

## **Clínica 43**

**Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de  
Vacunas.**

**Instituto Superior de Ciencias Básicas y Pre-Clínicas  
“Victoria de Girón”**

**Tesis en opción al Grado Doctor en Ciencias de la Salud**

**“Obtención de un preparado vacunal inmunogénico y  
protectogénico en modelos animales a partir de  
aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei*”.**



**Autor: Lic. Olga Ma. Martínez Fernández**

**Tutor: Dr.C. Luis Angel Riverón Martínez**

**Asesor: Dr.C. Arturo Talavera Coronel**

**Ciudad Habana**

**2010**

**A mi papá, que de estar vivo,  
me hubiera cargado en brazos.**

**El hombre desde que nace sigue un camino de menoscabos, está sometido a agravios y humillaciones pero avanza hacia el encuentro de mitos; tras batallas perdidas, con sus banderas en andrajos intenta escalar cumbres, y en ese empeño está su verdadera grandeza.**

**Temporada de Ángeles. Lisandro Otero**

## SINTESIS

La shigelosis constituye un problema de salud mundial, principalmente en niños menores de 5 años de edad. Dentro del género *Shigella*, *S. sonnei* es el segundo agente causal de esta enfermedad en Cuba. Este serogrupo no ha podido ser subdividido en serotipos, por lo que se han utilizado diferentes métodos fenotípicos para lograr un marcador epidemiológico; sin que ninguno haya sido completamente satisfactorio.

Nuestro trabajo consistió en la selección de una cepa candidata vacunal la cual cumplió con los requisitos indispensables de portar determinadas proteínas que forman parte del plásmido de virulencia conservadas en todo el género en un extracto de proteínas de membrana externa y lipopolisacárido (PME-LPS). De los aislamientos autóctonos realizados en nuestro universo de trabajo, resultó seleccionada la cepa A-04 a la que se le optimizó un medio de cultivo con el que se alcanzaron niveles elevados de biomasa con un 100% de colonias portadoras del plásmido de virulencia. Asimismo, se obtuvieron las proteínas de interés del género y una de alto peso molecular reportada, como antígeno importante a tener en cuenta para la obtención de preparados vacunales de complejo PME-LPS.

Se establecieron dos modelos animales, Test de Sereny y Ratón-Pulmón para realizar las pruebas biológicas que demostraron la capacidad inmunogénica y protectora del extracto PME-LPS obtenido de *Shigella sonnei* A-04. También se estudió la cinética de anticuerpos IgG anti PME-LPS de un pool de sueros de ratones inmunizados con el extracto obtenido, lo que confirmó la utilidad del modelo para este estudio.

## Abreviaturas

Agar Hierro Kligler -----	KIA
Agar Hierro Lisina -----	LIA
Agar Triptona Soya -----	TSA
Albúmina Sérica Bovina -----	BSA
Caldo Triptona Soya -----	TSB
Centro Nacional para Animales de Laboratorio -----	CENPALAB
Dosis Media Infecciosa -----	DMI
Enfermedades Diarreicas Agudas -----	EDA
Extracto de Levadura -----	EL
Extracto de Proteínas de Membrana Externa -----	STA
Inmunoglobulina A -----	IgA
Inmunoglobulina G -----	IgG
Instituto Pedro Kourí -----	IPK
Intensidad Relativa -----	IR
Lipopolisacáridos -----	LPS
Masa Seca Gravimétrica -----	MSG
Medio Frantz Modificado -----	MFM
Método Rosenbrock Modificado -----	MRM
Organización Mundial de la Salud -----	OMS
Peso Molecular -----	PM
Polimorfo Nucleares -----	PMN
Proteína de membrana Externa -----	PME
Proteínas de Invasión Plasmídica -----	Ipa
Proteínas de Membrana Externa Mayoritarias -----	PMEM
Rojo Congo -----	RC
Solución Salina Estéril -----	SSE
Solución Tamponada de Fosfato Estéril -----	STFE
Unidades Formadoras de Colonias -----	UFC

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>8</b>
<b>HIPOTESIS.</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>12</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	<b>12</b>
<b>Pertinencia, actualidad e impacto médico y social.</b>	<b>13</b>
<b>Novedad y principales aportes del trabajo.</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Bacterias Gram Negativas. Generalidades</b>	<b>17</b>
2.1.1 Membrana Externa de las bacterias Gram-negativas.	17
2.1.2 Lipopolisacárido.	18
2.1.3 Proteínas de Membrana Externa.	19
<b>2.2 Características generales del género <i>Shigella spp</i></b>	<b>21</b>
<b>2.3 Virulencia</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Infección por <i>Shigella spp</i></b>	<b>27</b>
<b>2.5 Epidemiología.</b>	<b>30</b>
<b>2.6 Cuadro clínico y tratamiento.</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Inmunidad adquirida después de una infección por <i>Shigella spp</i>.</b>	<b>33</b>
2.7.1 Inmunidad contra el LPS.	34
2.7.2 Inmunidad contra PME.	34
<b>2.8 Modelos animales empleados para el estudio de la shigelosis.</b>	<b>35</b>
<b>2.9 Vacunas</b>	<b>38</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Caracterización por expresión de proteínas de membrana externa (PME) de los aislamientos autóctonos de <i>Shigella sonnei</i> para la selección de posibles cepas vacunales.</b>	<b>41</b>
3.1.1 Identificación bioquímica y metabólica de los aislamientos autóctonos de <i>Shigella sonnei</i> de pacientes con diagnóstico presuntivo de Shigelosis.	41
3.1.1.1 Aislamientos bacterianos.	41
3.1.1.2 Identificación Fenotípica.	41
3.1.2 Caracterización a nivel de especie.	43
3.1.3 Selección de la cepa candidata vacunal.	44
3.1.3.1 Estudio de los perfiles de PME en SDS-PAGE para cada una de los aislamientos.	44
3.1.4 Preparación del lote de siembra de referencia de la cepa seleccionada candidata a vacuna.	48
<b>3.2 Obtención de un medio de cultivo óptimo semisintético para el crecimiento de la cepa seleccionada.</b>	<b>49</b>
3.2.1 Selección de un medio basal apropiado donde se pueda evaluar la función objetivo.	49
3.2.2 Método de Optimización	50
3.2.3 Obtener y purificar el complejo PME-LPS a partir de la biomasa obtenida en los cultivos en fermentación con el medio optimizado y determinar la concentración de proteínas y LPS.	50
3.2.4 Análisis del perfil cromatográfico mediante cromatografía de filtración en Sephacryl S-1000.	51
<b>3.3 Desarrollo de los modelos animales para la evaluación de la inmunogenicidad y protección.</b>	<b>52</b>

3.3.1 Selección de una cepa virulenta de <i>Shigella sonnei</i> y una de <i>Shigella flexneri</i> como cepas de reto homóloga y heteróloga respectivamente.	52
3.3.2 Montaje de dos biomodelos: “Ratón – Pulmón y Test de Sereny”.	52
3.3.2.1 Biomodelo Ratón-Pulmón.	52
3.3.2.2 Biomodelo Test de Sereny.	54
<b>3.4 Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectogénica (contra <i>Shigella sonnei</i> y <i>Shigella flexneri</i>) del complejo PME-LPS en ratones.</b>	<b>55</b>
3.4.1 Inmunización de ratones Balb/c por vía intramuscular con el complejo PME-LPS y reto por modelo Ratón-Pulmón.	55
3.4.2 Inmunización de curieles por vía intramuscular con el complejo PME-LPS y reto por Test de Sereny.	55
3.4.3 Evaluación de Inmunogenicidad contra el complejo PME-LPS por ELISA e inmunoidentificación de las proteínas relevantes por Western Blot.	56
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>58</b>
<b>4.1 Caracterización microbiológica y por expresión de proteínas de membrana externa (PME) de los aislamientos autóctonos de <i>Shigella sonnei</i> para la selección de posibles cepas vacunales.</b>	<b>58</b>
4.1.1 Identificación bioquímica y metabólica de los aislamientos autóctonos de <i>Shigella sonnei</i> en pacientes con diagnóstico presuntivo de shigelosis.	58
4.1.2 Caracterización hasta especie de los aislamientos autóctonos de <i>Shigella spp.</i>	59
4.1.3 Selección de la cepa candidata vacunal	63
4.1.3.1 Obtención de PME de los aislamientos autóctonos de <i>Shigella sonnei.</i>	63
4.1.4 Confección de los Lotes de Referencia y de Trabajo de la cepa seleccionada.	77
<b>4.2 Obtención de un medio de cultivo óptimo semisintético para el crecimiento de la cepa seleccionada.</b>	<b>78</b>
4.2.1 Selección de un medio basal apropiado donde se pueda evaluar la función objetivo.	78
4.2.2 Aplicación del Método de Optimización No Lineal en la obtención del medio optimizado para la cepa seleccionada de <i>Shigella sonnei</i> A-04	80
4.2.3 Evaluación del perfil de PME por STA y en electroforesis desnaturalizante por (SDS – PAGE) de la cepa de <i>S. sonnei</i> A-04 obtenidos con el Medio de Cultivo Óptimo.	82
4.2.4 Obtención y purificación del complejo PME-LPS a partir de la biomasa obtenida en los cultivos en fermentación con el medio optimizado y la determinación de la concentración de proteínas y LPS.	85
4.2.5 Análisis de los perfiles cromatográficos mediante cromatografía en gel de filtración Sephacryl S-1000.	87
<b>4.3 Desarrollo de los modelos animales para la evaluación de la inmunogenicidad y protección.</b>	<b>88</b>
4.3.1 Selección de una cepa virulenta de <i>Shigella sonnei</i> y una de <i>Shigella flexneri</i> como cepas de reto homóloga y heteróloga respectivamente	88
4.3.2 Montaje de dos biomodelos “Ratón-Pulmón” y “Test de Sereny”	88
4.3.2.1 Biomodelo Ratón-Pulmón.	89
4.3.2.2 Biomodelo Test de Sereny.	92
<b>4.4 Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectogénica del complejo PME-LPS contra <i>Shigella sonnei</i> y <i>Shigella flexneri.</i></b>	<b>95</b>
4.4.1 Evaluación de Inmunogenicidad contra el complejo PME-LPS por ELISA e inmunoidentificación de las proteínas relevantes por Western Blot.	97
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>102</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>103</b>

