mostraron una relación genética en el dendograma correspondiente a una similitud del 59.5 %.

Se incluyeron en la BDN los perfiles de PFGE de 7 serotipos (1, 2, 3, 4, 6, X e Y) y de aislamientos “Atípicos AA479” (entre los cuales en este trabajo se identificaron por PCR 3 serotipos variantes diferentes). Los serotipos 2 y “Atípicos AA479”, estuvieron representados igualitariamente en la BDN, representando aproximadamente un tercio de los aislamientos totales cada uno (33,9 y 34,5 %), este hecho puede explicarse en el primer caso dada la prevalencia en el país del serotipo 2 durante todo el período de estudio (50,8 % de las cepas recibidas en el LNR), y en el segundo caso debido al uso del PFGE como herramienta para una primera caracterización de estas cepas emergentes en 2009 (hasta que se contó con el antisuero AA479 y la serotipificación molecular) y a su aumento al segundo lugar de prevalencia después del serotipo 2 desde 2010. Estos factores hicieron que ambos serotipos fuesen estudiados en mayor porcentaje que el resto. De igual modo, de los serotipos 1, 3 y 6 que siguieron en prevalencia en este periodo (14,2%; 14.1% y 4%) fueron analizados por PFGE en porcentajes similares y cercanos al 10% (11,7, 9,5 y 12,7 %). Esto se vio reflejado en el hecho de que las cantidades incluidas en la BDN (12,9, 10,4 y 3,9 %) fuesen similares a la prevalencia nacional de estos serotipos según los datos del LNR.

En cuanto a los serotipos poco frecuentes, X e Y, cabe destacar que comenzaron a determinarse en mayor número a partir de la incorporación en la serotipificación de *S. flexneri* de la PCR múltiple descrita en este trabajo. Se incorporaron a la BDN 9 y 25 aislamientos de dichos serotipos (22% y 42% de los remitidos al LNR) y se planifica incrementar este porcentaje para poder obtener un mayor conocimiento de estos subtipos genéticos.

En relación al serotipo 4, en el LNR se tipificaron 55 aislamientos entre 2004-2014 (todos previos al 2010, excepto uno de 2013), de los cuales solo se estudiaron por PFGE tres de ellos, para los cuales la serología fue re-confirmada por PCR múltiple (correspondiendo al subserotipo 4a). Esto se debe, a que en muchas ocasiones al no disponer de antisuero de tipo 4 del INPB, se utilizaba el antisuero comercial Denka Seiken, que según se comprobó en diversas publicaciones (Ye y col., 2010; Sun y col., 2012) como durante el desarrollo de esta tesis, muestra reacción cruzada con los aislamientos que presentan el determinante antigénico “E1037” como los “Atípicos” aquí estudiados (pudiendo pertenecer a cualquiera de los 3

serotipos variantes descriptos). Por este motivo, no se incorporarán a la BDN otros aislamientos de serotipo 4 hasta confirmar su tipificación con antisuero monovalente del INPB o bien por PCR múltiple, para descartar que no se trate de serotipos Xv, Yv o 4av que dieron positivos para el tipo IV por reacción cruzada. Si bien el número de cepas estudiadas no permitió hacer un análisis profundo de la diversidad y diseminación de este serotipo, fueron incluidos para poder compararlos con los identificados como serotipo 4av, de relevancia para este trabajo.

Por último, el serotipo 5 es también muy poco frecuente en Argentina, especialmente en los últimos años. Se tipificaron en el LNR 57 aislamientos durante el periodo de estudio, representando el 0,9% del total, de los cuales el 81% se recuperaron antes de 2009. Dada la baja prevalencia de este serotipo a partir de este año, no se priorizó su estudio retrospectivo por PFGE. Se cuenta con dos aislamientos de este serotipo en la BDN, los cuales fueron analizados en el marco del estudio multicéntrico de validación del protocolo de PFGE, pero no se incluyeron en el análisis de este trabajo dado el bajo número.

Lo antes mencionado, da cuenta de que esta BDN cuenta con datos representativos de todos los serotipos y los emergentes “Atípicos AA479, salvo el 4 y 5, lo cual es de relevancia para su uso en vigilancia, pudiendo detectar tempranamente la emergencia de nuevos subtipos circulantes, así como para el estudio de brotes. Para extender esto a todos los serotipos circulantes, son tareas pendientes a realizar en el LNR la incorporación de aislamientos de los serotipos 4 y 5.

En cuanto a la relación genética dentro de los distintos serotipos, se observó que en general, los aislamientos de cada uno se agruparon formando ramas en el dendograma con mayor relación genética entre sí que con otros serotipos. Así, los serotipos 1, 2, 3, 6, X, Y y Atípicos, agruparon al 97%, 99,6%, 72,4%, 100%, 89% y 76% de sus aislamientos, respectivamente, en ramas diferenciadas unas de otras. Sin embargo, salvo para el serotipo 6 que agrupó al 100% de sus aislamientos en una rama bien diferenciada, se encontró cierta diversidad dentro de un mismo serotipo, permitiendo la aplicación de PFGE para la subtipificación molecular y estudios de brotes. El hecho de que los perfiles genéticos de *S. flexneri* serotipo 6 no hayan agrupado junto a otros serotipos, como ocurrió en otros casos, es concordante con los estudios que postulan un origen independiente y evolución convergente de los distintos serogrupos y serotipos del género (incluso de *E. coli*) y en particular en relación al serotipo 6, que tanto por estudios fenotípicos (estructura del antígeno O) y genotípicos (de secuencias genómicas) muestran que forma un linaje separado de los demás

serotipos e incluso mas relacionado con el serogrupo *S. boydii* (Ashton y col., 2014; Connor y col., 2015).

Al calcular el índice de diversidad de cada serotipo (I) (total de aislamientos sobre cantidad de perfiles de PFGE), se observó que los dos que presentaron mayores índices, y por ende puede inferirse menor diversidad genética, son los serotipo 2 y Atípicos (I= 2,66 y 2,59 respectivamente). Mientras que los serotipos 1, 3 y 6 con índices más cercanos a 1 (I= 1,58 y I= 1,38, I= 1,37, respectivamente) presentarían mayor diversidad genética. Los demás serotipos, mostraron incluso menores índices (mayor diversidad), pero a la vez se encuentran menos representados en la BDN, con lo cual puede ser necesario analizar un mayor número de aislamientos antes de afirmar que se trata de serotipos menos clonales que los antes mencionados (serotipo X con un I= 1,28 y N= 9, serotipo Y con un I= 1.04 y N= 25 y serotipo 4 con un I= 1 y N= 3).

Al analizar la diversidad genética dentro de cada serotipo, en el caso de *S. flexneri* 2, se observó que 29% de los aislamientos mostraron un perfil de bandas único, y 46% estuvieron agrupados en 3 subtipos genéticos mayoritarios, los cuales a su vez fueron causales de brotes en distintos lugares y momentos. Dos de estos subtipos, además fueron identificados tanto antes como después de los brotes en la misma provincia así como en otras. Por ejemplo, el patrón ARJZN11.0020, causal de un brote en C.A.B.A. en 2006, fue identificado ya desde 2005 y hasta 2014 también en otras 11 provincias. El patrón ARJZN11.0059 que causó 3 brotes (C.A.B.A., 2011; Neuquén, 2012 y Misiones, 2014) fue encontrado en casos esporádicos de la misma provincia en años previos a la ocurrencia de dichos brotes, así como en otras 10 provincias, en ambos casos, estos perfiles fueron los dos mas frecuentes des serotipo 2 incluidos en la BDN.

Los aislamientos “Atípicos AA479” fueron detectados en 2009. Sin embargo, cuando se analizaron aislamientos no tipificables previos a ese año, 8 fueron también identificados como “Atípicos AA479”. De éstos, 7 mostraron perfiles genéticos que no volvieron a encontrarse en los aislamientos estudiados de años posteriores, pero 1 de Neuquén de 2008, fue luego recuperado en la misma provincia en 2009 y más tarde en C.A.B.A, en 2012 y 2013. Los demás aislamientos previos a 2009, se aislaron en distintos lugares, demostrando que ya circulaban en el país desde al menos 2005 (2005 en Bs. As.; 2006 en Salta y Santa Fe; 2007 en Salta y Jujuy; 2008 en Córdoba y Río Negro). Por otra parte, se encontraron cuatro grupos de mayor similitud en sus perfiles genéticos, uno de ellos incluyó a la mayoría de los

aislamientos (93%) y en los otros 3 se encontraron ciertas características particulares: un grupo formado solo por aislamientos de un brote, otro por aislamientos de un solo año y el tercero por aislamientos portadores de genes compatibles con las variantes Yv y 4av. Además, entre los 112 subtipos genéticos, el 29% (N=83) fueron patrones únicos y un 41% (N=119) distribuido en 4 patrones mayoritarios. Se determinó en estos últimos, una amplia diseminación y persistencia en el tiempo, habiéndose identificado a estos patrones en al menos 7 sitios y en más de un año. Hubo casos donde hubo persistencia en tiempo y lugar e incluso asociación a brotes (Patrón ARJZXN11.0027, brote en Neuquén en 2012, subtipo presente desde al menos 2009; ARJZXN11.0032 persistente en C.A.B.A. y Neuquén).

El serotipo 1, con 71 perfiles genéticos diferentes, se estudió principalmente en 5 provincias (80% de los aislamientos) y a partir del 2010. Se cuenta con pocos aislamientos de años previos (N=5) y de otras 10 provincias de donde se incluyeron entre 1 y 4 aislamientos de cada una. No se estudiaron brotes por este serotipo en este periodo y el patrón mayoritario agrupó al 24% de los aislamientos estudiados (N= 17), recuperados en 8 provincias y C.A.B.A. entre 2010 y 2014. Entre el resto de los patrones, no se observó mayor persistencia en un lugar.

En cuanto al serotipo 3, cuando se observó su ubicación en el árbol total de relación genética, se vio que en muchos casos se agrupaban en medio de aislamientos del serotipo 1. Por este motivo se realizó PCR de 25 aislamientos para confirmar el resultado, encontrándose que 10 dieron resultados compatibles con el serotipo 1b. Cabe destacar que el serotipo 3 no presenta factores antigénicos de tipo y su detección tanto serológica como genética se basa en los factores grupales, uno de los cuales es compartido por los serotipos 3 y 1b (FG6 o gen *oac*). Queda sin responder si la falta de detección del antígeno de tipo 1 fenotípicamente se debió a falencias en los ensayos de serotipificación o si el gen fue detectado en la cepa pero el antígeno no estaba siendo expresado, por alguna mutación u otra posible causa genética. La representatividad geográfica fue baja en este serotipo, contando la BDN con perfiles de 5 provincias principalmente aunque hay también de 1 a 3 perfiles de otras 12; y en cuanto a los años, los aislamientos ingresados en la BDN fueron mayoritariamente de 2010 en adelante (87%).

En el serotipo 6, la diversidad encontrada fue mayor aún, con 18 patrones únicos, y un patrón mayoritario encontrado en 5 ocasiones, solo se cuentan con dos o mas aislamientos de 6 provincias (de otras 4 se analizaron solo un aislamiento).

En el serotipo Y, la situación fue similar, ya que dentro de los 25 aislamientos estudiados, solo dos mostraron idéntico perfil, y correspondieron a casos asociados a un brote.

En cuanto a la diseminación de los subtipos en tiempo y espacio, no pueden sacarse conclusiones, debida a la escasa información disponible, solo se disponen más de dos aislamientos a partir de 2012, los cuales se encontraron en más de una localización.

Por último, los 9 aislamientos estudiados del serotipo X, se encontraron en la Rama principal que agrupó al 93% (N= 268) de los aislamientos “Atípicos AA479”, de los cuales 59 fueron estudiados por PCR, siendo en su mayoría (53) del serotipo Xv, denotando la relación genética entre ambos serotipos.

Entonces, en relación a los perfiles genéticos encontrados dentro de los serotipos mas prevalentes: 2, “Atípicos AA479”, 3 y 1, se pudo demostrar que existen determinados subtipos clonales con capacidad de persistir en el tiempo, y que además están ampliamente diseminados en el territorio nacional bajo vigilancia, que oportunamente fueron y podrían en el futuro volver a ser causales de un aumento en el número de infecciones y/o de eventos de brote.

En conclusión, dado que en el LNR se siguen los lineamientos de la Red de subtipificación de patógenos bacterianos “PulseNet” por medio de protocolos estandarizados y validados, fue posible la creación de bases de datos de perfiles genéticos circulantes en el país. Esto permitió comparar, intra e inter-laboratorio, los perfiles genéticos de patógenos transmitidos por alimentos para su vigilancia. En la región de Latinoamérica y Caribe, ya existen bases de datos regionales de *Salmonella*, *Shigella sonnei*, *E coli O157*, *Campylobacter* y *Vibrio Cholerae*.

En este trabajo se ha mostrado el proceso de creación de una BDN de perfiles genéticos por PFGE de *S. flexneri* para su vigilancia a nivel nacional. A raíz de esto, prontamente se establecerá también una base de datos regional para *Shigella flexneri* lo que permitirá que Argentina y los demás países de la región que integran la Red PulseNet, ingresen sus perfiles genéticos, permitiendo el análisis de la distribución y diseminación de los subtipos, como su asociación a brotes, a nivel regional.