## 1. INTRODUCCIÓN.

Hace más de cien años en Japón, fue descubierto el bacilo Shiga posteriormente denominado como *S. dysenteriae* tipo 1, la shigelosis (denominada así la enfermedad causada por este microorganismo) continúa siendo un grave problema de salud mundial, considerada la principal causa de enfermedad diarreica en humanos, donde cada año ocurren alrededor de 165 millones de casos , 5 millones requieren hospitalización, el 99% se reporta en países en desarrollo; de ellos el 69% de los episodios ocurre en niños menores de 5 años y 1,1 millones mueren por shigelosis, de estos el 60% de los fallecidos pertenece a los niños antes mencionados (Noriega FR y cols. 1999; Sack RB y cols. 1997; Niyogi SK. 2005). Además, representa un gran riesgo para viajeros que visitan áreas endémicas y se considera la mayor contribuyente de la retención del crecimiento en niños (Baron's Handbook, 2000)

El género *Shigella* (Familia Enterobacteriaceae) está compuesto por 4 especies: *Shigella dysenteriae* (grupo A) con 13 serotipos, *Shigella flexneri* (grupo B) con 15 serotipos, *Shigella boydii* (grupo C) con 18 serotipos y *Shigella sonnei* (grupo D) con 1 serotipo. Agrupa a bacilos Gram negativos de 1,5 µm de longitud y 0,8 µm de diámetro y posee capacidad patógena causando enteritis invasiva. (Noriega FR y cols. 1999).

Aunque cualquiera de las especies de *Shigella* y sus serotipos son capaces de causar diarrea y disentería en humanos, tres de ellos son los de importancia crítica para la salud mundial:

- ✓ *S. sonnei*: Especie de mayor prevalencia (con un único serotipo) en países industrializados y con incrementos de prevalencia en algunos países de Latinoamérica (Ferrecio, C. y cols. 1991).
- ✓ *S. dysenteriae* tipo1: Capaz de causar pandemias, resultando tener una alta morbilidad y mortalidad. (Gangarosa EJ y cols. 1970; Mata L y cols. 1970; Rathman MM y cols. 1975).
- ✓ *S. flexneri*: Grupo endémico más prevalente encontrado en países en desarrollo (Olarte J y cols. 1959; Khan MU Y cols. 1985; Echeverría P y cols. 1991).

*Shigella*, tiene como único reservorio conocido hasta el momento al hombre y su dosis infectante es mínima (10 – 100 células), lo que permite su transmisión no solo a través de

los alimentos, sino también por el agua y por contacto directo principalmente en guarderías, asilos, unidades militares, prisiones, etc., presentándose con un elevado índice de morbi – mortalidad. (Baron’s Handbook 2000; Mota MI.y cols. 2005).

La invasión de la mucosa intestinal por las diferentes especies de *Shigella* causa un espectro de manifestaciones clínicas que varían desde un estado de portador asintomático y diarrea acuosa febril, hasta un Síndrome Urémico – Hemolítico (Baron’s Handbook, 2000)

En nuestro país se ha confirmado por estudios microbiológicos en hospitales pediátricos que el género *Shigella* es un grupo importante en la etiología de las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDAs) con una frecuencia de aislamiento entre un 2 y un 17% con complicaciones graves en algunos casos, siendo la frecuencia por orden en primer lugar el grupo B, seguidas por el D, A y C. (Ramirez M. 2008)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de antibióticos y quimioterápicos luego de los resultados de las pruebas de sensibilidad “in vitro”; pero el extensivo e inapropiado uso de éstos en las EDAs ha traído como consecuencia que en los últimos 50 años *Shigella* haya demostrado una extraordinaria capacidad para adquirir resistencia a los antibióticos, codificada ésta por un plásmido. (Ferroiccio L. 1996).

En los estudios sistemáticos de vigilancia de la susceptibilidad a las drogas antimicrobianas realizados en el Instituto Nacional de Resistencia a las Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto “Pedro Kouri” de Cuba (IPK) durante la última década, se ha comprobado el incremento de cepas de *Shigella* con resistencia a un gran número de drogas. (Ramirez M y cols. 1996; Kotloff KL y cols. 1999). Por lo tanto, la constante emergencia de resistencia antibiótica en *Shigella* inclusive a los de nueva generación nos pone ante la necesidad de desarrollar una vacuna efectiva que ayude a controlar esta enfermedad (Eiseinstein BI y cols. 1990).

Ya desde finales del siglo XX (1996) el Comité Permanente para Vacunas contra Enfermedades Diarreicas se reunió y planteó la necesidad de una vacuna para combatir la shigelosis (World Health Organization. 2006). Según directivas tomadas en esa reunión debían ser escogidas las cepas de *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* y *Shigella dysenteriae* como una estrategia para considerar la necesidad de protección contra la shigelosis. Se han presentado candidatos vacunales que pudiéramos llamarlos afortunados, los cuales se encuentran en diferentes niveles de investigación; pero que no han logrado cubrir las

expectativas de Salud Pública en el control eficiente de la enfermedad. (Center for Infections Disease. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. 2005; Said H y cols. 2009).

El papel primario de una vacuna debe ser el de proteger contra la enfermedad clínica y además interferir en eventos como la infección y su posterior colonización. Existen tres factores principales, que sumados al gran número de serotipos, han influido negativamente sobre el desarrollo de una vacuna contra la shigelosis:

- ✓ La inefectividad de vacunas de células completas inactivadas inyectadas parenteralmente (Hartman AB y cols. 1994; Fries LF y cols. 2001).
- ✓ La ausencia de un modelo animal que use una dosis de reto de *Shigella* viva que se relacione con la infección en humanos (Taylor DN y cols. 1993)
- ✓ Evidencias sólo indirectas del mecanismo de protección en humanos (Harlev JH y cols. 2001)

Existen varias tendencias en el camino hacia la obtención de una vacuna eficaz contra *Shigella*, tales como aquellas que enfatizan la presentación de los lipopolisacáridos (LPS), que incluyen la vacuna viva atenuada y liberación del LPS de *Shigella* o polisacárido O con portadores como proteoliposomas (PLS), toxoide tetánico o ribosomas (Ramírez M y cols. 1996; Klotoff KL y cols. 1999; Phalipon A y cols. 2009)

En nuestro trabajo las proteínas de Invasión Plasmídicas (Ipa) que son Proteínas de la Membrana Externa (PME) juegan un papel primordial por estar conservadas en todo el género y además ampliamente involucradas en la adhesión del patógeno a las células del epitelio gastrointestinal, las cuales por su alta expansión en la superficie celular, sirven como dianas del sistema inmunológico, por lo que se convierten en atractivas a tener en cuenta como antígenos vacunales. Estas proteínas fueron designadas como A (72 KDa), B (58 KDa), C (43KDa) y D (39 KDa), denominándose ipaABCD a los genes que codifican para estas proteínas (Buysse JM y cols. 1987). Otros autores han reportado la presencia de anticuerpos evocados por infección con *Shigella flexneri* 2a presentando reactividad cruzada con proteínas de similar masa molecular pertenecientes a diferentes serotipos de *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. boydii* (Hale TL y cols. 1985; Pore D y cols. 2009)

Las porinas también resultan interesantes por tener al igual que las Ipa, la característica de estar conservadas en todo el género, lo que apoyaría la protección cruzada entre todas las especies de *Shigella*. Las PME juegan un papel importante dentro del mecanismo de

penetración, multiplicación e invasión de este microorganismo en el huésped, lo cual es motivo de investigación en la formación de un candidato vacunal, al igual que las vacunas vivas, las atenuadas por transformaciones genéticas, las conjugadas y las combinadas (Phalipon A y cols. 1998; Plotkin SA y cols. 2001; Robbins JB y cols. 2009). En este sentido también aparecen reportadas otras variantes como la formación de complejos hidrofóbicos entre el LPS de *Shigella spp* y las PME de *Neisseria meningitidis* (Sansone P y cols. 1993; Ticket CO y cols. 1998).

La idea central de nuestra investigación es la obtención de una cepa de *Shigella sonnei* autóctona y propietaria con sólidos atributos de cepa vacunal y a partir de ella, obtener un preparado en base a PME que contenga las Ipa, Porinas, y otras PME con capacidad inmunogénica y protectogénica, con el más amplio espectro de respuesta ante cepas diversas que sea posible, fundamentalmente a *S. sonnei*, *S. flexneri*, usando nuestra tecnología de plataforma de Proteínas de Membrana Externa y de esta manera contribuir a la compleja tarea de disponer de un cepario de cepas vacunales que puedan cubrir en el futuro todo el espectro patogénico del agente *Shigella* y de un primer preparado vacunal de amplio espectro contra este agente. Paralelamente, el presente trabajo pretende dejar establecida la tecnología de evaluación de cepas candidatas vacunales, la optimización de medios de cultivo específicos para cada cepa vacunal y los modelos animales principales; piedras angulares de la etapa pre clínica del desarrollo vacunal.

En función de todo esto, el trabajo microbiológico juega un rol importantísimo ya que la caracterización tanto fenotípica como genotípica en el estudio para la selección de una posible cepa a candidata vacunal es el primer paso y resultado de una cascada de tareas resultantes de un proyecto de investigación de este tipo, cuya finalidad es la obtención de una vacuna bacteriana, por lo que nos planteamos la siguiente hipótesis:

## **HIPOTESIS.**

Partiendo de aislamientos patógenos autóctonos obtenidos de pacientes cubanos, es posible caracterizar y seleccionar una cepa de *Shigella sonnei* con atributos de cepa vacunal, en base a los patrones de expresión de Proteínas de Membrana Externa que incluya las Ipa, con buen rendimiento de un preparado vacunal experimental obtenido por la tecnología proteoliposómica, el cual posee capacidad inmunogénica y protectogénica ante reto homólogo y heterólogo en dos modelos murinos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Seleccionar una cepa de *Shigella sonnei* como candidata a vacuna para la obtención de un preparado vacunal inmunogénico y protectogénico en modelos animales.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Caracterizar microbiológicamente y por expresión de proteínas de membrana externa, aislamientos autóctonos de *Shigella spp* para seleccionar posibles cepas vacunales.