A partir de la incorporación a la BDN de un gran número de aislamientos causales de casos esporádicos y de brotes de diarrea, se pudo obtener un conocimiento de los subtipos clonales existentes en el país, así como su diseminación témporo-espacial. Esto, constituye una herramienta muy valiosa para la vigilancia epidemiológica así como para la investigación de brotes. Respecto a esto último, se mostró en este trabajo que el PFGE constituye una valiosa herramienta de estudio y confirmación de brotes, pero a su vez los resultados obtenidos del estudio de diversidad y diseminación, destacan la importancia de contar con un estudio epidemiológico para poder sacar conclusiones, ya que la identificación de un mismo

subtipo genético no es un hallazgo inusual y solo en un contexto epidemiológico dado puede ser confirmatorio de la ocurrencia de tal evento. En ocasiones, no se cuenta con dicho estudio, con lo cual solo puede identificarse al grupo de perfiles como un “*cluster*” de aislamientos (idénticos genéticamente y recuperados en un lapso de tiempo acotado), esto de todos modos es de relevancia, ya que puede contribuir a una detección temprana desde el laboratorio. Por último, esta herramienta demostró ser de utilidad en otro tipo de estudios de relevancia clínica, como por ejemplo, frente a un caso de vaginitis a repetición en una niña, donde los estudios por PFGE sugirieron que se trataba de una recidiva o bien reinfección a partir de la misma fuente de infección persistente en el ambiente de la niña.

Por otra parte, gracias a la vigilancia realizada para los enteropatógenos en el país, entre ellos *Shigella flexneri*, tanto por los laboratorios provinciales en el marco de la Red de Diarreas, como en el LNR, se identificó en 2009 la emergencia de nuevos serotipos circulantes denominados en ese momento como “Atípicos”, los cuales pudieron ser estudiados tempranamente por PFGE. Se demostró alta relación genética entre ellos y distinta a los aislamientos hasta ese momento estudiados, sugiriendo la emergencia de un nuevo serotipo. En este trabajo, se obtuvieron importantes resultados que ayudaron al conocimiento y mayor caracterización de estos aislamientos “Atípicos”, que habían sido previamente reportados con similares características en otras regiones del mundo (Taludker y col., 2001; Taludker y col., 2002; Ye y col., 2010; Perepelov y col., 2009; Sun y col., 2012).

A partir de su primera identificación en 2009 en unas pocas provincias, estos aislamientos comenzaron a producir cada vez un mayor número de casos hasta llegar a ser aislados de casos esporádicos como de brotes en 21 provincias y C.A.B.A, siendo el segundo serotipo más frecuente en los últimos años, después del serotipo 2, tendencia que continúa hasta la actualidad.

Los estudios aquí reportados, abarcaron tanto PFGE, técnica “*Gold standard*” en epidemiología molecular y ampliamente utilizada en el mundo para la vigilancia como para el estudio de brotes, así como “Mapeo de Genoma Completo o “Whole Genome Mapping” (WGM), que tiene mayor resolución que el PFGE dado que el genoma es digerido con enzimas de restricción de alta frecuencia de corte, mientras que en el PFGE se utilizan enzimas de corte poco frecuente. Dado que esta última tecnología no se encuentra disponible en el país y que su costo es mucho más elevado, estos estudios fueron realizados en un número reducido de cepas, en colaboración con el Dr. Roberto Melano, del OAHPP-NIH, Canadá. Los resultados obtenidos por PFGE confirmados con una técnica más discriminatória

como WGM mostraron que los aislamientos autóctonos tipificados por serología como X y X portador del gen *opt* (“Atípico AA479”) mostraron estar altamente relacionados con el 90,9% y 98% de similitud por cada técnica, respectivamente. Lo novedoso y concluyente, fue que se pudo incluir en la comparación el patrón de bandas obtenido “*in-silico*” del aislamiento Chino Xv N° 2002017, cuya secuencia se encontraba disponible en GenBank. Se encontró una similitud en los perfiles de esta cepa Xv de origen Chino y el aislamiento “Atípico” autóctono de más del 96%, sugiriendo una alta relación genética. También se demostró la alta relación genética de los aislamientos 4a y 4a portador del gen *opt* (“Atípico AA479”), confirmando que eran variantes del mismo serotipo (se los postula como subserotipos).

La tercera metodología aplicada al estudio de estos aislamientos “Atípicos AA479”, fue una PCR múltiple de punto final. Este protocolo demostró ser útil en la tipificación de todos los serotipos conocidos de *S. flexneri*, incluidos Xv, Yv y 4av, según la denominación propuesta por Sun y col., así como para otros serotipos aún no encontrados en el país (1d) y otros recientemente identificados como el “1c” o serotipo 7 según se postula a nivel internacional (Brenji y col., 2017, Jakheta y col., 2014). Es una excepción el serotipo 6, el cual se identifica en una reacción simple complementaria (Sun y col., 2011; Sun y col., 2012). Dado que su implementación fue sencilla, y su costo accesible, se pudo analizar por PCR un gran número de aislamientos tipificados como “Atípicos AA479” con el antisuero de producción local “AA479”, el cual fue demostrado que correlaciona con el antisuero MASF IV-I para la detección del antígeno E1037 (van der Ploeg y col., 2015; Viñas y col., 2012), llegando a determinar el serotipo en un mayor número de cepas. Esta metodología de serotipificación molecular por PCR resultó en una herramienta de especial utilidad para la identificación serotipos y subserotipos de *S. flexneri*, incluyendo los recientemente descritos, en comparación con la tipificación por la técnica convencional (serología), (Brenji y col., 2016). Además del antisuero “AA479”, producido con relativa facilidad, se precisarían para poder discriminar al serotipo “Atípico” más frecuentemente aislado (Xv), el antisuero FG7,8, el cual no es provisto regularmente por el INPB, debido a su difícil y costosa elaboración; mientras que los reactivos comerciales resultan inaccesibles por su costo para ser usados de rutina en un alto número de ensayos. Las cepas que fuesen negativas para el FG 7,8, deberían enfrentarse con el antisuero monovalente de tipo 4 de producción local, que dada la baja frecuencia de este serotipo en el país se encuentra disponible de manera limitada y además no es distribuido en la Red de Diarreas. En este caso no hay una alternativa comercial, ya que como se mencionó previamente, el antisuero de tipo IV de Denka Seiken, muestra reacción

cruzada con el determinante antigénico “E1037” presente en los aislamientos “Atípicos AA479”, y el antisuero monoclonal, MASF IV-2, tiene un costo demasiado elevado.

Por último, los aislamientos que fuesen negativos con el FG7,8 y FT4, corresponderían al serotipo Yv. Por todo esto, la detección por serología de estos nuevos serotipos, en muchos casos no sería posible ni aún en el LNR, quedando muchos aislamientos con la tipificación incompleta.

Por otra parte, aplicar la serotipificación molecular, permitiría también obtener una tipificación completa de todos los demás serotipos, pudiendo identificar además el subserotipo.

Consideramos que esto es esencial y relevante, tanto para el LNR como para su transferencia a los laboratorios de la Red de Diarreas y a otros laboratorios de Argentina que pudieran requerir la implementación de este análisis.

Por todos los resultados de caracterización mencionados en este trabajo para los aislamientos emergentes en el país denominados “Atípicos AA479” (PFGE, WGM y PCR), concluimos que las cepas circulantes a nivel local pertenecían a las mismas variantes identificadas en otras regiones del mundo, principalmente en China.

Hasta tanto se lleve a cabo una revisión consensuada a nivel mundial para la clasificación y nomenclatura de *S. flexneri*, proponemos adoptar en el país las designaciones sugeridas por Sun y col, llamando a las variantes locales de la misma manera: “Xv” (X variante) a las cepas portadoras de los genes *gtrX* y *opt*; “Yv” (Y variante) a las cepas portadoras únicamente del gen *opt* y “4av” (4a variante) a las cepas portadoras de los genes *gtrIV* y *opt* (Brenji y col., 2016).

Como conclusiones de esta segunda parte del presente trabajo, podemos decir que a través del estudio por técnicas de mayor resolución se pudo determinar la relación genética con una variante reportada en China y diseminada en otros países.

A su vez, la incorporación de una técnica de fácil implementación y moderado costo, permitió contar con una identificación completa de los serotipos “Atípicos” circulantes, que a través de la técnica tradicional por serología, no resultaba posible de ser realizada en porcentaje mayor de aislamientos, perdiéndose valiosa información. Se logró así determinar que existen tres nuevos serotipos circulantes y diseminados en el país (Brenji y col., 2016).

Dado que el gen *opt*, responsable de la modificación del LPS con un grupo fosfoetanolamina que da lugar al determinante antigénico “E1037” esta codificado en un plásmido, se sugiere que podría potencialmente ser adquirido por otros serotipos de *S.*

flexneri. Si bien hasta el momento solo se lo ha encontrado en aislamientos de serotipo Y, X y 4, en ensayos de laboratorio, se ha logrado transformar cepas de todos los serotipos con este plásmido confiriéndoles un fenotipo “E1037” positivo, lo que sugiere que potencialmente lo mismo podría ocurrir en la naturaleza (Sun y col., 2013, Sun y col., 2014).

De acuerdo a lo antes mencionado, se destaca la importancia de continuar con la vigilancia epidemiológica de este patógeno, principal agente bacteriano asociado a casos de diarreas en Argentina, para detectar tempranamente cambios en la diseminación y prevalencia de los subtipos circulantes en el país, así como la identificación de serotipos y subserotipos circulantes, información que además oportunamente pueda ser relevante en el contexto del desarrollo de formulaciones vacunales en estudio, las cuales constituyen una posible vía de control y prevención.

***CONCLUSIONES
FINALES***

CONCLUSIONES FINALES

En este trabajo, se muestran los resultados del análisis de una amplia selección de aislamientos incluidos en la Base de Datos Nacional de subtipos genéticos de *S. flexneri* por PFGE. Esta metodología, considerada hasta el momento “*Gold standard*” en epidemiología molecular, es aplicada en nuestro laboratorio desde los inicios del 2000, y desde 2009 se cuenta con un protocolo específico para esta especie.

Pudieron obtenerse los perfiles genéticos de 840 aislamientos, considerando el periodo 2004-2014, tipificados en su mayoría (99%) en el marco de la Red de Diarrea, como parte del rol como centro de referencia nacional para *Shigella*.

El análisis de estos perfiles de PFGE, permitió establecer la diversidad genética de la especie, identificándose 404 patrones diferentes. De éstos, 329 fueron únicos, es decir que fueron identificados en 1 solo aislamiento. Los restantes 436 aislamientos estudiados se agruparon en 75 perfiles diferentes, muchos de ellos analizados particularmente en este trabajo por ser considerados mayoritarios, ampliamente diseminados y persistentes. Así, se demostró la gran diversidad que presenta este microorganismo, a la vez que se identificaron subtipos clonales circulantes ampliamente diseminados en todo el país y persistentes a lo largo del tiempo.

Se pudo determinar que solo los aislamientos del serotipo 6, agruparon en un 100% en una rama bien diferenciada del resto de los serotipos, denotando la importancia para el resto de los serotipos de contar con una serotipificación previa acertada. Esto va en consonancia con la evidencia de transferencia horizontal de los genes asociados a la expresión de antígenos somáticos en *S. flexneri*, de manera que serotipificación y PFGE resultan necesarios y complementarios para una caracterización más precisa en el marco de la vigilancia.

Se analizaron los perfiles de bandas por serotipo, encontrándose que los más representados y que también mostraron menor diversidad genética fueron los serotipos 2 y “Atípicos AA479”, respectivamente. Los serotipos que siguen en frecuencia en nuestro país, 1, 3 y 6, mostraron mayor diversidad en sus subtipos genéticos. Los demás serotipos ingresados en la base de datos, Y, X, y 4 también mostraron gran diversidad, sin embargo no cuentan con un gran número de cepas, con lo cual no pueden sacarse demasiadas conclusiones acerca de su clonalidad y resulta de importancia continuar ingresando perfiles de estos serotipos en la BDN.

Esta BDN, así como la información aquí obtenida, constituye la base para continuar con la vigilancia epidemiológica y estudio de brotes por *S. flexneri*, así como la detección de nuevos subtipos y/o nuevas variantes diseminadas en el país, como ya ocurrió con las

variantes “Atípicas AA479”, que fueron oportunamente estudiadas por PFGE, determinándose que pertenecían a un grupo genético diferente a los estudiados hasta el momento.