### **Tareas**

- Caracterizar bioquímica y metabólicamente los aislamientos autóctonos de pacientes con diagnóstico de shigelosis.
- Caracterizar hasta especie los aislamientos autóctonos de *Shigella*.
- Seleccionar una posible cepa candidata vacunal por la consistencia y espectro de sus proteínas de membrana externa.
- Confeccionar Lotes de Referencia y de Trabajo de la cepa seleccionada.

2. Obtener un medio de cultivo óptimo para el crecimiento de la cepa seleccionada.

### **Tareas**

- Seleccionar un medio basal apropiado donde se pueda evaluar la función objetivo.
- Aplicar un Método de Optimización No Lineal adecuado que nos permita obtener el óptimo de la función objetivo propuesta.
- Evaluar el perfil de proteínas de membrana externa por STA y en electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) obtenidos con el medio de cultivo óptimo a nivel de

zaranda y en fermentación, teniendo en cuenta su consistencia y amplitud de espectro.

- Obtener y purificar el complejo PME-LPS a partir de la biomasa obtenida en los cultivos en fermentación con el medio optimizado y determinar la concentración de proteínas y LPS.
- Analizar los perfiles cromatográficos mediante cromatografía en gel de filtración Sephacryl S-1000.

**3.** Desarrollar dos modelos animales para la evaluación de la inmunogenicidad y protección.

#### **Tareas**

- Seleccionar una cepa virulenta de *Shigella sonnei* y una de *Shigella flexneri* como cepas de reto homóloga y heteróloga respectivamente.
- Montar dos biomodelos: Ratón – Pulmón y Test de Sereny.

**4.** Evaluar la capacidad inmunogénica y protectogénica (contra *Shigella spp*) del complejo PME-LPS

#### **Tareas**

- Inmunizar ratones Balb/c por vía intramuscular con el complejo PME-LPS y reto por modelo Ratón-Pulmón.
- Inmunizar curieles por vía intramuscular con el complejo PME-LPS y reto por Test de Sereny.
- Evaluar la Inmunogenicidad contra el complejo PME-LPS por ELISA e inmunoidentificación de las proteínas relevantes por Western Blot (WB).

### **Pertinencia, actualidad e impacto médico y social.**

En las últimas décadas, la necesidad por la vacunación ha ido creciendo debido a la emergencia general de resistencia a los antimicrobianos en muchos patógenos, en nuestro caso específicamente a la enfermedad diarreica producida por *Shigella*, unido al reconocimiento mundial de que las vacunas están entre las más seguras y costo efectivas intervenciones médicas contra enfermedades infecciosas. Dentro de este campo, las

vacunas combinadas merecen una especial atención por las ventajas que reportan y las facilidades desde el punto de vista tecnológico. La vacuna contra la shigelosis es una necesidad y emergencia mundial de salud por lo que tendrá un reconocimiento económico y social a la altura de la emergencia actual. Una vacuna contra este agente sería usada para ampliar la valencia de una vacuna antidiarreica.

Actualmente no se cuenta con ningún candidato vacunal que verdaderamente prometa resolver de manera efectiva y total los problemas de salud provocados por este microorganismo, por lo que está latente y vigente la solicitud hecha por el Comité de Prevención de Enfermedades Diarreicas Agudas de la OMS en 1996 acerca de esta vacuna tan necesaria por la morbi-mortalidad elevada que presenta sobre todo en niños menores de 5 años y en adultos de la tercera edad. (Center for Infectious Disease. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. 2005). El presente trabajo es por lo tanto pertinente y actual e impactaría en la solución del problema planteado.

### **Novedad y principales aportes del trabajo.**

Como resultado del presente trabajo y partiendo de cepas autóctonas de pacientes se obtuvo una cepa de *Shigella sonnei* (A-04), con todos los atributos de cepa vacunal, que constituye una pieza clave en el camino hacia una vacuna efectiva contra este tipo de agente patógeno y base de una propiedad valiosa del Instituto Finlay.

En el presente estudio se aplicó con éxito el método de obtención de extractos de proteínas de membrana externa de esta cepa vacunal empleando calor además de las soluciones de extracción para obtener el material que forma el complejo PME-LPS vacunal o núcleo principal de la vacuna, de este método y su aplicación vacunal para el género *Shigella*, no encontramos evidencias en la literatura anteriores al presente trabajo. Además, se obtuvo un medio semisintético optimizado que nos permitió obtener mayor crecimiento microbiano de *Shigella sonnei* A-04 manteniendo inalterables los perfiles de proteínas de membrana externa.

Se establecieron dos modelos animales que permitieron demostrar la capacidad inmunogénica y protectogénica del extracto de PME-LPS de *Shigella sonnei* A-04, los cuales no estaban montados con anterioridad en nuestro país.

## **TESIS TUTORADAS RELACIONADAS CON EL TEMA**

1. Identificación por SDS-PAGE de las proteínas de membrana externa mayoritarias de *Shigella spp* obtenidas de la purificación. Asesor. 2001. Trabajo Diploma.
2. Evaluación de condiciones en la fermentación de una cepa de *Shigella sonnei*. ASESOR. 2003. Ingeniería Química.
3. Estudio de una cepa de *Shigella sonnei* para su utilización en una cepa de reto. Tutora. 2004, Trabajo Diploma.

## **PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TEMA**

### **1.- Obtaining, preliminary characterization and immunological evaluation of *Shigella sonnei*. Arch. Med. Research. 2006.**

Autores: Miguel Martínez, Carmen Soto, José Luis Rodríguez, Yisabel Aranguren, Luis Imías, **Olga Martínez**, Luis Riverón, Arturo Talavera

### **2.- Selección de cepas de *Shigella sonnei* para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la shigellosis. VACCIMONITOR. Año 17 No.3 Sept-Dic. 2008. Pág. 13-20**

Autores: **Olga María Martínez Fernández**, Luis Riverón Martínez, Ainel Alemán Pérez, Arturo Talavera Coronel, Isis Montano Pérez, Carmen Soto Rodríguez, Ranset Diez Martín, Leopoldo José Araujo Pradere, Magaly Suárez Arencibia.

### **3.- Utilidad del modelo animal Ratón-Pulmón para evaluar la virulencia de posibles cepas vacunales de *Shigella spp*.**

Autores: **Olga M. Martínez Fernández**; Luis Riverón Martínez; Juan Fco. Infante Bourzac; Viviana Pérez Amat; Sergio Sifonte Rodríguez; Isis Montano Pérez; Carmen Soto Rodríguez, Ranset Diez; Leopoldo Araujo. **VACCIMONITOR**. Año 17 No. 1. Enero-Abril, 2008. Pág. 27-30

### **4.- Aislamientos de *Shigella spp* en muestras de heces fecales de un hospital en Ciudad Habana. Enero de 2003 hasta octubre 2008. (Enviada a VACCIMONITOR)**

Autores: **Olga Ma. Martínez**, Mavis Acosta, Tania Michel, Leopoldo J. Araujo, Lionia Vasconcelos, Luis Riverón, Arturo Talavera

## **PREMIOS DEL FORUM DE CIENCIA Y TÉCNICA RELACIONADA CON EL TEMA**

### **1. Forum de Ciencia y Técnica del Instituto Finlay. RELEVANTE**

**Selección de cepas de *Shigella sonnei* para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la shigellosis.**

Autores: Olga María Martínez Fernández, Luis Riverón Martínez, Arturo Talavera Coronel, Isis Montano Pérez, Carmen Soto Rodríguez, Ranset Diez Martín.

### **2. Forum de Ciencia y Técnica del Instituto Finlay. DESTACADA**

**Utilidad del modelo animal Ratón-Pulmón para evaluar protección de candidatos vacunales de *Shigella spp.***

Autores: Olga M. Martínez Fernández; Luis Riverón Martínez; Juan Fco. Infante Bourzac; Viviana Pérez Amat; Sergio Sifonte Rodríguez; Isis Montano Pérez; Carmen Soto Rodríguez, Ranset Diez, Helina Parajón, Isabel García Riva.

### **3. Forum de Ciencia y Técnica Provincial. MENCIÓN**

**Selección de cepas de *Shigella sonnei* para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la Shigellosis.**

Autores: Olga María Martínez Fernández, Luis Riverón Martínez, Arturo Talavera Coronel, Isis Montano Pérez, Carmen Soto Rodríguez, Ranset Diez Martín..

## **Eventos.**

**1. Optimización de un medio de cultivo semisintético para el crecimiento de *Shigella sonnei* con interés vacunal. CUBAFARMACIA 2002. VIII CONGRESO DE LA SOCIEDAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS. V ENCUENTRO IBEROAMERICANO SOBRE LAS CIENCIAS FARMACEUTICAS Y ALIMENTARIAS.**

**2. Obtaining, preliminary characterization and immunological evaluation of *Shigella sonnei*. V CONGRESO INTERNACIONAL DE LA SOCIEDAD CUBANA DE QUIMICA. 2004.**

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Bacterias Gram Negativas. Generalidades**

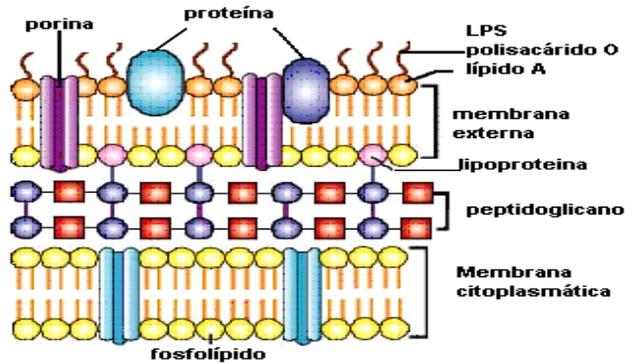
Las bacterias son organismos vivos de vida libre capaces de producir múltiples enfermedades en el ser humano. Conocer la relación entre el hombre y las bacterias capaces de causar enfermedad resulta un tema de gran interés en la actualidad.