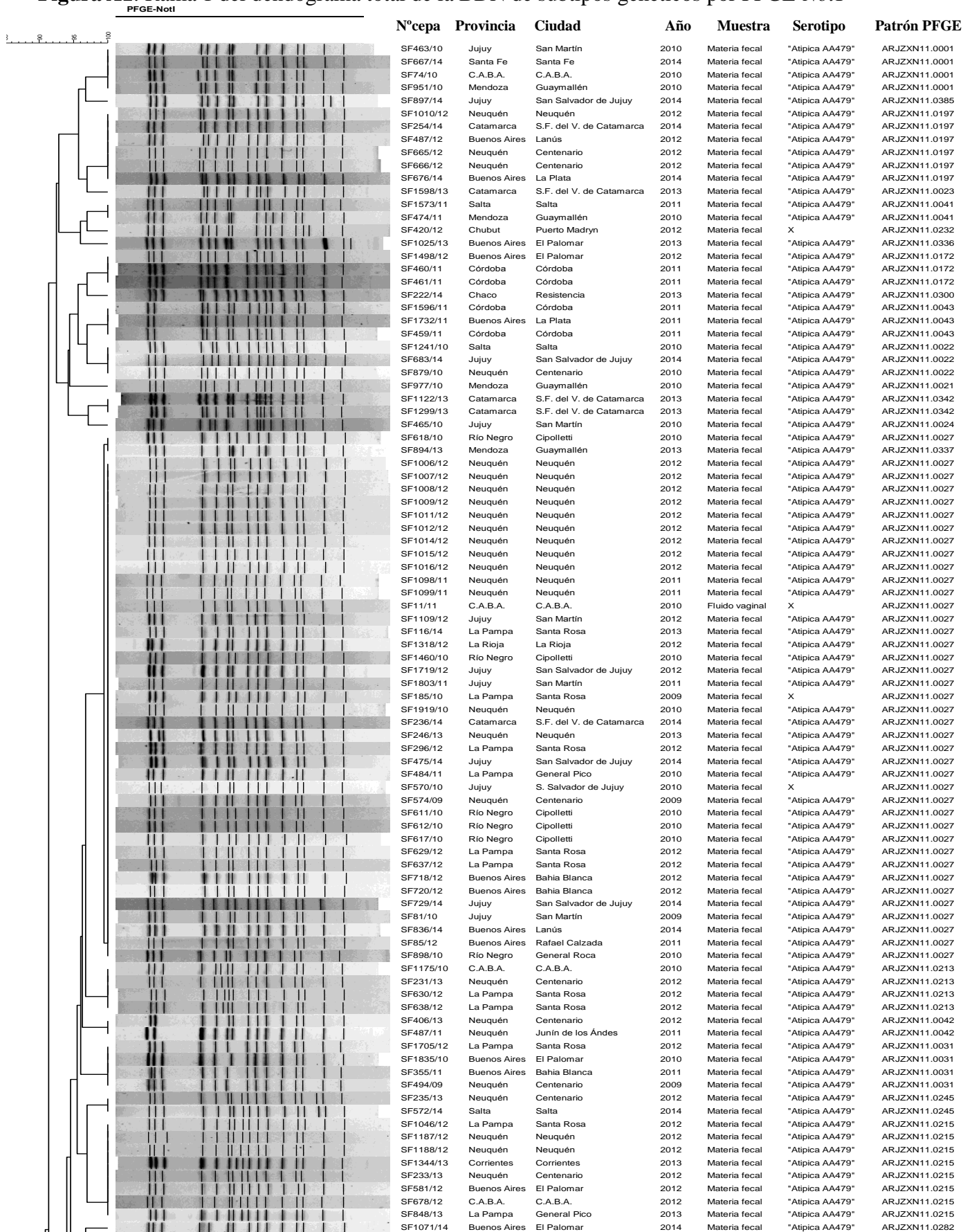
En relación a lo último mencionado, en este trabajo se estudiaron por tres métodos genotípicos, aislamientos “Atípicos” emergentes, estableciéndose que pertenecían a tres serotipos nunca antes identificados en el país, los cuales son denominados en la bibliografía reciente como “Xv”, “Yv” y “4av” provisionalmente, hasta tanto se establezca una nomenclatura consensuada a nivel mundial. Primero fueron estudiados 2 aislamientos “Atípicos AA479”, estableciéndose que mostraban similitud con el serotipo X y 4a en cada caso. Por medio de su estudio por Mapeo de Genoma Completo, herramienta de epidemiología molecular de alta resolución, se confirmó este resultado, y adicionalmente se estableció la identidad genética del aislamiento que había mostrado mayor relación con el serotipo X, con un aislamiento de origen Chino, bien caracterizado como serotipo Xv.

Por último, se estudió por PCR una mayor cantidad de aislamientos autóctonos “Atípicos AA479”, portadores del antígeno E1037, el cual fue encontrado a nivel mundial hasta el momento en los serotipos Xv, Yv y 4av. Se identificaron en las 79 cepas estudiadas, aislamientos pertenecientes a los 3 serotipos.

La PCR realizada en este trabajo, fue implementada como herramienta para la serotipificación molecular de este patógeno, otorgándole al LNR la capacidad de identificar no solo todos los serotipos, sino también los subserotipos descriptos hasta el momento en la bibliografía, incluyendo las 3 variantes mencionadas, emergentes en el país en los últimos años, lo cual no sería posible mediante la técnica serológica tradicional dada la disponibilidad actual de reactivos en el LNR y en la Red de Diarreas. Este protocolo podrá ser transferido fácilmente a la Red y a otros laboratorios de Argentina que lo requieran.

ANEXO

Figura A1: Rama 1 del dendograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-NotI



cont. Figura A1

	N°cepa	Provincia	Ciudad	Año	Muestra	Serotipo	Patrón PFGE	Cód. Brote
	SF477/13	La Pampa	Santa Rosa	2013	Materia fecal	X	ARJZXN11.0307	
	SF1569/12	Chubut	Trelew	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF77/10	Jujuy	San Martín	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF1639/11	Salta	Salta	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF1710/12	Río Negro	Cipolletti	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF558/12	Santa Cruz	Río Gallegos	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF567/09	Neuquén	Centenario	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF639/12	La Pampa	Santa Rosa	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF738/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF1260/13	Buenos Aires	Mar del Plata	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF134/13	Río Negro	General Roca	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF1383/12	Buenos Aires	La Plata	2012	Fluido vaginal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF1384/12	Buenos Aires	La Plata	2012	Fluido vaginal	X	ARJZXN11.0019	
	SF1433/12	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF1493/13	Salta	Salta	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF1556/10	Río Negro	General Roca	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF1567/11	Jujuy	San Salvador de Jujuy	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF1582/13	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF1861/10	La Pampa	Santa Rosa	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF2004/10	Jujuy	San Martín	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF207/11	Neuquén	Neuquén	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF230/13	Neuquén	Centenario	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF2309/10	La Pampa	Santa Rosa	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF245/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF394/14	Buenos Aires	La Plata	2014	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF428/13	Chubut	Trelew	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF461/10	Jujuy	San Martín	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF467/10	Jujuy	San Martín	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF470/10	Jujuy	San Martín	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF478/09	Neuquén	Neuquén	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF478/13	La Pampa	Santa Rosa	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF564/09	Neuquén	Centenario	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF566/09	Neuquén	Centenario	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF66/10	Jujuy	San Martín	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF713/13	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF751/14	Salta	Salta	2014	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF873/14	Córdoba	Paraná	2014	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF997/10	Córdoba	Córdoba	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0019	
	SF714/13	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0036	
	SF1305/11	Neuquén	Junín de los Andes	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0176	
	SF1306/11	Neuquén	Junín de los Andes	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0176	
	SF178/11	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0011	
	SF2118/10	Río Negro	Viedma	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0011	
	SF137/11	San Luis	Salinas	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0177	ARIM1108SLJZX-2o
	SF1372/11	San Luis	Balde	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0177	ARIM1108SLJZX-2o
	SF1373/11	San Luis	San Luis	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0177	ARIM1108SLJZX-2o
	SF1374/11	San Luis	Salinas	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0177	ARIM1108SLJZX-2o
	SF1696/12	Buenos Aires	Junín	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0367	
	SF1267/13	Buenos Aires	Mar del Plata	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0012	
	SF412/09	Neuquén	Neuquén	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0051	
	SF563/09	Neuquén	Centenario	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0013	
	SF1311/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF1317/12	La Rioja	La Rioja	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF1391/13	Salta	Salta	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF140/13	Salta	Salta	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF1575/11	Salta	Salta	2011	Espuito	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF571/09	Neuquén	Centenario	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF735/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF736/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF737/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF826/10	Buenos Aires	La Plata	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0006	
	SF255/13	Buenos Aires	La Plata	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0028	
	SF1489/13	Neuquén	Neuquén	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0007	
	SF892/13	Mendoza	Guaymallén	2013	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0007	
	SF232/13	Neuquén	Centenario	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0007	
	SF613/14	Buenos Aires	Mar del Plata	2014	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0007	
	SF568/09	Neuquén	Centenario	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0014	
	SF1028/14	Buenos Aires	Lanús	2014	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0320	
	SF1264/12	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0231	
	SF1801/11	Jujuy	San Martín	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0007	
	SF1500/11	Jujuy	San Salvador de Jujuy	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0033	
	SF2080/09	Neuquén	Neuquén	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0033	
	SF10/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2012	Fluido vaginal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF1100/11	Neuquén	Neuquén	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF1314/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF1384/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF1505/12	Jujuy	San Salvador de Jujuy	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF1551/11	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF199/12	Salta	Salta	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF203/11	Neuquén	Neuquén	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF260/14	Santa Fe	Santa Fe	2013	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF41/12	Salta	Salta	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF449/11	San Luis	San Luis	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF451/11	San Luis	San Luis	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF457/11	Córdoba	Córdoba	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF466/11	Mendoza	Guaymallén	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF467/11	Mendoza	Guaymallén	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF470/11	Mendoza	Guaymallén	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF507/12	Jujuy	San Salvador de Jujuy	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF558/09	Neuquén	Plottier	2009	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF60/14	Buenos Aires	Mar del Plata	2014	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF642/11	Neuquén	Neuquén	2011	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF645/12	Chubut	Trelew	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF859/14	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2014	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	
	SF942/10	Mendoza	Guaymallén	2010	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0032	

cont. Figura A1

	Nº cepa	Provincia	Ciudad	Año	Muestra	Serotipo	Patrón PFGE	Cód. Brote
	SF81/12	Jujuy	San Salvador de Jujuy	2011	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0056	
	SF1506/12	Jujuy	San Salvador de Jujuy	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0196	
	SF857/14	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2014	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0196	
	SF1029/10	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF1096/11	Neuquén	Neuquén	2011	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF1097/11	Neuquén	Neuquén	2011	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF1411/11	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2011	Fluido vaginal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF1413/11	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2011	Fluido vaginal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF1438/11	Mendoza	Guaymallén	2011	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF1439/11	Mendoza	Guaymallén	2011	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF1479/10	Mendoza	Guaymallén	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF17/12	Salta	Salta	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF204/11	Neuquén	Neuquén	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF469/10	Jujuy	San Martín	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF522/11	Neuquén	Neuquén	2011	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF523/11	Neuquén	Neuquén	2011	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF545/14	Neuquén	Neuquén	2014	Materia fecal	X	ARJZXN11.0035	
	SF556/12	Santa Cruz	Río Gallegos	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF598/12	Buenos Aires	Lanús	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF790/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	ARIM1302SJJZX-10
	SF793/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	ARIM1302SJJZX-10
	SF796/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	ARIM1302SJJZX-10
	SF797/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	ARIM1302SJJZX-10
	SF798/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	ARIM1302SJJZX-10
	SF978/10	Mendoza	Guaymallén	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF981/10	Mendoza	Guaymallén	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF684/12	Neuquén	Centenario	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF980/10	Mendoza	Guaymallén	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0035	
	SF566/12	Jujuy	San Martín	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0214	
	SF739/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0066	
	SF388/11	Buenos Aires	La Plata	2011	Materia fecal	1	ARJZXN11.0390	
	SF2024/10	Buenos Aires	La Plata	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0388	
	SF749/14	Salta	Salta	2014	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0388	
	SF479/09	Neuquén	Neuquén	2009	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0006	
	SF146/14	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0040	
	SF897/13	Buenos Aires	Guaymallén	2013	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0339	
	SF1565/13	Jujuy	San Salvador de Jujuy	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0072	
	SF232/11	Córdoba	Córdoba	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0067	
	SF1382/13	Neuquén	Junín	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0073	
	SF254/12	La Rioja	La Rioja	2011	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0386	
	SF1104/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0305	ARIM1307NEJZX-40
	SF1105/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0305	ARIM1307NEJZX-40
	SF1106/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0305	ARIM1307NEJZX-40
	SF1103/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0306	ARIM1307NEJZX-40
	SF1133/13	Salta	Salta	2013	Materia fecal	X	ARJZXN11.0354	
	SF777/10	Buenos Aires	La Plata	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0009	
	SF16/11	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2011	Fluido vaginal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0061	
	SF944/10	Mendoza	Guaymallén	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0064	
	SF819/13	Buenos Aires	La Plata	2013	Fluido vaginal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0353	
	SF473/11	Mendoza	Guaymallén	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0034	
	SF1363/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0010	
	SF911/08	Neuquén	Neuquén	2008	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0010	
	SF1583/13	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0324	
	SF314/12	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0010	
	SF493/09	Neuquén	Centenario	2009	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0010	
	SF1376/12	Buenos Aires	La Plata	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0233	
	SF721/12	Buenos Aires	Bahía Blanca	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0224	
	SF730/09	Río Negro	Cipolletti	2009	Materia fecal	X	ARJZXN11.0026	
	SF1159/13	Chaco	Resistencia	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0352	
	SF572/09	Neuquén	Centenario	2009	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0025	
	SF1303/13	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0341	
	SF1343/13	Corrientes	Corrientes	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0340	
	SF818/13	Buenos Aires	La Plata	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0316	
	SF1154/14	Buenos Aires	La Plata	2014	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0287	
	SF206/11	Neuquén	Neuquén	2011	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0173	
	SF427/13	Chubut	Trelew	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0298	
	SF83/10	Jujuy	San Martín	2009	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0112	
	SF1037/13	Salta	Salta	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0355	
	SF579/09	Neuquén	Junín de los Andes	2009	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0030	
	SF1013/12	Neuquén	Neuquén	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0329	
	SF1186/12	Neuquén	Neuquén	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0088	
	SF937/09	Córdoba	Córdoba	2009	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0085	
	SF1563/08	Córdoba	Córdoba	2008	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0037	
	SF573/09	Neuquén	Centenario	2009	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0038	
	SF214/11	La Pampa	Santa Rosa	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0070	
	SF2310/10	La Pampa	Santa Rosa	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0070	
	SF743/09	La Pampa	Santa Rosa	2009	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0039	
	SF896/13	Mendoza	Guaymallén	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0334	
	SF1820/12	Salta	Salta	2012	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0266	
	SF695/12	Jujuy	San Salvador de Jujuy	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0048	
	SF952/10	Mendoza	Guaymallén	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0004	
	SF413/12	Jujuy	San Martín	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0242	
	SF1557/13	Buenos Aires	La Plata	2013	Fluido vaginal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0318	
	SF1446/12	Santa Fe	Santa Fe	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0269	
	SF599/14	Buenos Aires	Mar del Plata	2014	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0393	
	SF1850/12	Mendoza	Guaymallén	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0268	
	SF1868/10	Neuquén	Neuquén	2010	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0087	
	SF25/13	Santa Cruz	Río Gallegos	2012	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0270	
	SF524/13	Neuquén	Junín de los Andes	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0294	
	SF1043/08	Jujuy	San Martín	2007	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0003	
	SF591/11	Córdoba	Córdoba	2011	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0175	
	SF1256/13	Salta	Salta	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0343	
	SF294/09	Buenos Aires	La Plata	2009	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0080	
	SF966/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0335	
	SF255/09	Santa Fe	Santa Fe	2009	Materia fecal	*Atípica AA479*	ARJZXN11.0082	
	SF492/12	Buenos Aires	El Palomar	2012	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0317	
	SF66/05	Río Negro	S. C. de Bariloche	2005	Materia fecal	3	ARJZXN11.0128	

Figura A2: Rama 2 del dendograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-NotI

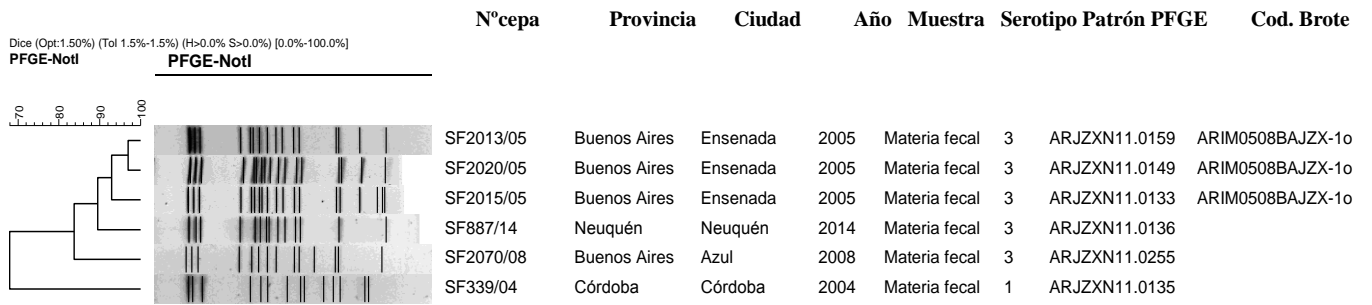
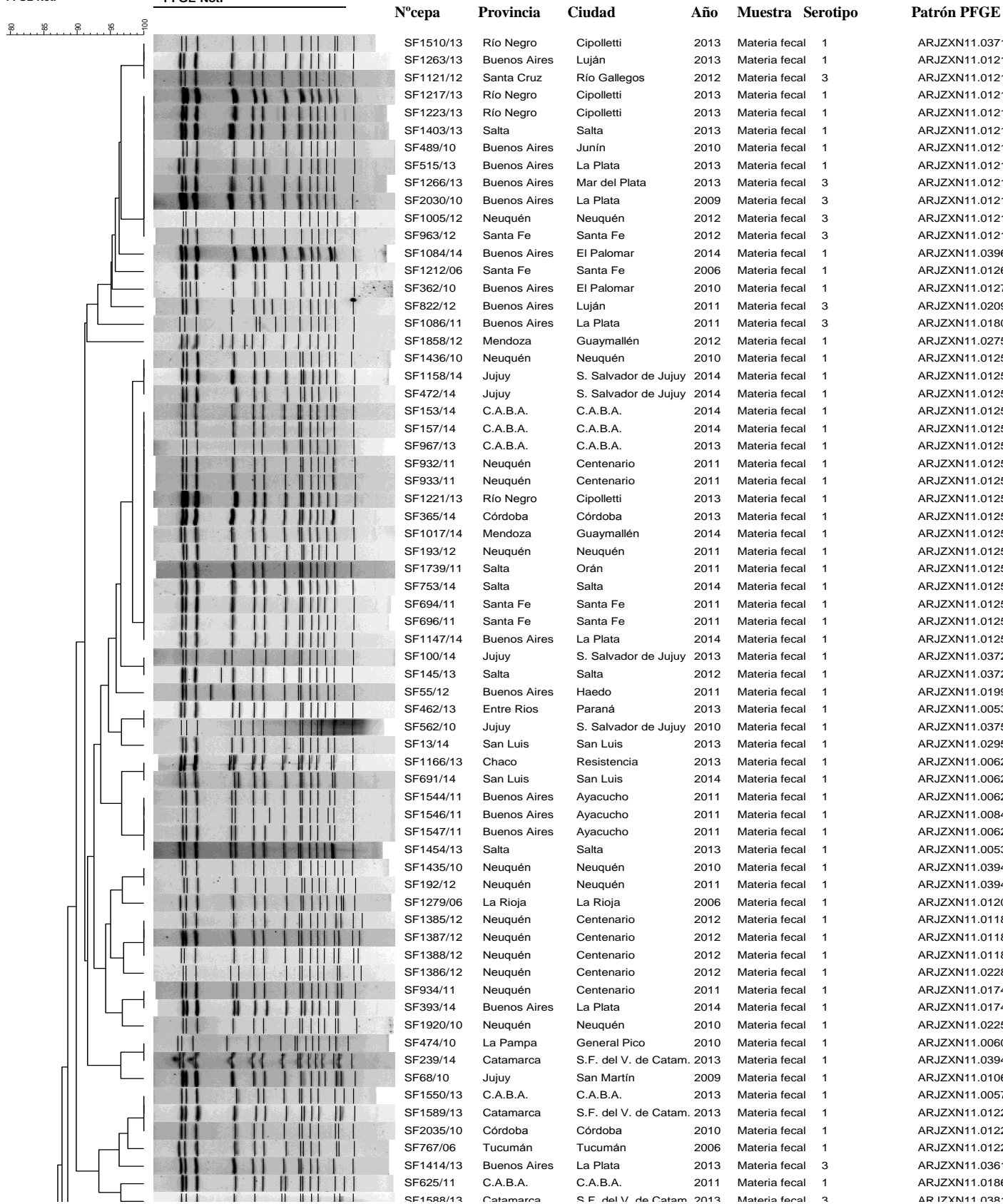


Figura A3: Rama 3 del dendograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-NotI

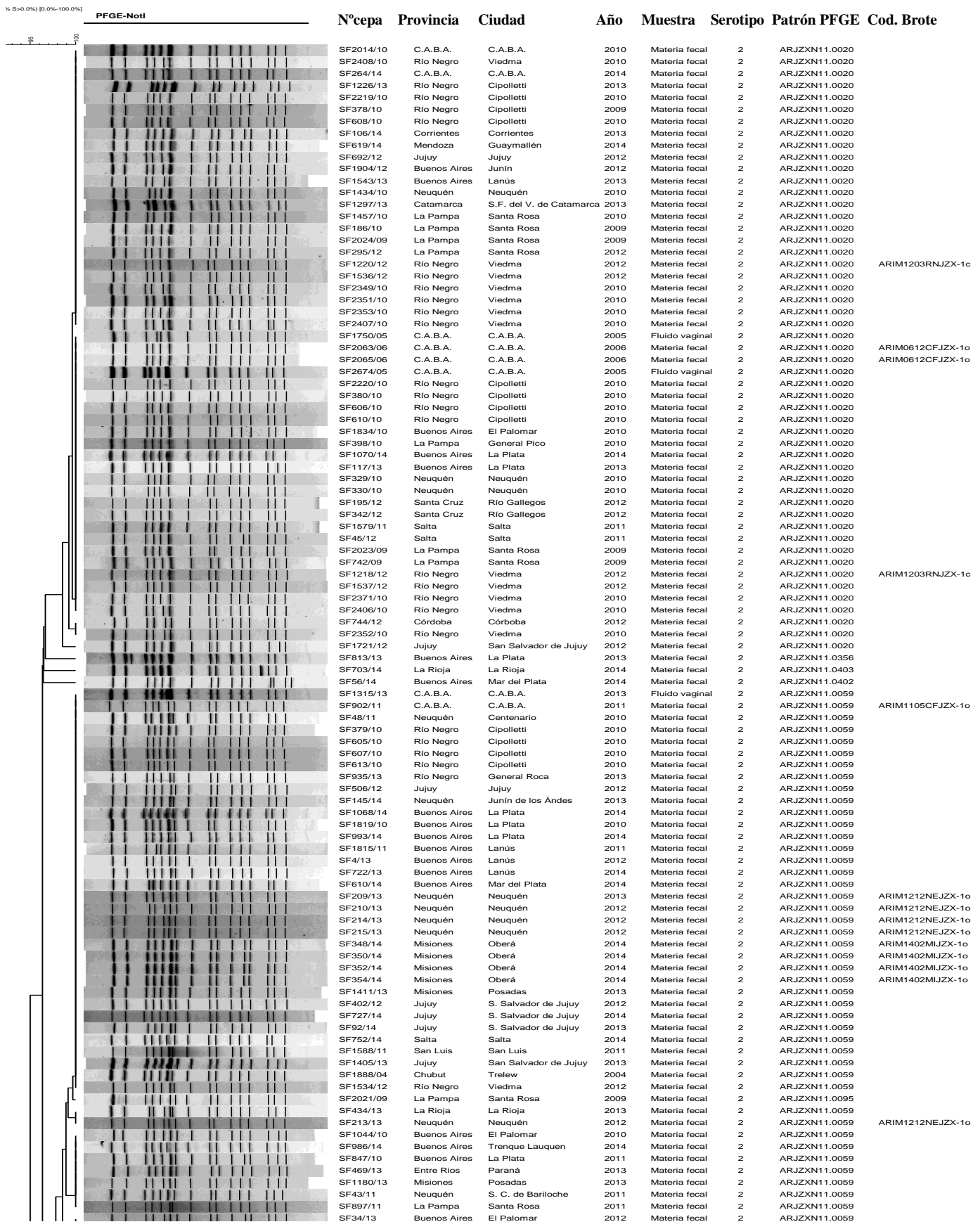
Dice (Opt:1.50%) (Tot:1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
 PFGE-NotI



cont. **Figura A3:** Rama 3 del dendograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-*NotI*

	Nºcepa	Provincia	Ciudad	Año	Muestra	Serotipo	Patrón PFGE
	SF156/14	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2014	Materia fecal	1	ARJZXN11.0084
	SF797/14	Santa Cruz	Río Gallegos	2014	Materia fecal	1	ARJZXN11.0068
	SF894/14	Jujuy	S. Salvador de Jujuy	2014	Materia fecal	1	ARJZXN11.0395
	SF1268/12	Catamarca	S.F. del V. de Catam.	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0236
	SF690/14	San Luis	San Luis	2014	Materia fecal	1	ARJZXN11.0374
	SF1142/14	Buenos Aires	La Plata	2014	Materia fecal	1	ARJZXN11.0374
	SF855/12	Buenos Aires	Luján	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0234
	SF555/11	Córdoba	Córdoba	2010	Materia fecal	1	ARJZXN11.0183
	SF1552/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0044
	SF680/12	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0229
	SF1432/12	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0276
	SF1304/13	Catamarca	S.F. del V. de Catam.	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0351
	SF1123/13	Catamarca	S.F. del V. de Catam.	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0359
	SF963/14	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2014	Materia fecal	1	ARJZXN11.0399
	SF726/14	Jujuy	S. Salvador de Jujuy	2014	Materia fecal	1	ARJZXN11.0398
	SF970/14	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2014	Materia fecal	1	ARJZXN11.0400
	SF30/13	Buenos Aires	El Palomar	2012	Materia fecal	3	ARJZXN11.0378
	SF895/06	Río Negro	S. C. de Bariloche	2006	Materia fecal	3	ARJZXN11.0134
	SF119/13	Buenos Aires	La Plata	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0272
	SF646/12	Chubut	Trelew	2012	Materia fecal	3	ARJZXN11.0239
	SF2218/10	Río Negro	Cipolletti	2010	Materia fecal	1	ARJZXN11.0130
	SF1265/12	Catamarca	S.F. del V. de Catam.	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0237
	SF148/14	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0368
	SF2120/10	Río Negro	Viedma	2010	Materia fecal	1	ARJZXN11.0162
	SF1249/12	Catamarca	S.F. del V. de Catam.	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0240
	SF72/12	Buenos Aires	Haedo	2011	Materia fecal	3	ARJZXN11.0111
	SF1491/12	Buenos Aires	El Palomar	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0264
	SF818/12	Buenos Aires	Luján	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0241
	SF1410/12	Buenos Aires	Luján	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0247
	SF1312/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0349
	SF257/11	Buenos Aires	El Palomar	2011	Materia fecal	1	ARJZXN11.0397
	SF518/13	Río Negro	General Roca	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0288
	SF519/13	Río Negro	General Roca	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0288
	SF522/13	Río Negro	General Roca	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0288
	SF521/13	Río Negro	General Roca	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0289
	SF1038/11	Buenos Aires	La Plata	2011	Materia fecal	1	ARJZXN11.0163
	SF372/11	Buenos Aires	La Plata	2011	Materia fecal	3	ARJZXN11.0181
	SF361/12	Río Negro	S. C. de Bariloche	2012	Materia fecal	3	ARJZXN11.0202
	SF1316/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0350
	SF1268/13	Buenos Aires	Mar del Plata	2013	Espuito	1	ARJZXN11.0345
	SF903/13	Mendoza	Guaymallén	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0113
	SF1241/13	Jujuy	San Martín	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0326
	SF1553/12	Buenos Aires	La Plata	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0274
	SF963/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	3	ARJZXN11.0333
	SF259/11	Buenos Aires	El Palomar	2010	Materia fecal	1	ARJZXN11.0131
	SF838/12	Buenos Aires	Luján	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0238
	SF1655/12	Mendoza	Guaymallén	2012	Materia fecal	"Atípica AA479"	ARJZXN11.0119
	SF482/13	Chaco	Resistencia	2013	Sangre	1	ARJZXN11.0290
	SF260/12	Jujuy	San Martín	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0370
	SF941/13	San Luis	San Luis	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0327
	SF1508/12	Jujuy	San Salvador de Juj.	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0271
	SF1545/11	Buenos Aires	Ayacucho	2011	Materia fecal	1	ARJZXN11.0185
	SF499/12	Buenos Aires	El Palomar	2012	Materia fecal	1	ARJZXN11.0379
	SF61/14	Buenos Aires	Mar del Plata	2014	Materia fecal	1	ARJZXN11.0383
	SF1593/13	Catamarca	S.F. del V. de Catam.	2013	Materia fecal	1	ARJZXN11.0382

Figura A4: Rama 4 del dendograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-NotI



cont. **Figura A4:** Rama 4 del dendograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-*NotI*