Las bacterias pueden clasificarse según sus propiedades tintoriales, morfología y actividad metabólica características de cada especie. De acuerdo con los patrones de tinción de Gram, se les divide en Gram positivas y Gram negativas que se tiñen de azul o violeta y rojo o rosado oscuro respectivamente. La pared celular bacteriana brinda resistencia contra la lisis, rigidez y forma, por lo que a través de la tinción de Gram se evidencian las diferencias estructurales de la pared.

Las bacterias Gram negativas tienen una membrana plasmática externa por fuera de una pared celular más fina que la hace más flexible, está constituida por una bicapa asimétrica formada en su superficie externa por LPS (endotoxinas) y permeabilizada por complejos de tres subunidades idénticas de canales proteicos (porinas). El periplasma ocupa el espacio entre las dos membranas y contiene enzimas, quimiorreceptores y proteínas de transporte. (Madigan MT y cols. 1997; Virell G.1997)

#### **2.1.1 Membrana Externa de las bacterias Gram-negativas.**

En estudios de microscopía electrónica, la pared celular de bacterias Gram negativas se observa constituida por múltiples capas, observándose una membrana externa, una membrana interna cercana al citoplasma, un espacio periplasmático entre las dos membranas, así como una capa interna y delgada (2-3 nm de espesor), formada por moléculas de peptidoglicano que se encuentran unidas covalentemente a lipoproteínas que se proyectan en la membrana externa (Gary, E y cols. 2004).



**Figura 1. Estructura de la pared celular de bacterias Gram negativas.**

La membrana externa está presente sólo en bacterias Gram negativas. Constituye una bicapa lipídica de aproximadamente 7 nm de espesor que funciona como una barrera de difusión externa a moléculas (con un rango de peso molecular variable entre especies). Es la interfase entre la bacteria y el medio que la rodea; constituyendo una importante barrera contra agentes que le pueden ser perjudiciales, tales como compuestos químicos tóxicos, antibióticos y detergentes. Se ha visto que es poco permeable al flujo de compuestos altamente lipofílicos, en un factor entre 50 – 100 en comparación con la membrana citoplasmática (Mota MI y cols. 2005). Sin embargo se conoce con seguridad que moléculas hidrofílicas de masa molecular no mayor a 700 daltons la atraviesan en forma pasiva e inespecífica, siendo la explicación a este fenómeno debido a proteínas presentes denominadas porinas que tienen capacidad de formar poros de difusión transmembranosos (Madigan, MT y cols. 1997). La membrana externa se compone fundamentalmente de proteínas, lipoproteínas, fosfolípidos y el LPS, molécula exclusivamente presente en la membrana externa de bacterias Gram negativas. Los fosfolípidos se localizan principalmente en la capa interna de la membrana externa, así como las lipoproteínas que conectan la membrana externa a los peptidoglicanos. (Lépori LR. 2007).

### **2.1.2 Lipopolisacárido.**

El LPS se encuentra solamente en la cara exterior de la membrana externa. Contiene una región hidrofóbica: el lípido A, anclado a la membrana, y dos regiones polisacáridas que

se proyectan hacia el exterior: el “core” o núcleo y el antígeno O. El LPS frecuentemente es llamado endotoxina por sus efectos tóxicos sobre las células de mamíferos.

La toxicidad del LPS es debida al lípido A, formado por dos residuos de glucosamina con 6 largas cadenas de ácidos grasos covalentemente unidas a ellos. La región “core” o núcleo contiene azúcares de 7 y 8 átomos de carbono, así como hexosas y hexosaminas. Hacia el otro extremo del core, se encuentra unido el antígeno O, cadena formada por unidades repetitivas de oligosacáridos, donde cada uno de estos está constituido por tres o cuatro azúcares que varían grandemente. El lípido A, componente principal del LPS, causa daños fisiológicos por inducción de factores celulares. Sin embargo, el polisacárido O es el que determina la antigenicidad de la bacteria y su resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero (Zhong QP y cols. 1999; Brooks GF y cols. 2004).

Los genes que codifican al polisacárido O se encuentran localizados en el plásmido de virulencia, que además presenta los genes que codifican los factores de invasión (De-Qi, X. y cols. 2002).

### **2.1.3 Proteínas de Membrana Externa.**

La membrana externa de las bacterias Gram negativas presenta una gran variedad de proteínas que realizan funciones de importancia vital para el patógeno como receptores de bacteriófagos y bacteriocinas (Lugtenberfg y cols. 1985).

La membrana externa de estas bacterias tienen algunas proteínas mayores llamadas porinas que por su papel en la permeabilidad celular, forman grandes canales que median inespecíficamente la penetración pasiva de iones y pequeñas moléculas hidrofílicas hasta un límite de exclusión cerca de 600 – 700 daltons. Además de su actividad formadora de poro, las porinas constituyen receptores de bacteriófagos y en el caso de bacterias patógenas sirven como diana del sistema inmune (Galdiero F y cols. 1990; Galdiero F y cols. 1993), exhibiendo alta inmunogenicidad, encontrándose expuestas en la superficie celular algunas propiedades adicionales como la preferencia por ciertas cargas o por ciertos grupos químicos que son encontradas en este tipo de proteínas (Rosenbusch JP y cols. 1974; Lugtenberfg y cols. 1985; Hancock REW y cols. 1987; Lupi N y cols. 1989 ; Hoenger A y cols. 1993). En este grupo de proteínas encontramos a las Omp C, Omp F, Lam B y Pho E; las mismas son expresadas continuamente aunque sus niveles fluctúan bajo

determinadas condiciones de crecimiento (Westphal O y cols. 1965; Tapiopalva E y cols. 1985), considerándose por estas características por algunos autores como atractivas para candidatos vacunales (Roy S y col. 1994).

Solo las porinas OmpF y OmpC se expresan o se producen en condiciones normales de medio de cultivo además de la OmpD de *Salmonella typhimurim*, siendo de abundancia relativa ya que está regulada por señales medio ambientales, tales como la osmolaridad. Todos estos datos permiten suponer el rol que jugarían las PME en la patogenicidad y virulencia de las bacterias.

Otras proteínas tienen funciones vitales para el patógeno como son: función secretora, diseminación celular, proteasas y las involucradas en el transporte y utilización del hierro.

Dentro de las que tienen función secretora se encuentra por ejemplo: el sistema especializado de secreción Mxi-Spa formado por al menos veinte proteínas que constituyen estructuras complejas unidas a la membrana, necesarias para la exportación y correcta localización de las proteínas Ipa. Este sistema es considerado el efector central no sólo de la entrada de la bacteria a las células epiteliales del hospedero, sino también del escape fagosomal y de la inducción de apoptosis en macrófagos. Entre las proteínas de membrana que lo integran han sido ampliamente estudiadas: MxiG, MxiD y MxiM (Allaoui A y cols.1993; Allaoui A y cols. 1995; Arockiasamy A y cols. 2000).

Las proteínas con función de diseminación celular son las conocidas como Proteínas de Diseminación Intercelular (IcsA) denominadas también VirG, con un PM de 120-KDa involucradas en la hidrólisis de ATP. La expresión de IcsA en la superficie de *Shigella* es suficiente para dirigir la motilidad dependiente de actina de la bacteria (Laine RO y cols. 1997).

Las proteasas que se encuentran en una gran variedad de bacterias Gram negativas, con un determinado porcentaje de identidad entre ellas, se han visto implicadas en ocasiones en la patogénesis de la bacteria. La actividad proteolítica de este tipo de proteínas está probablemente involucrada en una gran variedad de mecanismos de patogenicidad de la bacteria, que van desde la defensa bacteriana y la infiltración de los tejidos mediada por plásmido, hasta la motilidad dentro de las células infectadas (Vandeoutte-Rutten L y cols. 2002).

Por último las proteínas involucradas en el transporte y utilización del hierro son de gran interés debido a que la habilidad de los patógenos de adquirir hierro, constituye un determinante importante de virulencia microbiana. Las especies de *Shigella* poseen al menos tres sistemas diferentes de transporte de hierro, constituidos por un gran número de PME (Purdy GE y cols. 2001).

Podemos resumir diciendo que en el género *Shigella* se describen múltiples proteínas, encontrando entre ellas la de 120 KDa que promueve un raro movimiento intracelular de la bacteria y conduce a la infección de las células adyacentes por la formación de protusiones. Este movimiento el cual envuelve la nucleación, polimerización y subsiguiente polarización de actina se refiere al fenotipo Ics de difusión intracelular e intercelular de la bacteria (Vasselon T y col. 1991; d'Hauteville H y cols. 1992). Una proteína de 30 KDa que es un factor regulador positivo de los niveles transcripcionales para algunas proteínas asociadas a la virulencia (Kato JI y cols. 1989; Sakai T y cols. 1988) y otra PME; la MxiD, esencial para la secreción de las Ipa de *Shigella spp* invasiva.

## **2.2 Características generales del género *Shigella spp***

El primer aislamiento del género *Shigella* se le atribuye a Chantemesse y Widal en 1888 de muestras de heces fecales de soldados con disentería. Una década después durante una epidemia de disentería en Japón, Keyoshi Shiga hace una descripción más completa del género, por lo que es designado *Shigella* y el organismo referido y denominado por él como *Bacillus dysenteriae*, conocido ahora como *Shigella dysenteriae* 1 (Bennish ML y cols. 1991).

Posteriormente en 1901 Flexner y Castellani en Ceilán aislaron un microorganismo similar al *Bacillus dysenteriae*, los que sugieren denominarlo *Bacillus pseudodysenteriar*, referido más tarde por Tod como *Bacillus pseudodysenteriae flexneri* (Keusch GT y cols. 1992), llamado hoy *Shigella flexneri*. En 1931 Boyd en Bangladesh, India, estudió 5000 aislamientos de casos típicos de disentería bacilar, encontrando un grupo de organismos similares a *Shigella flexneri* que no aglutinaban con el antisuero específico y sí con sueros homólogos definiéndose así otra especie, *Shigella boydii*. Por los trabajos extensivos aportados por Sonnei en 1915 la cuarta especie descrita por Krusse, Castellani y Duval como una variante fermentadora tardía de la lactosa y ser serológicamente distinta, se conoce como *Shigella sonnei* (Keusch GT y cols. 1992).

Ubicación taxonómica actual:

Reino: Procariota

División II: Bacteria

Parte 8: Bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Shigella* (Vedros NA. 1984)

Especies: - *Shigella dysenteriae* (A) 13 serotipos (Keusch GT y cols. 1989).

- *Shigella flexneri* (B) 8 serotipos (Zwadyk P. 1992).

- *Shigella boydii* (C) 18 serotipos (Zwadyk P. 1992).

- *Shigella sonnei* (D) 1 serotipo (Keusch GT y cols. 1989).

Los miembros del género *Shigella* son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos de 1,5 µm de longitud por 0,8 µm de diámetro que corresponden a la familia Enterobacteriaceae. Se encuentra estrechamente relacionada con el género *Escherichia* por sus propiedades bioquímicas, serológicas y similitudes genéticas, sugiriendo que pudieran ser un subtipo de *Escherichia coli* (Jin Q y cols. 2002; Wel J y cols. 2003).

El género está dividido en 4 especies: *Shigella dysenteriae* (grupo A), *Shigella flexneri* (grupo B), *Shigella boydii* (grupo C) y *Shigella sonnei* (grupo D) (Noriega FR y cols. 1999), los serogrupos A, B, C son muy similares fisiológicamente, mientras que el D puede ser diferenciado de los otros por la realización de pruebas bioquímicas como la b – D – galactoxidasa y Ornitina descarboxilasa positivas (Baron's Handbook, 2000).

Esta división en serotipos está basada en diferencias bioquímicas y variaciones en su Antígeno O (Ag-O). Todas las especies utilizan la glucosa oxidativa y la fermentan, algunos de ellos también usan el manitol y con escasas excepciones producen gas (Grayd LD y cols. 1995), no fermentan la lactosa, ni producen lisina descarboxilasa. La mayoría de las especies son catalasa positiva y oxidasa negativa. No utilizan el citrato ni el acetato como única fuente de Carbono, no hidrolizan la urea, ni descarboxilan la lisina y no forman acetil-metilcarbinal (Keusch GT y cols. 1992; Zwadyk P y cols. 1992). Son químicooorganotróficos, no crecen en Cianuro de potasio (KCN), ni producen sulfhídrico (H<sub>2</sub>S). Son patógenos del hombre y otros primates, produciendo disentería bacilar. Se diferencian del género *Salmonella spp* por ser inmóviles y no producir ureasa ni desaminasas.

*Shigella* presenta gran resistencia al efecto detergente de las sales biliares y a la degradación por parte de las enzimas digestivas, debido a poseer al igual que el resto de las enterobacterias, una membrana externa que juega un papel fundamental en esta resistencia. Esta membrana delimita al citoplasma bacteriano y está separada de la membrana interna por el espacio periplasmático, que contiene una capa de peptidoglicano (Nikaido H y cols. 1979). La superficie de la bicapa lipídica de la membrana externa está compuesta por fosfolípidos y LPS. La parte lipofílica del LPS que se denomina lípido A se une a la estructura piliosídica de la superficie bacteriana que constituyen el Ag-O. Este poliósido de superficie confiere a las colonias un aspecto regular, liso y brillante en agar, a diferencia de las colonias irregulares y rugosas. Sobre la base del Ag-O, el género *Shigella* está subdividido en más de 40 serotipos (Clerk P. 1988).

Algunas cepas poseen Ag-K (antígeno de envoltura), el cual no tiene importancia para el serotipaje; pero puede interferir en la reacción serológica del Ag-O cuando se encuentra presente. Este Ag de envoltura puede ser eliminado por ebullición de la suspensión celular antes del tipaje del microorganismo (Zwadyk P y cols. 1992). A su vez cada serogrupo puede subdividirse en diferentes tipos, en base a variantes del Ag-O, estos serotipos se designan mediante números arábigos. Pueden diferenciarse además, serovares en algunas especies. El conocimiento detallado de la estructura antigénica resulta de utilidad máxima para realizar estudios epidemiológicos.

### **2.3 Virulencia**

Estudios extensivos “in vitro” de la invasión a las células epiteliales del colon por *Shigella*, han permitido la definición de fenotipos básicos de virulencia tales como la entrada, la motilidad intracelular (Bernardini ML y cols. 1989) y la expansión intercelular (Mounier J y cols. 1997).

Los genes requeridos para estos tres eventos se encuentran localizados en el plásmido de virulencia que es funcionalmente idéntico en todas las especies de *Shigella* (De Geyber C y cols. 1997). Solo un fragmento de 30-Kb de dicho plásmido es necesario y suficiente para la entrada de la bacteria a células en cultivo. Este fragmento está compuesto por dos regiones o locus: uno que codifica a los efectores de la entrada, conocidos como Antígenos de Invasión Plasmídicos (proteínas Ipa: IpaA (70 KDa), IpaB (62 KDa), IpaC (42 KDa) e

IpaD (38 KDa) (Baudry B y cols. 1988) y otro que codifica al sistema especializado de secreción (Mxi-Spa). (Allaoui A y cols. 1992; Andrews GP y cols. 1992; Allaoui A y cols. 1993; Mounier J y cols. 1997). Análisis genéticos han demostrado que la diseminación intercelular es dependiente de la expresión de un gen de virulencia plasmídico designado *icsA* o *virG* (Coster TS y cols. 1999) y que la PME de 120 KDa codificada por dicho gen, nombrada Proteína de Diseminación Intercelular A (IcsA), actúa como un reclutador citosólico de filamentos de actina.

En el plásmido de *Shigella spp* se han podido identificar tres regiones implicadas en la virulencia. La primera región contiene un gen llamado *virF* que es necesario para la fijación del colorante RC (Sakai T y cols. 1986; Sankaran K y cols. 1989) demostrando que la fijación del mismo está sometido a regulación por la temperatura, asociado a la virulencia (Maurelli AT y cols. 1984).

Una segunda región *virG* es necesaria para la reinfección de las células adyacentes y la formación de placas de lisis en un tapiz celular en cultivo (Makino S y cols. 1986). La tercera región que aparece en el plásmido de virulencia de 33 Kb, contiene muchos segmentos génicos implicados en el proceso de internalización de las células epiteliales (Sasakawa C y cols. 1986).

La expresión del fenotipo virulento de *Shigella* está regulada por mecanismos complejos que involucran tanto a los genes cromosomales como a los del plásmido de invasión, requiriéndose de la porción completa del LPS codificada cromosomalmente (Lindberg AA y cols. 1991; Sansonetti PJ. 1992).

Otras regiones dentro del plásmido de virulencia están representadas por los segmentos *ipaABCD*, *ippI*, e *invGF*, que codifican para 5 proteínas que inducen respuesta inmune (Hale TL y cols. 1985; Kato JI y cols. 1989; Watanabe H y cols. 1990). La mayor de estas proteínas es producto del segmento génico cromosomal *virB* (*icsA*), el resto de las proteínas están codificadas por el segmento génico cromosomal *ipa*, el cual corresponde a la región 2 en el plásmido de virulencia. Estas últimas proteínas fueron designadas A (72 KDa), B (58 KDa), C (43 KDa) y D (39 KDa) en orden decreciente de su PM, consecuentemente con esto se ha denominado *ipaABCD* a los genes que codifican para estas proteínas (Buysse JM y cols. 1987). Los anticuerpos evocados por infección con

*Shigella flexneri* 2a presentaron reactividad cruzada con proteínas de similar masa molecular pertenecientes a diferentes serotipos de *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii* (Hale TL y cols. 1985).

La región clonada para ipaBCD puede ser usada además como una sonda de DNA específica para identificar organismos enteroinvasivos (Venkatesan MM y cols. 1985). Estas observaciones sugieren que el segmento génico cromosomal *ipa* está altamente conservado en el plásmido de invasión del género *Shigella spp* y la prominente respuesta inmune evocada por la menor de estas proteínas, aseguran su asociación con el proceso de patogenicidad.

Se han hecho estudios de estas proteínas tanto “in vitro” como en modelos animales que sugieren que para que ocurra una translocación eficiente de *Shigella* a través de la barrera epitelial y el inicio de una respuesta inflamatoria, es necesario el complemento completo de las proteínas Ipa. Estas proteínas son sintetizadas y almacenadas dentro del cuerpo bacteriano liberadas a través del sistema secretor tipo III por el contacto con la célula hospedera. Se forma un complejo IpaB-IpaD que regula el flujo de proteínas Ipa (Ménard R y cols. 1993). Una vez liberado este complejo, se forma otro complejo, IpaB-IpaC que interactúa con la membrana de la célula epitelial perforando la barrera epitelial que le sirve de puerta de entrada para la translocación de las otras proteínas Ipa dentro del citoplasma del huésped (Cersini A y cols. 2003). Cuando la vacuola de *Shigella* se encuentra dentro de la célula infectada, la Ipa B produce la lisis de la misma, la bacteria estará libre en el citosol de la célula hospedera y se infectan las células adyacentes que son aniquiladas rápidamente por un corte del metabolismo energético celular inducido por las bacterias (Sansone P. 1992; High y cols. 1992). El crecimiento bacteriano intracelular causa cesación de la síntesis proteica, al principio se le atribuyó a la toxina Shiga la muerte celular; pero después se demostró que mutantes que no la poseían acababan igualmente en muerte celular. Más recientemente se ha señalado a la inducción de apoptosis o muerte celular programada como la responsable de la muerte celular (Salyers AA y cols. 2001).

La toxina de *Shigella* es un factor de virulencia que juega un rol importante en la patogenia (Clerc P. 1988). Además la aparición de una grave complicación de la shigelosis, el Síndrome Hemolítico Urémico (SHU), está correlacionado con la producción de toxina

disentérica, que constituye un factor agravante para la producción de hemorragias. (Karmali MA y cols. 1985; Clerc P. 1988).