	N° cepa	Provincia	Ciudad	Año	Muestra	Serotipo	Patrón PFGE	Cod. Brote
	SF34/13	Buenos Aires	El Palomar	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF1219/12	Río Negro	Viedma	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	ARIM1203RNJZX-1c
	SF938/13	Río Negro	General Roca	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF1217/12	Río Negro	Viedma	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	ARIM1203RNJZX-1c
	SF1261/10	Buenos Aires	Junín	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF261/14	Santa Fe	Santa Fe	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF1425/13	Buenos Aires	La Plata	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF701/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0058	
	SF2350/10	Río Negro	Viedma	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0058	
	SF212/13	Neuquén	Neuquén	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	ARIM1212NEJZX-1o
	SF860/14	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0058	
	SF1877/09	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF2405/10	Río Negro	Viedma	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0058	
	SF903/11	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	ARIM1105CFJZX-1o
	SF810/10	Buenos Aires	La Plata	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF85/11	Buenos Aires	La Plata	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF1423/13	Buenos Aires	Mar del Plata	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF728/14	Jujuy	S. Salvador de Jujuy	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF1188/13	Santa Fe	Santa Fe	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	
	SF1535/12	Río Negro	Viedma	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0058	
	SF2063/09	La Pampa	General Pico	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0063	
	SF353/14	Misiones	Oberá	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0059	ARIM1402MJZX-1o
	SF351/14	Misiones	Oberá	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0096	ARIM1402MJZX-1o
	SF1403/09	La Pampa	Santa Rosa	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0387	
	SF1404/09	La Pampa	Santa Rosa	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0387	
	SF1405/09	La Pampa	Santa Rosa	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0387	
	SF1563/13	Jujuy	S. Salvador de Jujuy	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0020	
	SF719/05	La Pampa	Santa Rosa	2005	Materia fecal	2	ARJZXN11.0020	
	SF1026/13	Buenos Aires	El Palomar	2013	Espuito	2	ARJZXN11.0313	
	SF2032/10	Buenos Aires	La Plata	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0076	
	SF756/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0313	
	SF757/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0313	
	SF758/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0308	
	SF488/10	Buenos Aires	Junín	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	
	SF115/13	Buenos Aires	La Plata	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	
	SF122/13	Buenos Aires	La Plata	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	
	SF211/13	Neuquén	Neuquén	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM1212NEJZX-1o
	SF1927/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF1928/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF1932/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF1935/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF1938/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF1939/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF1944/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF1945/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF1951/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF1952/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF1954/09	San Luis	San Luis	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	ARIM0910SLJZX-1o
	SF2079/09	Río Negro	Viedma	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	
	SF660/14	Buenos Aires	Trenque Lauquen	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0074	
	SF251/14	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0392	
	SF424/12	Buenos Aires	La Plata	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0071	
	SF1190/13	Santa Fe	Santa Fe	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0071	
	SF494/14	Buenos Aires	La Plata	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0389	
	SF702/12	Córdoba	Córdoba	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0002	ARIM1201COJZX-1C
	SF732/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0002	ARIM1201COJZX-1C
	SF734/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0002	ARIM1201COJZX-1C
	SF736/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0002	ARIM1201COJZX-1C
	SF738/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0002	ARIM1201COJZX-1C
	SF740/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0002	ARIM1201COJZX-1C
	SF745/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0002	ARIM1201COJZX-1C
	SF748/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0002	ARIM1201COJZX-1C
	SF359/14	Córdoba	Córdoba	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0002	
	SF1065/14	Buenos Aires	La Plata	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0002	
	SF1729/11	Buenos Aires	La Plata	2011	Fluido vaginal	2	ARJZXN11.0262	
	SF786/11	Chaco	Resistencia	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0189	
	SF1749/11	Salta	Orán	2011	Sangre	Y	ARJZXN11.0168	
	SF801/13	Buenos Aires	Rafael Calzada	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0319	
	SF2064/06	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2006	Materia fecal	2	ARJZXN11.0103	ARIM0612CFJZX-1o
	SF2025/09	La Pampa	Santa Rosa	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0020	
	SF1499/11	Jujuy	Jujuy	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0254	
	SF2115/10	Río Negro	Viedma	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0081	
	SF937/13	Río Negro	General Roca	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0302	
	SF1485/10	Mendoza	Guaymallén	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0078	
	SF1144/14	Buenos Aires	La Plata	2014	Fluido vaginal	2	ARJZXN11.0376	
	SF582/12	Buenos Aires	El Palomar	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0179	
	SF599/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0217	
	SF1154/13	Chaco	Resistencia	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0357	
	SF681/14	Jujuy	S. Salvador de Jujuy	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0357	
	SF1851/10	Buenos Aires	El Palomar	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0253	
	SF1585/13	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0303	
	SF708/13	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0303	
	SF754/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0309	
	SF878/14	Córdoba	Córdoba	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0373	
	SF750/14	Salta	Salta	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0100	
	SF1165/10	Santa Fe	Santa Fe	2010	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0109	
	SF298/12	La Pampa	Santa Rosa	2012	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0109	
	SF1505/10	Santa Fe	Santa Fe	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0089	
	SF139/13	Salta	Salta	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0089	
	SF1824/10	Jujuy	S. Salvador de Jujuy	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0328	
	SF943/13	San Luis	San Luis	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0321	
	SF2067/09	La Pampa	General Pico	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0079	
	SF430/12	Buenos Aires	La Plata	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0401	
	SF42/11	Neuquén	Neuquén	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0079	
	SF1092/13	Santa Fe	Santa Fe	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0377	
	SF323/12	Buenos Aires	Lanús	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0380	
	SF1000/10	Córdoba	Córdoba	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0227	
	SF1828/05	Entre Ríos	Paraná	2005	Materia fecal	2	ARJZXN11.0097	
	SF936/13	Río Negro	General Roca	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0301	
	SF59/14	Buenos Aires	Mar del Plata	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0278	
	SF1120/14	Santa Fe	Santa Fe	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0093	
	SF752/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0296	
	SF1574/12	Río Negro	Viedma	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0093	
	SF164/10	Río Negro	Viedma	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0124	

cont. **Figura A4:** Rama 4 del dendograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-NotI

	Nºcepa	Provincia	Ciudad	Año	Muestra	Serotipo	Patrón PFGE	Cod. Brote
	SF433/10	Córdoba	Córdoba	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0129	
	SF1578/12	Misiones	Misiones	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0129	
	SF668/11	Jujuy	San Martín	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0055	
	SF1323/12	Mendoza	San Rafael	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0243	
	SF1859/12	Mendoza	Guaymallén	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0252	
	SF1570/12	Chubut	Trelew	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0086	
	SF792/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0083	
	SF1702/05	Misiones	Posadas	2007	Materia fecal	2	ARJZXN11.0105	
	SF1258/13	Buenos Aires	Mar del Plata	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0045	
	SF523/12	Buenos Aires	Ayacucho	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0086	
	SF456/13	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0252	
	SF516/12	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0086	
	SF360/14	Córdoba	Córdoba	2013	Orina	2	ARJZXN11.0086	
	SF1889/12	Buenos Aires	Lanús	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0086	
	SF1521/13	Santa Fe	Santa Fe	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0086	
	SF1835/12	San Luis	San Luis	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0086	
	SF471/14	Jujuy	S. Salvador de Jujuy	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0252	
	SF2073/09	La Pampa	General Pico	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0052	
	SF26/12	Buenos Aires	La Plata	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0052	
	SF1917/12	Buenos Aires	La Plata	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0250	
	SF1500/12	Buenos Aires	El Palomar	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0086	
	SF571/11	La Rioja	La Rioja	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0049	
	SF2071/09	La Pampa	General Pico	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0086	
	SF440/12	Buenos Aires	La Plata	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0086	
	SF119/12	Buenos Aires	La Plata	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0123	
	SF1749/05	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2005	Fluido vaginal	2	ARJZXN11.0005	
	SF23/14	Río Negro	Cipolletti	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0005	
	SF1577/11	Salta	Salta	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0005	
	SF753/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0005	
	SF560/10	Jujuy	San Martín	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0005	
	SF1533/12	Río Negro	Viedma	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0005	
	SF1713/11	Buenos Aires	La Plata	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0005	
	SF1444/12	Santa Fe	Santa Fe	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0251	
	SF847/13	La Pampa	General Pico	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0311	
	SF301/14	Buenos Aires	La Plata	2014	Fluido vaginal	2	ARJZXN11.0092	
	SF1087/14	Buenos Aires	El Palomar	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0257	
	SF510/13	Buenos Aires	La Plata	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0092	
	SF680/14	Buenos Aires	La Plata	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0092	
	SF1893/12	Buenos Aires	Azul	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0092	
	SF172/14	Buenos Aires	El Palomar	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0299	
	SF1626/12	Chaco	Resistencia	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0299	
	SF2289/10	Río Negro	Viedma	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0299	
	SF250/11	Buenos Aires	El Palomar	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0187	
	SF755/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0267	
	SF846/12	Buenos Aires	Luján	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0259	
	SF1977/10	Buenos Aires	Junín	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0286	
	SF253/13	Buenos Aires	La Plata	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0286	
	SF509/13	Buenos Aires	La Plata	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0304	
	SF749/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0193	
	SF78/14	Buenos Aires	La Plata	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0391	
	SF600/14	Buenos Aires	Mar del Plata	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0223	
	SF1492/13	Salta	Salta	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0331	
	SF1399/09	Neuquén	Junín de los Andes	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0098	
	SF1400/09	Neuquén	Junín de los Andes	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0098	
	SF1948/10	Córdoba	Córdoba	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0065	
	SF1406/13	Jujuy	San Salvador de Jujuy	2013	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0344	
	SF1171/14	La Pampa	Santa Rosa	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0212	
	SF1599/13	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0362	
	SF195/10	La Pampa	Santa Rosa	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0094	
	SF1490/05	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2005	Fluido vaginal	2	ARJZXN11.0137	
	SF8/11	Río Negro	Viedma	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0137	
	SF2288/10	Río Negro	Viedma	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0104	
	SF478/11	Mendoza	Guaymallén	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0054	
	SF247/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0204	
	SF61/12	Buenos Aires	Haedo	2011	Materia fecal	2	ARJZXN11.0195	
	SF1733/12	Santa Fe	Santa Fe	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0261	
	SF361/14	Córdoba	Córdoba	2013	Sangre	2	ARJZXN11.0315	
	SF366/14	Córdoba	Córdoba	2014	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0315	
	SF759/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0314	
	SF428/10	Córdoba	Córdoba	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0107	
	SF142/12	Chaco	Resistencia	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0262	
	SF1482/10	Mendoza	Guaymallén	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0099	
	SF1783/12	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0260	
	SF2114/10	Río Negro	Viedma	2010	Materia fecal	2	ARJZXN11.0091	
	SF2022/08	Santa Fe	Santa Fe	2008	Materia fecal	2	ARJZXN11.0171	ARIM0810SFJZX-2o
	SF2069/09	La Pampa	General Pico	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0114	
	SF723/14	Buenos Aires	Lanús	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0210	
	SF1412/12	Buenos Aires	Luján	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0258	
	SF685/12	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2012	Fluido vaginal	Y	ARJZXN11.0222	
	SF742/12	Córdoba	Córdoba	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0200	
	SF1813/12	Buenos Aires	El Palomar	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0263	
	SF911/13	Jujuy	San Salvador de Jujuy	2013	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0325	
	SF390/14	Buenos Aires	La Plata	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0226	
	SF751/13	San Juan	San Juan	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0110	
	SF618/04	Salta	Salta	2004	Materia fecal	2	ARJZXN11.0115	
	SF326/04	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2004	Materia fecal	2	ARJZXN11.0108	
	SF358/14	Córdoba	Córdoba	2013	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0211	
	SF241/14	Catamarca	S.F. del V. de Catamarca	2013	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0198	
	SF1572/14	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2014	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0348	
	SF1575/14	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2014	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0348	ARIM1410CFJZX-3o
	SF1571/14	C.A.B.A.	C.A.B.A.	2014	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0338	ARIM1410CFJZX-3o
	SF537/13	Buenos Aires	Junín	2013	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0312	
	SF901/13	Mendoza	Guaymallén	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0323	
	SF472/09	La Pampa	General Pico	2009	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0046	
	SF1401/09	Neuquén	Junín de los Andes	2009	Materia fecal	2	ARJZXN11.0116	
	SF538/14	Corrientes	Corrientes	2014	Materia fecal	2	ARJZXN11.0208	
	SF1125/13	Neuquén	Neuquén	2013	Materia fecal	Y	ARJZXN11.0358	
	SF1039/13	Buenos Aires	El Palomar	2013	Fluido vaginal	Y	ARJZXN11.0322	
	SF1573/13	Jujuy	S. Salvador de Jujuy	2013	Fluido vaginal	Y	ARJZXN11.0360	
	SF955/12	Buenos Aires	El Palomar	2013	Materia fecal	3	ARJZXN11.0273	
	SF1407/12	Buenos Aires	Luján	2012	Materia fecal	2	ARJZXN11.0203	
	SF26/13	Buenos Aires	El Palomar	2013	Materia fecal	2	ARJZXN11.0265	

Figura A5: Rama 5 del dendrograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-NotI