Esta toxina, también conocida como toxina disentérica Shiga, descrita en 1903 como una potente neurotoxina capaz de provocar parálisis y convulsiones, se creía primeramente que era producida solamente por *Shigella dysenteriae* tipo 1; pero se han encontrado similares en otras especies y en ciertas cepas de *Escherichia coli* (Shiga like toxin). Es una toxina de tipo A-B que se libera al medio durante la lisis bacteriana, se une a las células de mamíferos, se introduce por endocitosis y finalmente detiene la síntesis proteica a nivel ribosomal presentando múltiples actividades tóxicas, demostrando su actividad enterotóxica, como son:

- induce acumulación de líquido en el modelo de asa ileal de conejo
- actúa como neurotoxina
- induce apoptosis
- produce daño a nivel de vasos sanguíneos en el Síndrome Hemolítico Urémico

Igualmente posee actividad citotóxica sobre las células HeLa en cultivo. La toxina de Shiga ejerce una actividad N-glicosidasa sobre el ARN ribosomal 28S de la subunidad 60S del ribosoma, así como una inhibición de la síntesis proteica de la célula eucariota. El gen de la toxina se encuentra situado en el cromosoma, pero se desconoce su localización exacta. (Clerc P. 1988; Keusch GT y col., 1992; Zwadyk P y cols. 1992).

Al menos dos toxinas más han sido descritas con actividad endotóxica que pueden encontrarse en especies diferentes a *Shigella dysenteriae*, denominadas ShET1 y ShET2, responsables de la acumulación de líquido en el asa intestinal y de la diarrea acuosa al principio de la shigelosis.

El LPS de *Shigella* juega un papel importante en el daño celular, y no parece intervenir en la invasión, en la replicación, ni en la diseminación entre células. Se ha demostrado que cepas rugosas de *Shigella* que no poseen el antígeno O conservan su capacidad de invadir y replicarse en cultivos celulares; siendo capaces de producir inflamación en el Test de Sereny (Salyers AA y cols. 2001).

## 2.4 Infección por *Shigella spp*

Las especies del género *Shigella* constituyen los agentes principales de la disentería bacilar o shigelosis que afecta a primates y humanos. Esta enfermedad difiere de la abundante diarrea acuosa comúnmente observada producto de una infección con *Vibrio cholerae* o con *Escherichia coli enterotoxigénica*, en que la deposición disentérica es escasa y contiene sangre, mucus y células inflamatorias. Sin embargo, en algunos individuos que padecen la shigelosis, una diarrea de volumen moderado es un pródromo de la única manifestación de la infección (Baron's Handbook. 2000)

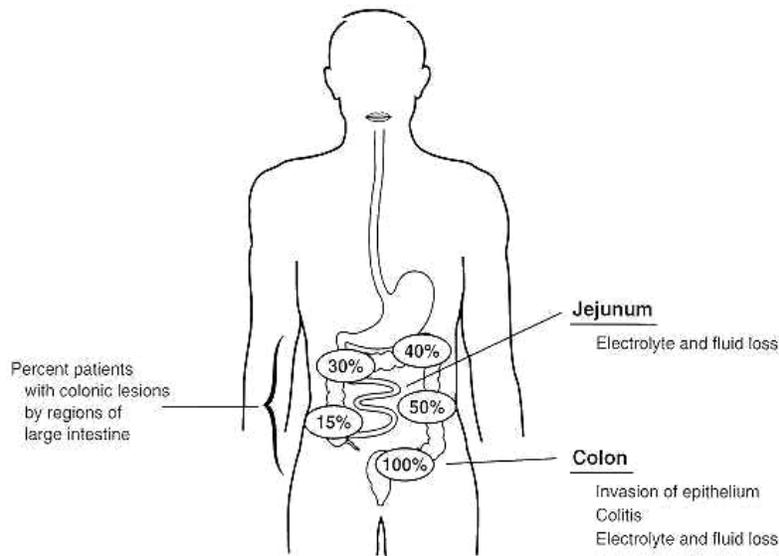
El mecanismo patogénico de la shigelosis es complejo, involucrando un posible cuadro diarreico enterotóxico y/o citotóxico. Es el resultado de la adherencia e invasión de *Shigella* a células epiteliales de la mucosa del ileon terminal y colon, con inflamación y ulceración de la misma, provocando las deposiciones con sangre, mucus y/o la diarrea febril.

Estudios microscópicos de células infectadas han servido para definir la entrada y diseminación intra e intercelular al organismo. La mayoría de estos conocimientos en la patogenia de la infección por *Shigella spp* se han logrado mediante cultivos celulares, en especial la línea celular HeLa, aunque hay estudios recientes más sofisticados donde han usado líneas celulares intestinales del hombre crecidas sobre un soporte de filtro permeable con diferentes cargas de células. (Philpott DJ y cols. 2000).

Las lesiones inflamatorias de la mucosa colónica afectada por *Shigella spp* se hallan fundamentalmente a nivel de la placa de Peyer, lo que sugiere que las células pudieran entrar inicialmente por la explosión de las células M, naturalmente fagocíticas, permitiendo la entrada en la cavidad fundamentalmente sub-epitelial donde residen los macrófagos encargados de captar antígenos de la luz intestinal y presentarlos al tejido linfóide de la placa de Peyer.

Las lesiones rectosigmoidales provocadas por la shigelosis, se asemejan a aquellas provocadas por una colitis ulcerativa. En la Figura 2 podemos observar con porcentajes indicados, que hay extensión proximal de eritema, edema, pérdida de la superestructura vascular, hemorragia focal y capas adherentes de exudación purulenta. Muestras de biopsia de áreas afectadas son típicamente edematosas, con congestión capilar, hemorragia focal, hiperplasia de la cripta, disminución de las células del cáliz, infiltración de células

mononucleares y PMN, desgarramiento de las células epiteliales, pérdida de eritrocitos y microulceraciones.



**Figura 2. Lesiones provocadas por la shigelosis.**

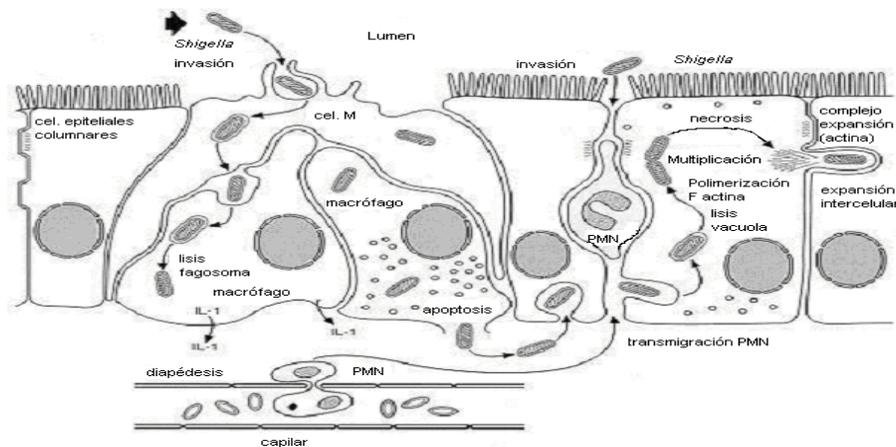
Previo a la muerte celular los macrófagos infectados liberan IL-1B, este proceso inflamatorio natural, producido por esta citoquina trae como consecuencia el reclutamiento de células PMN que se infiltran en el tejido infectado desestabilizando el epitelio (Zychlinsky A y cols. 1994). La pérdida de integridad de la barrera epitelial permite mayor entrada de bacterias que atraviesan el espacio sub-epitelial, teniendo acceso al lado basolateral de las células epiteliales. De esta forma *Shigella spp* invade la cubierta de las células epiteliales del colon, pasa de célula a célula y se disemina a través de todo el tejido observándose también el ingreso a través de la célula no fagocítica (Zychlinsky A y cols. 1996).

En cultivos celulares, la bacteria inicialmente se adhiere a la célula, provoca la reorganización de la actina del citoesqueleto celular en las inmediaciones y la formación de pseudópodos. La célula huésped, normalmente no fagocítica engloba e ingiere a la bacteria adherida, la cual a su vez escapa del fagosoma y se multiplica en el citoplasma de la célula. (Maurelli y cols. 1985). Continúan produciéndose reordenamientos de actina alrededor de la bacteria que le permiten moverse a través de la célula y luego pasar a otra contigua hasta diseminarse por todo el tejido. Una vez libre en el citoplasma, la bacteria exhibe dos tipos

de movimientos, por un lado, la polimerización de actina en un extremo de la bacteria donde crea una estructura tipo “cola de cometa”, que propulsa a la bacteria a través del citoplasma y por otro lado, se ha observado un movimiento unidireccional de la bacteria a lo largo de los filamentos de actina. (Valdés – Dapena. 2001)

Los efectores de entrada de *Shigella spp* son los llamados antígenos Ipa, los cuales se localizan en plásmidos de PM entre 120 – 140 MD, algunas de estas proteínas codificadas por esos plásmidos, intervienen por ejemplo en la ruptura de la pared del fagosoma o bien son exportados a la superficie bacteriana. Las integrinas, proteínas de superficie celular podrían ser los receptores de las proteínas Ipa, las que solo parecen actuar luego de que las bacterias han ingresado a través de las células M. (Wassef J y cols. 1989).

El mecanismo patogénico que provoca estas manifestaciones patológicas está representado en la Figura 3. La ilustración incorpora observaciones experimentales obtenidas a partir de cultivos de tejidos y de modelos animales de la shigelosis, tales como intestinos ligados de conejos inyectados con organismos virulentos. En este último modelo, la infección con *Shigella* se inicia en las células membranosas (células M) que están asociadas con folículos linfoides macroscópicos (placas de “Peyer”). Biopsias realizadas a monos Rhesus sugieren que *Shigella* también infecta los folículos linfoides microscópicos en el colon del primate (Baron’s Handbook. 2000; Rathman MPL y cols. 2000)



**Figura 3. Histopatología de la colitis aguda luego de una infección con *Shigella*.**

## 2.5 Epidemiología.

El ser humano es el único reservorio conocido hasta el momento, siendo los primates cautivos, hospederos accidentales. La transmisión de *Shigella* ocurre fundamentalmente de persona a persona, hecho facilitado por su bajo inóculo infectante, ya que la dosis infectante puede ser tan baja como ser de 10 a 100 bacterias en la mayoría de las especies e incluso menos para el caso de *Shigella dysenteriae*.

En países en desarrollo, con prevalecientes condiciones inadecuadas de sanidad y hacinamiento, la infección es transmitida más frecuentemente por la excreta de individuos infectados vía fecal - oral. El transporte aéreo puede contribuir a su diseminación, por la liberación de heces fecales y alimentos. Las especies más comunes, *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri*, son también las más virulentas. También, brotes esporádicos producidos por la infección con *Shigella sonnei*, son transmitidos por la contaminación del agua o por alimentos crudos, existen reportes que vinculan esta enfermedad a una gran diversidad de ellos (leche, frutas, verduras crudas y alimentos preparados manipulados por personas infectadas), así como la exposición a aguas recreativas (piscinas, parques acuáticos, fuentes, etc.) (Gómez HF y cols. 1998; Rivera-Matos y cols. 1996). Los brotes más recientes, usualmente involucran sistemas semipúblicos de agua, tales como aquellos presentes en campos, parques de caravanas, entre otros.

La transmisión fecal - oral directa puede ocurrir también en instituciones de cuidado de niños en los cuales el contagio por esta vía se ve facilitado y en hospitales mentales, entre otras. Los hombres homosexuales se encuentran en un alto riesgo de infección con la bacteria, capaz de ser una complicación crónica y recrudescente en infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Baron's Handbook. 2000).

*Shigella* es sin dudas el agente que se asocia con mayor frecuencia a diarrea con sangre habiéndose también aislado vinculado al Síndrome Hemolítico Urémico (Varela G y cols. 1991).

La enfermedad en adultos es menos habitual y se considera que personas en contacto con niños constituirían un grupo de mayor riesgo (madres, educadoras, etc.). El período de incubación varía de 1 a 7 días; pero típicamente es de 2 a 4, con predominio en los meses de verano ocurriendo con frecuencia la transmisión intrafamiliar. La infección intrahospitalaria es poco frecuente, dado que habitualmente se aíslan a estos pacientes. La

posibilidad de infección existe mientras se esté excretando por las heces el microorganismo. Aun sin tratamiento la portación en el período de convalecencia no es mayor de las 4 semanas, siendo más allá de un año en caso excepcional.

Respecto a las diferentes especies y su aislamiento según regiones, tenemos que en países en vías de desarrollo *Shigella flexneri* es la más frecuente seguida de *Shigella dysenteriae*, pudiendo provocar brotes en países como África o la India. En países desarrollados predomina claramente *Shigella sonnei* seguida de *Shigella flexneri*.

La especie más frecuentemente aislada en América Latina y Cuba es *Shigella flexneri* seguida de *Shigella sonnei*. Más raramente se aísla *Shigella dysenteriae* y *Shigella boydii* (Basualdo W y cols. 1998; López EL y cols. 2000; Torres ME y cols. 2001).

## **2.6 Cuadro clínico y tratamiento.**

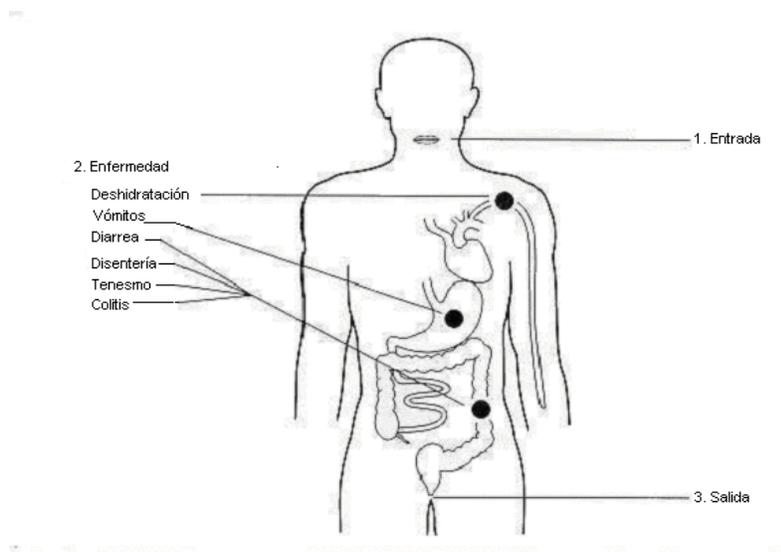
La shigelosis o disentería bacilar se define como una infección gastrointestinal severa invasiva del colon, particularmente de las porciones rectal y sigmoide, donde los hallazgos microscópicos varían desde colitis hasta ulceraciones mucosas severas.

La enfermedad puede ocurrir a cualquier edad; pero es más frecuente entre el segundo y tercer año de vida, siendo rara antes de los 6 meses, disminuyendo su incidencia pasados los 5 años de edad. En algunos casos, especialmente en los niños de corta edad y los ancianos, la diarrea puede ser tan grave que el paciente necesite ser hospitalizado. Una infección aguda con fiebre elevada también puede ir acompañada de ataques o convulsiones en niños menores de 2 años de edad. Algunas personas infectadas pueden no tener ningún síntoma; pero transmitirán la bacteria. (Center for Infections Diseases. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. 2005). Habitualmente se presenta con síntomas que evidencian colitis inflamatoria severa, diarrea con sangre, mucus o pus, leucocitos, fiebre elevada, aspecto tóxico, dolor abdominal, pujos, tenesmo y/o prolapso rectal. También puede presentarse diarrea acuosa al principio del cuadro clínico, no ocurriendo en adultos sanos cuadros tan severos de la enfermedad. Se presume que en niños pequeños se observan las formas más graves debido a la falta de inmunidad preexistente.

En pacientes sanos la mayoría de los episodios son autolimitados, resolviéndose entre 5 y 7 días sin dejar secuelas. Las complicaciones más severas como la bacteriemia, que pueden comprometer la vida, se ven en los inmunodeprimidos, desnutridos y niños pequeños, siendo la más frecuente la producida por gérmenes de la flora intestinal; la bacteriemia por

*Shigella* es mucho más rara y se observa casi exclusivamente en inmunocomprometidos, (Neglia TG y cols. 1976; Gómez HF y cols. 1998). Las alteraciones que se presentan fundamentalmente son las hidro-metabólicas (deshidratación, hiponatremia, hipoglicemia) y las complicaciones intestinales como megacolon tóxico o perforación intestinal. Otras complicaciones no comunes; pero presentes son la neuritis tóxica, artritis y miocarditis. En niños puede verse el Síndrome Hemolítico Urémico. Sin embargo, pacientes con genotipo HLA-B27 desarrollan comúnmente artritis o Síndrome de Reiter's después de haber padecido de shigelosis. (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy...//sections.htm, Section 13. Infectious Diseases.../sec13.htm, Chapter 157. Bacterial Diseases)

Las convulsiones y otras manifestaciones neurológicas se observan casi únicamente en menores de 5 años y se le atribuyen a la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae*; observándose también en infecciones causadas por otras especies y serotipos considerados la causa de disturbios metabólicos.



**Figura 4. Características clínicas de la shigelosis en humanos.**

La shigelosis es generalmente una enfermedad autolimitada, y la decisión de prescribir antibióticos depende de la severidad de la enfermedad, la edad del paciente y la probabilidad de propiciar la transmisión de la infección (Baron's Handbook. 2000). Un tratamiento efectivo con antibióticos reduce la duración promedio de la enfermedad de aproximadamente 5-7 días a 3 días y también reduce el período de excreción de *Shigella* después que han disminuido los síntomas.

Medicamentos absorbibles tales como la Ampicillina (2 g/día durante 5 días) son muy probables de ser efectivos cuando el aislamiento es adecuado. El Trimethoprim (8 mg/kg/día)/Sulfamethoxazol (40mg/kg/día), erradican los organismos sensibles rápidamente del intestino; pero la resistencia a este agente está aumentando (Baron's Handbook. 2000). El aumento del número de cepas resistentes a antibióticos como la Ampicillina, Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Estreptomina, Cloranfenicol y Tetraciclina, dificulta el tratamiento contra la shigelosis y por lo tanto, constituye una problemática actual (Cabrera R y cols. 2006). Los agentes antidiarreicos tales como la Loperamina o el Difenoxilato o Atropina posiblemente empeoren la enfermedad por lo que deberán evitarse.

### **2.7 Inmunidad adquirida después de una infección por *Shigella spp.***

La respuesta inmune protectora necesaria para prevenir infecciones futuras con *Shigella spp* no está completamente dilucidada (Cohen D y cols. 1999). En una infección natural, se plantea que *Shigella* interactúa directamente de manera extracelular e intracelular con células M, macrófagos, células dendríticas, linfocitos y el epitelio colónico durante el curso de la infección (Turbyfill KR y cols. 2000).

Se ha demostrado que la protección tipo-específica contra la shigelosis puede ser adquirida en humanos después de la infección con la cepa salvaje o la bacteria atenuada. Existen evidencias directas de que los anticuerpos anti-LPS serotipo específico se encuentran asociados con la protección y que son las respuestas inmunes mucosales locales, especialmente la secreción de inmunoglobulinas, las que desempeñan el papel principal en la protección (Passwell JH y cols. 2001).

La secreción local de IgA, así como la respuesta en suero de IgG están dirigidas fundamentalmente contra el LPS bacteriano y un reducido número de proteínas de virulencia de origen plasmídico como IcsA y las proteínas Ipa, siendo la IpaB e IpaC las más consistentemente reconocidas. De hecho, no es inusual observar una respuesta de anticuerpos dirigida solamente contra el LPS y las invasinas (Barrzu S y cols. 1996).

Se ha demostrado tanto en curieles como en conejos por medio del Test de Sereny en el que se ha visto protección contra la queratoconjuntivitis, que además de estar involucrados en la patogénesis los antígenos de la superficie celular, díganse el LPS y las PME, estos pueden inducir inmunidad protectora en hospederos; presentando una inmunidad serotipo-

específica mediada por anticuerpos anti-LPS (Lindberg AA y cols. 1993; Sudipta RA y cols. 1994). Los polipéptidos de superficie codificados por el plásmido de virulencia de especies de *Shigella*, han generado buena respuesta inmune en humanos (Hale TL y cols. 1985) y se ha podido demostrar que las porinas presentes en las bacterias gramnegativas manifiestan una elevada inmunogenicidad. Por lo tanto, el estudio de las PME es importante debido a su posible papel en conferir inmunidad contra la shigelosis (Sudipta RA y cols. 1994; Rossi MA. Y cols. 2000).