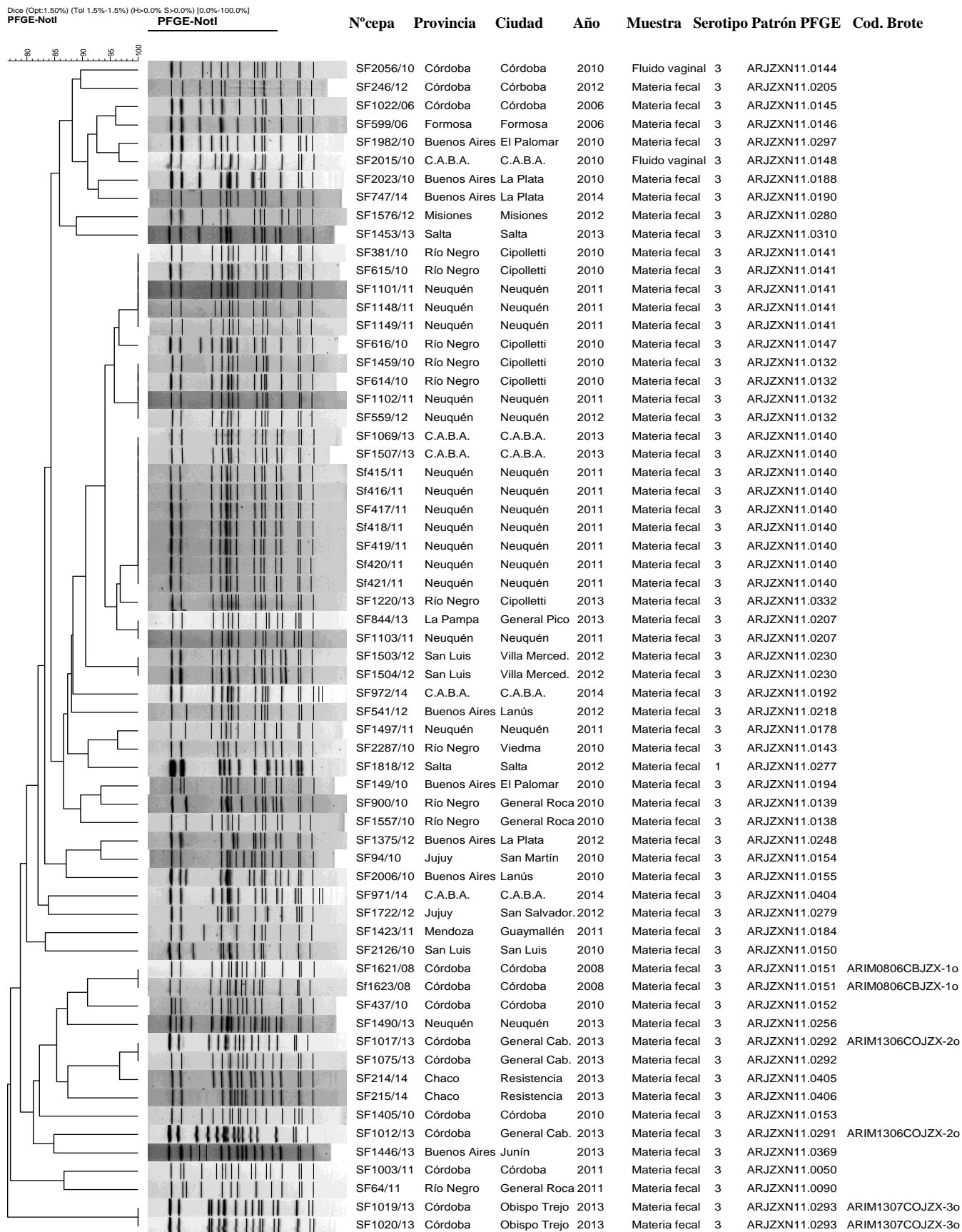


Figura A6: Rama 6 del dendrograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-NotI

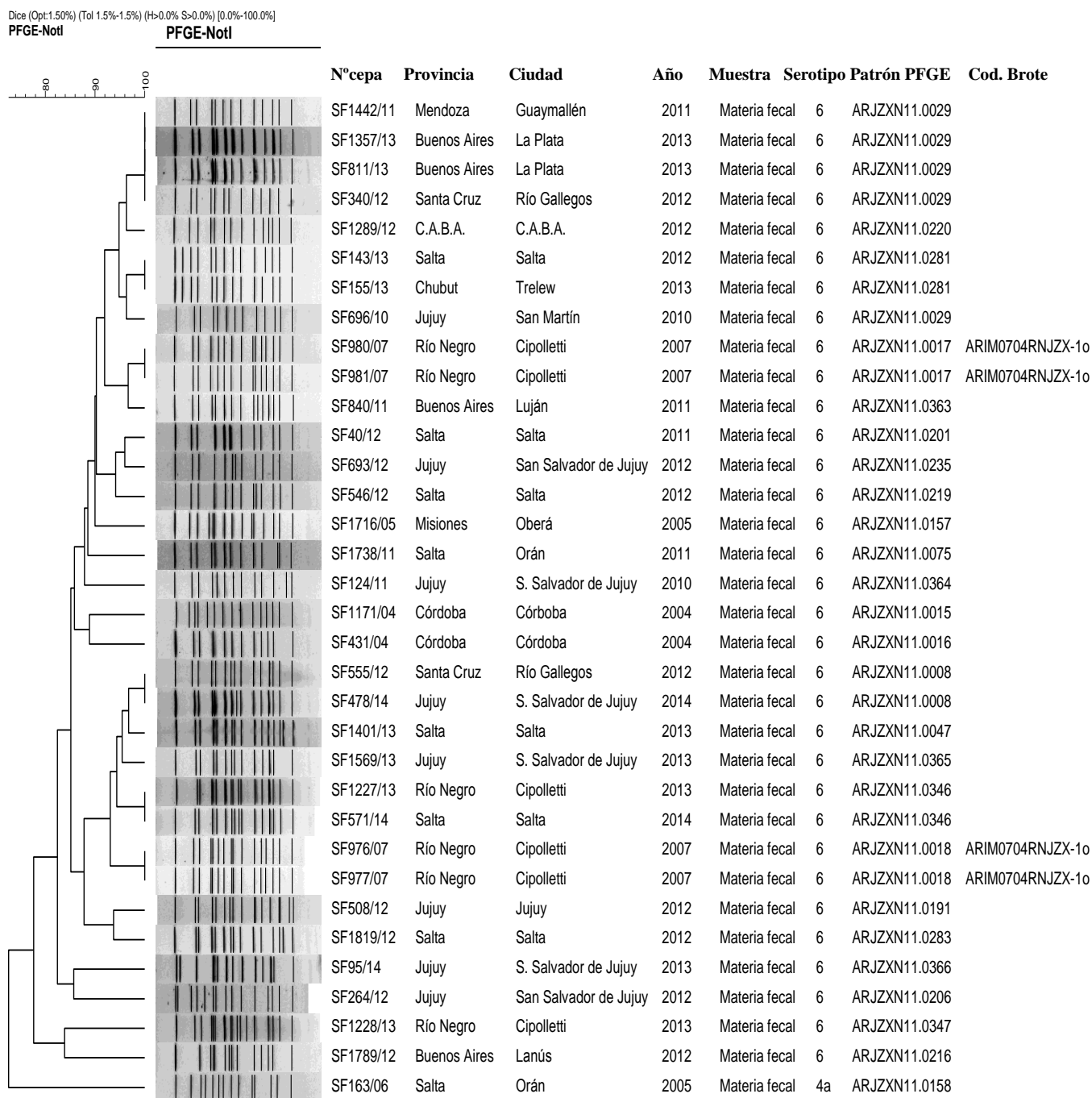


Figura A7: Rama 7 del dendograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-NotI

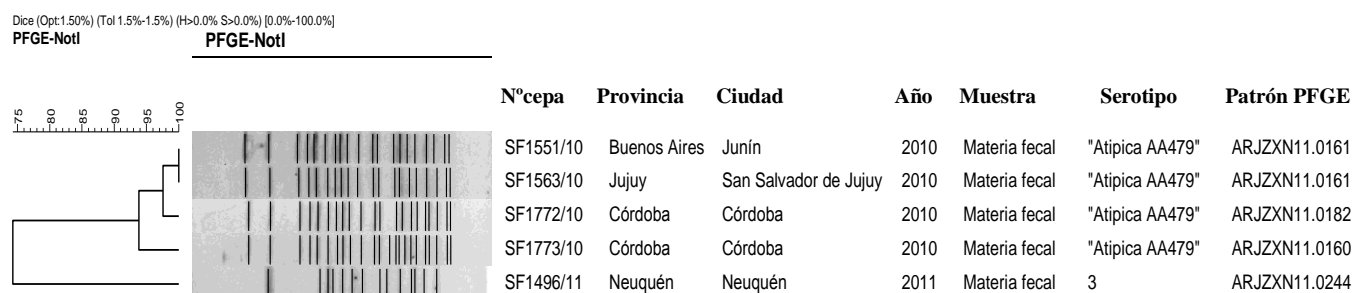
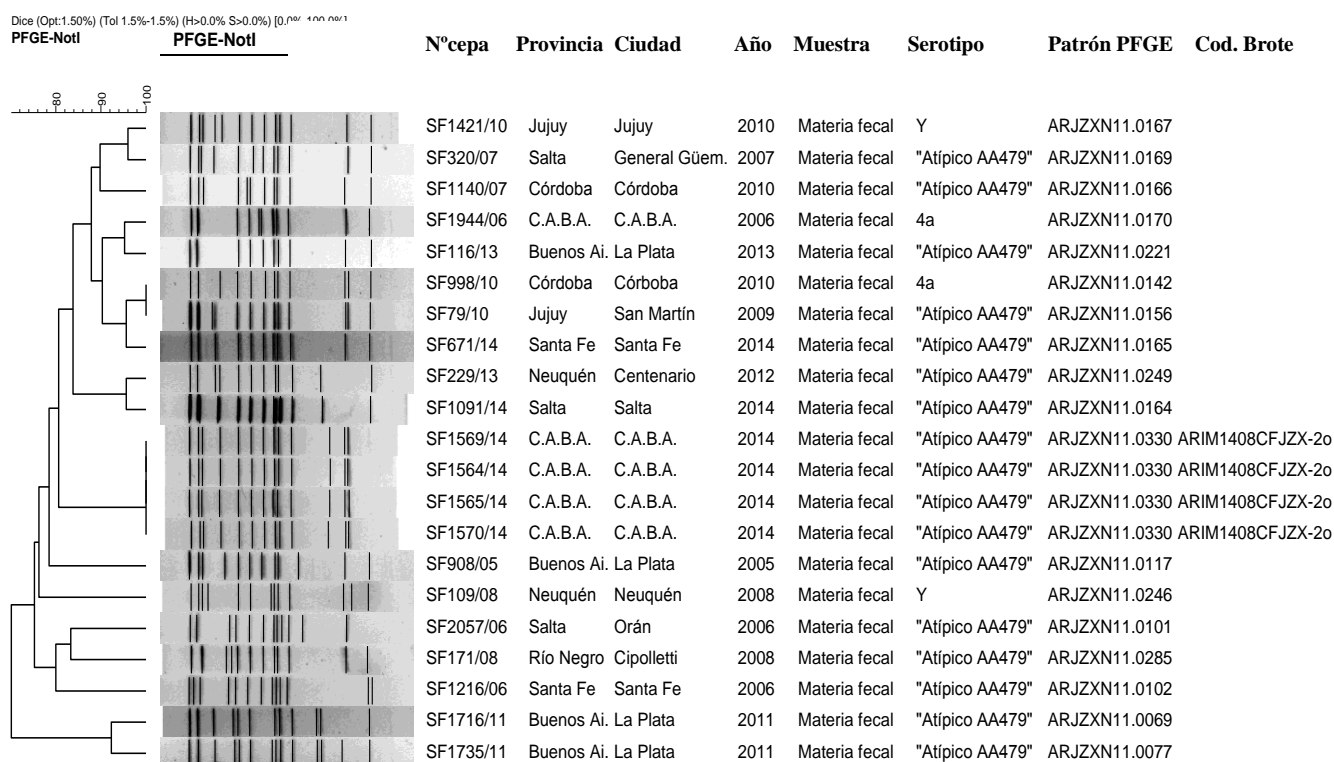


Figura A8: Rama 8 del dendograma total de la BDN de subtipos genéticos por PFGE-NotI



Hospitales y Laboratorios que remitieron aislamientos de *S. flexneri* al LNR durante 2004-2014.

Buenos Aires: HIGA "Dr. José Penna" (Bahía Blanca), HZEMI "Argentino Diego" (Azul), HIGA "Dr. A. Piñeiro" (Junín), Hosp. "Oñativia" (Alte. Brown), Hosp. "Evita" (Lanús), Hosp. Posadas (Morón), HIEMI "Tetamanti" (Mar del Plata), Instituto Nacional de Epidemiología "Juan J. Jara" (Mar del Plata), Hosp. "Dr. Orellana" (Trenque Lauquen), Hosp. de Niños "Sor María Ludovica" (La Plata), Hosp. Municipal de Ayacucho "Dr. Pedro Solanet" (Ayacucho), Laboratorio Central de Salud Pública (La Plata), Universidad Nacional de Luján (Luján).

Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Hosp. "Fernández", Hosp. "F. J. Muñoz", Hosp. de Niños "Dr. Ricardo Gutierrez", Hosp. "Pirovano", Hosp. "Dr. Piñero", Clínica "Mitre", Clínica "Fleni", C.E.M.I.C., Hosp. Gral. de Agudos "Dr. Teodoro Alvarez", Hosp. Gral. de Agudos "Dr. Dalmacio Velez Sarsfield", Hosp. "Zubizarreta".

Catamarca: Hosp. Interzonal de Niños "Eva Perón" (San Fernando del Valle de Catamarca)

Chaco: Laboratorio Central de Salud Pública (Resistencia), Hosp. Pediátrico "Dr. Avelino Lorenzo Castelani" (Resistencia), Hosp. "Dr. Julio C. Perrando" (Resistencia).

Chubut: Hosp. Zonal Trelew (Trelew), Hosp. Zonal "Dr. Andrés Isola" (Puerto Madryn),

Córdoba: Hosp. de Niños de la Santísima Trinidad (Córdoba), Hosp. "Rawson" (Córdoba) Clínica Privada "Reina Fabiola" (Córdoba), Hosp. "San Roque" (Córdoba), Hosp. Infantil Municipal (Córdoba). Hosp. Pediátrico del Niño Jesús (Córdoba).

Corrientes: Hosp. Pediátrico "Juan Pablo II" (Corrientes), Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes).

Entre Ríos: Hosp. Materno Infantil "San Roque" (Paraná).

Formosa: Hosp. de la Madre y el Niño (Formosa)

Jujuy: Hosp. Central (San Salvador de Jujuy), Hosp. "Oscar Orias" (Libertador Gral. San Martín), Hosp. "Ntra. Sra. Del Carmen" (El Carmen), Hosp. de Niños "Héctor Quintana" (San Salvador de Jujuy), Hosp. "G.C. Peterson" (San Pedro de Jujuy).

La Pampa: Hosp. "Lucio Molas" (Santa Rosa), Hosp. "Gobernador Centeno" (Gral. Pico).

La Rioja: Hosp. "E. Vera Barros" (La Rioja).

Mendoza: Hosp. "Humberto Notti" (Guaymallén), Hosp. "Schestakow" (San Rafael).

Misiones: Hosp. Samic (Oberá), Hosp. Provincial Pediátrico "Dr. F Barreyno" (Posadas).

Neuquén: Hosp. "Horacio H. Heller" (Neuquén), Hosp. Provincial de Neuquén "Dr. Castro Rendón" (Neuquén), Laboratorio Central (Neuquén), Hosp. Centenario "Dr. Natalio Burd" (Centenario), Hosp. Junín de los Andes (Junín de los Andes).

Río Negro: Hosp. "Artemides Zatti" (Viedma), Hosp. Zonal de Bariloche "Ramón Carrillo" (Bariloche), Hosp. "Francisco López Lima" (Gral. Roca), Hosp. Área de Cipoletti "Dr. Pedro Moguillansky" (Cipolletti).

Salta: Hosp. "San Vicente de Paul" (Orán), Hosp. Público Materno Infantil (Salta), Hosp. Rosario de Lerma (Salta), Hosp. "J. Castellanos-Gral. Guemes" (Gral. Guemes), Hosp. Cerrillos (Salta).

San Juan: Hosp. "Dr. Guillermo Rawson" (San Juan), Hosp. "Dr. Marcial V. Quiroga" (San Juan).

San Luis: Complejo Sanitario San Luis (San Luis), Clínica y Maternidad CERHU (San Luis), Policlínico Reg. "Juan D. Perón" (Villa Mercedes).

Santa Cruz: Hosp. Regional Río Gallegos (Río Gallegos), Hosp. Zonal de Caleta Olivia (Caleta Olivia).

Santa Fe: Laboratorio Central (Santa Fe), Hosp. "Alassia" (Santa Fe), Hosp. "Vilela" (Rosario).

Tierra del Fuego: Hosp. Regional de Ushuaia (Ushuaia).

Tucumán: Hosp. del Niño Jesús (San Miguel de Tucumán).

Hospitales y Laboratorios que participamos del Proyecto “MIDAS”- Argentina

Neuquén: Hosp. “Dr. Horacio Heller”, Hosp. Junín de los Andes, Epidemiología del Hosp. Junín de los Andes, Hosp. Provincial de Neuquén “Dr. Castro Rendón”, Hosp. Centenario “Dr. Natalio Burd”, Hosp. San Martín de Los Andes, Servicio de Epidemiología del Hosp. Provincial de Neuquén “Dr. Castro Rendón”; Laboratorio Central, Subsecretaría de Salud de Neuquén; Dirección de Bromatología de Neuquén.

Rio Negro: Hosp. Area Cipolletti “Dr. Pedro Moguillansky”, Hosp. “General Roca”, Hosp. “Artemides Zatti”, Epidemiología del Hosp. “A. Zatti”, Hosp. Zonal de Bariloche “Ramón Carrillo”, Saneamiento Ambiental Bromatología Bariloche.

La Pampa: Hosp. “Lucio Molas”, Hosp. “Gobernador Centeno”, Bromatología La Pampa, Epidemiología La Pampa.

Mendoza: Hosp. Central de Mendoza, Hosp. “Humberto Notti”, Hosp. “Schestakow”.

San Luis: Hosp. Regional de Villa Mercedes, Policlínico Central de San Luis Epidemiología de San Luis.

Córdoba: Laboratorio Central de Córdoba, Bromatología, Hosp. Infantil Municipal de Córdoba, Hosp. de Niños de la Santísima Trinidad, Hosp. Pediátrico del Niño Jesús, Clínica Privada “Reina Fabiola”, Hospital Villa María, Hospital Regional “Domingo Funes”, Clínica Vélez Sarsfield, Epidemiología Córdoba.

Allison G.E. y Verma N.K. (2000). Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends in microbiology*; 8(1):17-23.

Ansaruzzaman, M., Kibriya, A.K., Rahman, A., Neogi, P.K., Faruque, A.S., Rowe, B., and Albert, M.J. (1995). Detection of provisional serovars of *Shigella dysenteriae* and designation as *S. dysenteriae* serotypes 14 and 15. *Journal of Clinical Microbiology*; 33, 1423–1425.

Ansaruzzaman, M., Sultana, M., Talukder, K.A., Alam, K., Matsushita, S., Safa, A., Khajanchi, B.K., Dutta, D.K., Islam, Z., Albert, M.J., et al. (2005). Isolation and characterization of provisional serovar *Shigella boydii* E16553 from diarrhoeal patients in Bangladesh. *Journal of Medical Microbiology*; 54, 477–480.

Arrach N., Porwollik S., Cheng P., Cho A., Long F., Choi S-H., and McClelland M. (2008). *Salmonella* serovar identification using PCR-Based detection of gene Presence and absence. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8):2581–2589. doi:10.1128/JCM.02147-07

Ashkenazi S. and Cohen D. (2013). An update on vaccines against *Shigella*. *Therapeutic Advances in Vaccines*; 1(3):113–123

Ashton P.M., Baker K., Gentle A., Wooldridge D.J., Thomson N.R., Dallman T.J., and Jenkins C. (2014). Draft genome sequences of the type strains of *Shigella flexneri* held at Public Health England: comparison of classical phenotypic and novel molecular assays with whole genome sequence. *Gut Pathogens*; 6:7

Brengi S.P., Viñas M.R., Nobile M., Blázquez N., De Bunder S., Alvarez M.L., Arellano O., Caffer M.I., Binsztein N., Pichel M. (2010). Relación genética de aislamientos de *Shigella sonnei* asociados a tres brotes comunitarios en Río Negro. *XII Congreso Argentino de Microbiología*. Presentación oral (O51).

Brenni SP., O'Brien S.B., Pichel M., Iversen C., Arduino M., Binsztein N., Jensen B., Pagotto F., Ribot E.M., Stephan R., Cernela N., Cooper K. and Fanning S. (2012). Development and validation of a PulseNet standardized protocol for subtyping isolates of *Cronobacter* species. *Foodborne Pathogens and Disease*; 9(9):861–867.

Brenni S.P., Della Gáspera A., Viñas M.R., Panagópulo M., Caffer M.I., Pichel M. Epidemiología molecular aplicada a la vigilancia: base de datos nacional de electroforesis en campo pulsado de *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*. (2012). VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas. SADEBAC. Presentación oral, O5 (82).

Brenni S., Della Gáspera A., Rey M.C., Togneri A., Pichel M., Pérez M., Masques I.A., Podestá L., Caffer M.I. (2013). Bacteriemia causada por *Shigella* spp. XIII Congreso Argentino de Microbiología. Póster (P-426).

Brenni S.P., Panagópulo M., Moroni M., Della Gáspera A., Nápoli D., Alcain A., Caffer M.I., Viñas M.R. (2016). Identificación por PCR de serotipos Atípicos de *Shigella flexneri* circulantes en Argentina desde El Laboratorio Nacional de Referencia (LNR). XXIII Congreso Latinoamericano y XIV Congreso Argentino de Microbiología. Póster (MI-0549).

Brenni S.P., Panagópulo M., Van Der Ploeg C; de Urquiza MT; Moroni M., Alcain A., Caffer M.I., Viñas M.R. (2017). Identificación de *S. flexneri* 7 (antes “1c”) en Argentina. XVII Jornadas Argentinas de Microbiología. Póster (Nº70).

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

Campos J., Pichel M., Vaz T.M.I., Tavechio A.T., Fernández S.A., Muñoz N., Rodríguez C., Realpe M.E., Moreno J., Araya P., Fernández J., Fernández A., Campos E., Duarte F., Weiler Gustafson N., Binsztein N., Pérez Gutierrez E. (2011). Building PulseNet Latin America and Caribbean *Salmonella* regional database: First conclusions of genetic

subtypes of *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, and *S. Enteritidis* circulating in six countries of the region. *Food Research Internacional*. doi:10.1016/j.foodres.2011.10.020

Carlin N.I.A., Mahbubur R., Sack D.A., Saman A., Kay B., Lindberg A.A. (1989). Use of monoclonal Antibodies to type *Shigella flexneri* in Bangladesh. *Jornal of Clinical Microbiology*; 27 (6):1163-1166

Carter J.M., Lin A., Clotilde L., and Lesho M. (2016). Rapid, multiplexed characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) isolates using suspension array technology. *Frontiers in Microbiology*; 7:439. doi: 10.3389/fmicb.2016.00439

Choi S.Y., Jeon Y-S., Lee J.H., Choi B., Moon S.H., Seidlein L.v., Clemens J.D., Dougan G, Wain J., Yu J., Lee J.C., Seol S.Y., Lee B.K., Song J-H., Song M., Czerkinsky C., Chun J., and Kim D.W. (2007). Multilocus sequence typing analysis of *Shigella flexneri* isolates collected in Asian countries. *Journal of Medical Microbiology*; 56(11):1460–1466. doi: 10.1099/jmm.0.47322-0

Coimbra R.S., Artiguenave F, Jacques L., and Oliveira1 G.C. (2010). MST (Molecular Serotyping Tool): a program for Computer-Assisted Molecular identification of *Escherichia coli* and *Shigella* O antigens. *Journal of Clinical Microbiology*; 48 (5):1921–1923. doi:10.1128/JCM.00357-10.

Connor T.R., Barrer C.R., Baker K.S., Weill F.X., Talukder K.A., Smith A.M., Baker S., Gouali M., Thanh D.P., Azmi I.J., Dias da Silveira W., Semmler T., Wieler L.H., Jenkins C., Cravioto A., Faruque S.M., Parkhill J., Kim D.W., Keddy K.H., Thomson N.R. (2015). Species-wide whole genome sequencing reveals historical global spread and recent local persistence in *Shigella flexneri*. *eLife*; 4:e07335. DOI: 10.7554/eLife.07335

Della Gáspera A., Brengi S.P., Turco M., Gryngarten M., Vazquez M., Montanaro P., Giugno A., Caffer M.I., Pichel M. (2012). Vulvovaginitis en niñas causada por *Shigella flexneri*. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas. SADEBAC. Presentación oral, O5 (82).

Della Gáspera A., Caffer M.I., Panagópulo M., Viñas M.R., Barrios H.A., Viora S.S. y Anselmo R.J. (2015). Brote de shigelosis en la ciudad de Luján, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*; 47(2):112–117. doi:10.1016/j.ram.2015.02.003

den Bakker H.C. Moreno Switt A.I., Cumming C.A., Hoelzer K., Degoricija L., Rodriguez-Rivera L.D., Wright E.M., Fang R., Davis M., Root T., Schoonmaker-Bopp D., Musser K.A., Villamil E., Waechter H., Kornstein L., Furtado M.R., and Wiedmann M. (2011). A Whole-Genome Single Nucleotide Polymorphism-Based approach to trace and identify outbreaks linked to a common *Salmonella enterica* subsp.*enterica* Serovar Montevideo Pulsed-Field Gel Electrophoresis type. *Applied Environmental Microbiology*; 77(24):8648–8655. doi:10.1128/AEM.06538-11

Ewing, W. H. (1949). *Shigella* nomenclature. *Journal of Bacteriology*; 57:633-638.

Ewing W. The genus *Shigella*. (1986). Editores: Edwards y Ewing. Identification of *Enterobacteriaceae*, 4ta Edición. New York, USA, Elsevier Science Publishers.

Fey P.D., Iwen P. C., Zentz E. B., Briska A. M., Henkhaus J. K., Bryant K. A., Larson M. A, Noel R. K. and Hinrichs S. H. (2012). Assessment of Whole-Genome Mapping in a Well-Defined Outbreak of *Salmonella enterica* Serotype Saintpaul. *Journal of Clinical Microbiology*; 50(9):3063–3065.

Fitzgerald C., Collins M., van Duyne S., Mikoleit M., Brown T., and Fields P. (2007). Multiplex, Bead-Based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups. *Journal of Clinical Microbiology*; 45 (10): 3323–3334. doi:10.1128/JCM.00025-07

Foster R.A., Carlin N.I., Majcher M., Tabor H., Ng L.K., 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.

Galas M., Lucero C., Tuduri E., Vazquez M., Soloaga R., Red Whonet Argentina, Corso, A. Resistencia a los Antimicrobianos en *Shigella* spp de Argentina. (2012). VII Congreso

de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, SADEBAC. Póster.

Gentle A., Ashton P.M., Dallman T.J. and Jenkins C. (2016). Evaluation of molecular methods for serotyping *Shigella flexneri*. *Journal Clinical of Microbiology*; 03386-15. doi:10.1128/JCM.03386-15

Gerner-Smidt P., Hise K., Kincaid J., Hunter S., Rolando S., Hyytia-Trees E., Ribot E.M., Swaminathan B. (2006). PulseNet Taskforce. PulseNet USA: A five-year update. *Foodborne Pathogens and Disease*; 3:9–19.

Gorgé O., Lopez S., Hilaire V., Lisanti O., Ramisse V. and Vergnaud G. (2008). Selection and Validation of a Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Panel for Typing *Shigella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*; 46 (3):1026–1035

Grimont, F., Lejay-Collin, M., Talukder, K.A., Carle, I., Issenhuth, S., Le Roux, K., and Grimont, P.A. (2007). Identification of a group of shigella-like isolates as *Shigella boydii* 20. *Journal of Medical Microbiology*; 56, 749–754.

Hunter S.B., Vauterin P., Lambert-Fair M.A., Van Duyne M.S., Kubota K., Graves L., Wrigley D., Barrett T., Ribot E. (2005). Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *Journal of Clinical Microbiology*; 43:1045-1050.

Hyden, P., Pietzka A., Lennkh A., Murer A., Springer B., Blaschitz M., Indra A., Huhulescu S., Allerberger, F., Ruppitsch W., Sensen C.W. (2016). Whole genome sequence based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Biotechnology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.005>

Kotewicz M.L., Mammel M.K., LeClerc J.E. and Cebula T.A. (2008). Optical mapping and 454 sequencing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates linked to the US 2006 spinach-associated outbreak. *Microbiology*; 154, 3518–3528. doi10.1099/mic.0.2008/019026-0

Jakhetia R., Marri A., Stähle J., Widmalm G. and Verma N.K. (2014). Serotype-

conversion in *Shigella flexneri*: identification of a novel bacteriophage, Sf101, from a serotype 7a strain. *BMC Genomics*; 15:742.

Jenke C., Lindstedt B.A., Harmsen D., Karch, H., Thorstensen Brandal L., and Mellmann A. (2011). Comparison of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Multilocus Sequence Typing for differentiation of hemolytic-uremic syndrome-associated *Escherichia coli* (HUSEC) collection strains. *Journal of Clinical Microbiology*; 49 (10): 3644–3646. doi:10.1128/JCM.05035-11

Li Y., Liu D., Cao B., Han W., Liu Y., Liu F., Guo X., Bastin D.A., FENA L., and Wang L. (2006). Development of a Serotype-Specific DNA microarray for identification of some *Shigella* and pathogenic *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Microbiology*; 44 (12): 4376–4383. doi:10.1128/JCM.01389-06

Liang S-Y., Watanabe H., Terajima J., Li C-C., Liao J-C, Tung S.H., and Chio C-S. (2007). Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for molecular typing of *Shigella sonnei*. *Journal of Clinical Microbiology*; 45 (11): 3574–3580. doi:10.1128/JCM.00675-07

Lindstedt B.A., Thorstensen L.B., Aas L., Vardund T., Kapperud G. (2007). Study of polymorphic variable-number of tandem repeats loci in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay. *Journal of Microbiological Methods*; 69(1):197-205

Luo X., Sun Q., Lan R., Wang, Li Z., Xia S., Zhang J., Wang Y., Jin D., Wang Y., Yuan X., Xu B., Cui Z., Xu J. (2012). Emergence of a novel *Shigella flexneri* serotype 1d in China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 74: 316–319.

Niyogi, S.K. (2005). Shigellosis. *Journal of Microbiology*: 43:133-43.

Olive, D.M. and P. Bean. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*; 37:1661–1669.

Onmus-Leone F., Hang J., Clifford R.J., Yang Y., Riley M., Kuscner R.A., Waterman

P.E., Lesho E.P. (2013). Enhanced de novo assembly of high throughput pyrosequencing data using whole genome mapping. *PLoS ONE*; 8(4):e61762.

Passwell J.H., Ashkenzib S., Banet-Levia Y., Ramon-Sarafa R., Farzama N., Lerner-Gevac L, Even-Nira H., Yerushalim B., Chue C., Shiloach J, Robbinse J.B., Schneersone R. (2010). Age-related efficacy of *Shigella* O-specific polysaccharide conjugates in 1–4-year-old Israeli children. *Vaccine*; 28:2231–2235

Perepelov A.V., L'vov V.L., Liu B., Senchenkova S.N., Shekht M.E., Shashkov A.S., Feng L., Aparin P.G., Wang L., Knirel Y.A. (2009). A new ethanolamine phosphate-containing variant of the O-antigen of *Shigella flexneri* type 4a. *Carbohydrate Research*; 344(12):1588-91. doi: 10.1016/j.carres.2009.03.022.

Pichel M., Gonzalez Fraga S., Terragno R., Mulki J., Gentile A., Kremer C., Mola A.M., Nosedá R., Binsztein N.(2007). Short report: analysis of clonal relationship among *Shigella sonnei* isolates circulating in Argentina. *Epidemiology and Infection*; 135(4):681–7. doi: 10.1017/S0950268806007230

Pichel M., Brengi S.P., Cooper K.L., Ribot E.M., Al-Busaidy S., Araya P., Fernández J., Vaz T.I., Kam K.M., Morcos M., Nielsen E.M., Nadon C., Pimentel G, Pérez-Gutiérrez E., Gerner-Smidt P., Binsztein N., *Shigella flexneri* PulseNet PFGE Protocol Working Group. (2012). Standardization and international multicenter validation of a PulseNet pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Shigella flexneri* isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*; 9(5):418-24.

Pryamukhina N.S., Khomenko N.A. (1988). Suggestion to supplement *Shigella flexneri* classification scheme with the subserovar *Shigella flexneri* 4c: phenotypic characteristics of strains. *Journal of Clinical Microbiology*; 26(6):1147-9.

Pupo G.M., Lan R., and Reeves P.R. (2000). Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *PNAS*; 97 (19): 10567–10572.

Ribot E.M., Fair M.A., Gautom R., Cameron D.N., Hunter S.B., Swaminathan B., Barrett T.J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*; 3(1):59-67.

Sabat A.J., Budimir A., Nashev D., Sá-Leão R., van Dijl J.M., Laurent F., Grundmann H., Friedrich A.W., on behalf of the ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveillance*; 18(4):pii=20380

Schwartz .D.C; Li X., Hernandez L.I., Ramnarain S.P., Huff E.J., Wang Y-K. (1993). Ordered restriction maps of *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes constructed by Optical Mapping. *Science*; 262(5130):110-114.

Shashkov A.S., Senchenkova S.N., Sun Q., Lan R., Wang J., Perepelov A.V., Knirel Y.A., Xu J. (2013). Structure of the O-antigen of a novel *Shigella flexneri* serotype, 1d (I: 7,8). *Carbohydrate Research*; 373:93-6. doi: 10.1016/j.carres.2013.03.015.

Shmilovitz M., Kretzer B. and Levi S. (1985). A new provisional serovar of *Shigella dysenteriae*. *Journal of Clinical Microbiology*; 21: 240–242.

Stagg, R.M., Cam P.D. and Verma N.K. (2008). Identification of newly recognized serotype 1c as the most prevalent *Shigella flexneri* serotype in northern rural Vietnam. *Epidemiology and Infections*; 136:1134–1140.

Stagg R.M., Tang S.S., Carlin N.I., Talukder K.A., Cam P.D., Verma N.K. (2009). A novel glucosyltransferase involved in O-antigen modification of *Shigella flexneri* serotype 1c. *Journal of Bacteriology*; 191:6612-6617. doi:10.1128/JB.00628-09

Stasiewicz M.J., Oliver H.F., Wiedmann M., den Bakker H.C. (2015). Whole-Genome Sequencing allows for improved identification of persistent *Listeria monocytogenes* in food-associated environments. *Applied Environmental Microbiology*; 81(17):6024-37. doi: 10.1128/AEM.01049-15

Stelling J., Yih W.K., Galas M., Kulldorff M., Pichel M., Terragno R., Tuduri E., Espetxe S., Binsztein N., O'Brien T.F., Platt R. (2010). Automated use of WHONET and SaTScan to detect outbreaks of *Shigella* spp. using antimicrobial resistance phenotypes. *Epidemiology and Infections*; 138(6): 873–883. doi:10.1017/S0950268809990884.

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 A., Jing H. and Xu J. (2011). Development of a multiplex PCR assay targeting O-antigen modification genes for molecular serotyping of *Shigella flexneri*. *Journal of Clinical Microbiology*; 49(11): 3766–3770

Sun Q., Knirel Y.A., Lan R., Wang J., Senchenkova S.N., Jin D., Shashkov A.S., Xia S., Perepelov A.V., 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):e46095

Sun Q., Lan R., Wang J., Xia S., Wang Y., Wang Y., Jin D., Yu B., Knirel Y.A., Xu J. (2013). Identification and characterization of a Novel *Shigella flexneri* Serotype Yv in China. *PLoS ONE*; 8(7):e70238

Sun Q., Knirel Y.A., Lan R., Wang J., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Wang Y., Wang Y., Luo X., Xu J. (2014). Dissemination and serotype modification potential of pSFxv_2, an O-antigen PEtN modification plasmid in *Shigella flexneri*. *Glycobiology*; 24(3):305-13. doi: 10.1093/glycob/cwt115.

Swaminathan B., Gerner-Smidt P., Ng L.K., Lukinmaa S., Kam K.M., Rolando S., Gutierrez E.P., Binsztein N. (2006). Building PulseNet International: An interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathogens and Disease*; 3:36–50.

Talukder K.A., Dutta D.K., Safa A., Ansaruzzaman M., Hassan F., Alam K, Islam K.M.N., Carlin N.I.A., Nair G.B.And Sack D.A. (2001). Altering trends in the dominance of *Shigella flexneri* serotypes and emergence of serologically atypical *S. flexneri* strains in Dhaka, Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*; 39(10): 3757–3759.

Talukder K.A., Islam M.A., Dutta D.K., Hassan F., Safa A., Nair G.B. and Sack D.A. (2002). Phenotypic and genotypic characterization of serologically atypical strains of *Shigella flexneri* Type 4 isolated in Dhaka, Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*; 40(7):2490–2497

Talukder K.A., Islam Z., Islam M.A., Dutta D.K., Hassan F., Safa A., Ansaruzzaman M., Faruque A.S.G., Shahed S.N., Nair G.B. and Sack D.A. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of provisional serotype *Shigella flexneri* 1c and clonal relationships with 1a and 1b strains isolated in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*; 41(1):110-117. doi: 10.1128/JCM.41.1.110-117.2003

Talukder, K.A., Mondol, A.S., Islam, M.A., Islam, Z., Dutta, D.K., Khajanchi, B.K., Azmi, I.J., Hossain, M.A., Rahman, M., Cheasty, T., Cravioto A., Fair G.B. and Sack D.A. (2007). A novel serovar of *Shigella dysenteriae* from patients with diarrhoea in Bangladesh. *Jornal of Medical Microbiology*; 56: 654–658. doi 10.1099/jmm.0.46999-0

Tanmoy A.M., Sahab S., Darmstadt G.L., Whitney C.G. and Saha S.K. (2016). PCR serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from culture-negative specimens: Novel primers to detect serotypes within serogroup-18, *Journal of Clinical Microbiology*. doi:10.1128/JCM.00419-16

van der Ploeg C.A., Rogé A.D., Bordagarria X.L., de Urquiza M.T., Viñas M.R., Pichel M.G., Bruno S.B. (2015). AA479 antiserum: new reagent for the serotype characterization of atypical variants of *Shigella flexneri*. *Revista Argentina de Microbiología*; 47(1):36-40.

Viñas M.R., Brengi S.P., van der Ploeg C.A., Caffer M.I., Bordagarria X.L. (2012). Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos de *Shigella flexneri* atípicos identificados por el sistema de vigilancia de diarreas en Argentina. VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas. SADEBAC. Presentación oral, 01 (74).

Viñas M.R., Tuduri E., Galar A., Yih K., Pichel M., Stelling J., Brengi S.P., Della Gápera A., van der Ploeg C., Bruno S., Rogé A., Caffer M.I., Kulldorff M., Galas M., Group

MIDAS–Argentina. (2013). Laboratory-Based prospective surveillance for community outbreaks of *Shigella* spp. in Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 7 (12):e2521

Wang Y-W., Watanabe H., Phung D.C., Tung S.K., Lee Y-S., Terajima J., Liang S-Y. and Chiou C-S. (2009). Multilocus variable-number tandem repeat analysis for molecular typing and phylogenetic analysis of *Shigella flexneri*. *BMC Microbiology*; 9:278 doi:10.1186/1471-2180-9-278

Ye C., Lan R., Xia S., Zhang J., Sun Q., Zhang S., Jing H., Wang L., Li Z., Zhou Z., Zhao A., Z. Cui, Cao J., Jin D., Huang L., Wang Y., Luo X, Bai X, Wang Y, Wang P, Xu Q and Xu J. (2010). Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*. *Journal of clinical Microbiology*; 48(2):419–426

Boletín Integrado de Vigilancia, Ministério de Salud, Secretaría de Promoción y programas sanitarios. N° 203 - SE 3. (2014). Página 100-111. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/Boletin%20Integrado%20De%20Vigilancia%20N203-SE3.pdf>

Boletín Integrado de Vigilancia, Ministerio de Salud, Secretaría de Promoción y programas sanitarios. N° 128 - SE 28. (2012). Página 7-15. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/BoletinIntegradoDeVigilanciaVersion_N_128-SE28.pdf

World Health Organization. (2005). Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2005. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241592_330.pdf.

Manual de Procedimientos Diagnóstico y Caracterización de *Shigella* spp. (2007). AUTORES: Terragno R., Caffer M.I., Binsztein N. Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”, para el Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv. Disponible en: http://bvs.panalimentos.org/local/file/Manual_Shigella_procedimientos.pdf.

Manual X Curso Epidemiología Molecular en la Vigilancia de las Infecciones Bacterianas. (2013). Departamento Bacteriología, INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán”.

Molecular Medical Microbiology. (2015). 2^{da} edición. Vol II, Capítulo 65: “*Shigella* and Shigellosis: Genetics, Epidemiology and patogénesis”. Autores: Octavia S. y Lan R. Editores: Tang Y.W., Sussman M., Liu D., Poxton I. y Schwartzman J. Pág. 1147-1168

Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. (2016). Vol. I, Cap. Iic.1.2. “*Shigella* spp.”. Autor: Pichel M. Editores: Lopardo H.A., Predari S.C., Carlos Vay. Pág. 73-100.

Disponible en: <http://www.aam.org.ar/manual-microbiologia.php>

<http://www.pulsenetinternational.org>

<http://opgen.com/genomic-services/what-is-whole-genome-mapping>

http://www.who.int/immunization/highlights/2015/immunization_highlights_2015_full/en/index3.html