### **2.7.1 Inmunidad contra el LPS.**

El dominio O del LPS es un factor de virulencia esencial y un antígeno protector de *Shigella*. Convalecientes de shigelosis, presentan inmunidad anti-polisacárido O (especie y serotipo específica) incompleta y de limitada duración (Passwell JH y cols. 2001). La región antigénica del LPS es pequeña, lo cual facilita el reconocimiento de la bacteria por anticuerpos séricos y del complemento. Estos factores humorales podrían lisar a *Shigella* en la superficie intestinal. (Taylor DN y cols. 1993).

Está demostrado que anticuerpos séricos del tipo IgG anti polisacárido O, confieren inmunidad contra la shigelosis, pues se plantea la existencia de correlación entre el nivel de estos anticuerpos y la resistencia a la enfermedad en un estudio realizado con soldados israelíes. También se conoce una relación inversa entre la edad de incidencia de la shigelosis y la presencia de anticuerpos anti-LPS del tipo IgG. El pico de incidencia de la enfermedad se observa en niños y jóvenes adultos, siendo baja la incidencia en otras edades. Muchos recién nacidos y adultos presentan anticuerpos anti-LPS en suero que pudieran ser producto de reacciones cruzadas con otras especies (Passwell JH y cols. 2001)

### **2.7.2 Inmunidad contra PME.**

Son numerosos los hallazgos experimentales que demuestran las propiedades inmunogénicas de las PME aisladas de especies de *Shigella*. Estudios realizados en animales de experimentación nos han permitido conocer que hay respuesta específica de diferentes inmunoglobulinas a las PME. En las cuatro especies de *Shigella* se ha encontrado una proteína mayoritaria con un PM entre 34-38 kDa considerándose una porina, otra proteína de 57 kDa induce la liberación de IL-2 en una infección natural, lo cual refleja la participación de linfocitos T funcionalmente activos en pacientes con shigelosis. Otros

hallazgos hablan de que las PME de *Shigella flexneri* ejercen efecto inmunomodulatorio sobre la inmunidad mediada por células y la respuesta inmune humoral entre muchos que pudieran nombrarse. (Chamekh M. 2009)

## **2.8 Modelos animales empleados para el estudio de la shigelosis.**

Para estudiar la shigelosis se han desarrollado diversos modelos animales, algunos de los cuales han proporcionado información relevante de la enfermedad humana, a pesar de la limitación fundamental de que la infección natural con *Shigella spp* no ocurre en animales y hasta el momento no se ha descrito ningún modelo animal que reproduzca los signos y síntomas de la enfermedad, pues la mayoría de los animales adultos son resistentes a la colonización intestinal por *Shigella spp* con la excepción de primates evolucionados que son susceptibles a infecciones intestinales causadas por especies de *Shigella*. (Mallet CP y cols. 1993).

Se retaron monos Rhesus con especies virulentas de *Shigella*, manifestando diarrea y/o disentería que asemejaba el curso patológico de la shigelosis en niños (Formal SB y cols. 1996).

Este modelo permitió una exitosa colonización intestinal de la cepa administrada y una correcta presentación antigénica que permite evaluar la respuesta inmune frente a estos antígenos. La colitis causada por la invasión bacteriana a la mucosa intestinal de los monos, resultó indistinguible de la observada en humanos (Mathan MM y cols. 1991). El reto oral de monos Rhesus es el modelo más representativo de la shigelosis en humanos, este ha sido empleado para evaluar la eficacia protectora de candidatos vacunales de *Shigella*. (Formal SB y cols. 1984). Sin embargo, la dosis de reto de más de 10 billones de UFC necesaria para producir el cuadro clínico de la shigelosis en monos excede grandemente a la dosis de 100 UFC que constituye la Dosis Media Infecciosa (DMI<sub>50</sub>) para voluntarios (Formal SB y cols. 1996; Kotloff KL y cols. 1992), esta diferencia en sensibilidad a la infección con *Shigella* entre las dos especies, constituye una limitación importante para el modelo del mono como predictor de la protección de candidatos vacunales atenuados de *Shigella*. Por ejemplo, la inmunización oral en monos Rhesus ha demostrado que híbridos de *Shigella* – *Escherichia coli* invasivos son protectores en este modelo (Formal SB y cols. 1984), pero la subsiguiente vacunación oral de humanos con uno de estos híbridos, resultó ser inaceptable

desde el punto de vista de reactogenicidad (Dupont HL y cols. 1972). Además, consideraciones logísticas, financieras y éticas limitan los ensayos de candidatos vacunales en primates o voluntarios.

Dado estos elementos se encontraron ante la necesidad de modelos animales no primates para evaluar la protección y eficacia de vacunas de *Shigella*, lo que ha llevado al empleo de métodos de inoculación que deliberadamente crean condiciones que difieren de la manera natural en la que ocurre la enfermedad.

La queratoconjuntivitis lograda al inocular *Shigella* en la conjuntiva de curieles conocido como Test de Sereny (modelo animal por excelencia) ha sido usada para demostrar la adherencia y capacidad invasiva de las cepas, con el inconveniente de que no permite discriminar entre varios fenotipos de *Shigella*, no explica la invasión a las células epiteliales, ni la infección célula a célula, como tampoco la iniciación de la respuesta inflamatoria; pero provee un modelo sistema para probar la virulencia de cepas de *Shigella* y la eficacia e inmunogenicidad de vacunas de *Shigella*. (Sereny B. 1957; Hartman AB y cols. 1991).

En este sentido, el modelo animal de la queratoconjuntivitis ha sido empleado para:

- Evaluar la capacidad del microorganismo de invadir las células epiteliales y de infectar células contiguas
- Estudiar la eficacia protectora de candidatos vacunales atenuados de *Shigella*
- Evaluar regímenes de dosis que optimicen la respuesta inmune mucosal protectora
- Examinar el efecto de la ruta de administración (ej. vía mucosal versus parenteral), de la frecuencia de inmunización (primaria versus secundaria) y de la forma del antígeno dado (ej. vacunas vivas atenuadas versus vacunas conjugadas antígeno O-proteína)
- Inducir inmunidad protectora contra la enfermedad en animales vírgenes
- Examinar la relación de respuestas inmunes séricas y locales generadas por inmunización

También se han realizado estudios con el Test de Sereny en ratones, demostrando aunque la reacción fue más transitoria y no se pronunció tanto como en curieles, que los ratones pudieran ser usados para distinguir microscópicamente entre una cepa de *Shigella* virulenta y una no virulenta (Hartman AB y cols. 1994).

A pesar de su gran número de aplicaciones, el Test de Sereny no supe la necesidad de un modelo de ratón capaz de simular la extensa y potencialmente letal enteropatía observada en una infección con *Shigella* en primates y humanos. (Mallet CP y cols. 1993).

La mínima e inconsistente enteropatía producida por el reto oral de ratones con *Shigella*, ha limitado el empleo de este animal como un modelo de shigelosis intestinal. (Mallet CP y cols. 1993). El tratamiento con Estreptomicina hace a los ratones susceptibles de una colonización intestinal asintomática y transitoria con el bacilo disentérico, provocando una disminución progresiva en la duración de las deposiciones cuando a los ratones tratados con el antibiótico se les inocula múltiples veces por vía intragástrica una cepa de *Shigella flexneri* resistente a estreptomicina. Aunque estos estudios han ayudado a establecer el papel de la inmunidad mucosal en la protección contra la shigelosis, el requerimiento de cepas resistentes a estreptomicina y la ausencia de una ostensible enfermedad intestinal, han limitado el uso del reto intragástrico del ratón como un modelo de disentería bacilar. (Kotloff KL y cols. 1992; Mallet CP y cols. 1993).

Durante estudios de inoculación oral en ratones, fue observado que *Shigella* accidentalmente introducida en las vías respiratorias podía ser aislada en extractos purificados de pulmón. Evaluaciones histológicas y bacteriológicas de la patogénesis de la infección pulmonar con *Shigella*, han indicado que la bacteria virulenta invade el epitelio pulmonar y provoca infiltrados supurativos agudos y focos de necrosis que asemejan la shigelosis intestinal. De esta manera, el pulmón del ratón constituye un modelo simplificado para el estudio de la patogénesis e inmunobiología de la infección con *Shigella*. (Mallet CP y cols. 1993). Los bronquios constituyen una superficie mucosal con características semejantes al epitelio intestinal (Turbyfill KR y cols. 1998). El epitelio pulmonar en el árbol traqueo-bronquial es columnar simple ciliado con transición a epitelio simple cuboidal en los sacos alveolares (Brewer NR. 1983). Además, la pared bronquial contiene folículos linfoides o agregados de folículos que son similares a las Placas de "Peyer" del intestino. Al igual que el intestino, el pulmón es un órgano linfoide con células presentadoras de antígenos, linfocitos T cooperadores (LΦTh), linfocitos T citotóxicos (LΦTc) y linfocitos B (LΦB) (Stein-Streilein. J. 1988).

La caracterización de respuestas inmunes que protegen de la shigelosis y la distinción de las respuestas que contribuyen a la patogénesis han sido difíciles en modelos intestinales de infección (Van De Verg LL y cols. 1995). En el modelo del reto intranasal al ratón conocido como Modelo Ratón-Pulmón, muchas de las patologías parecen ser debidas a los efectos de una respuesta inmune inflamatoria. Esta respuesta es similar a la observada en la shigelosis intestinal, y tanto la respuesta celular como la humoral provocadas por una infección pulmonar, son similares a la respuesta humana de la disentería bacilar.

El uso de animales para pruebas biológicas y ensayos preclínicos hace necesario que se cumplan un conjunto de normas éticas, que regulan el comportamiento del hombre en relación con los animales, ya que estos tienen su código de derechos al igual que los humanos. La bioética animal surge como consecuencia del reconocimiento de los derechos de los animales, debido a la sensibilización de los grupos de defensa y de los científicos que realizan experimentos con animales, así como los productores, el objetivo es lograr el bienestar y la disminución o eliminación del sufrimiento animal como funciones primordiales. (Brewer NR. 1983; Canadian, Council on Animal Care, Guide to the Care and Use of Experimental Animal, Ottawa, Ont.: CCAC. Vol. 2. 1984)

## **2.9 Vacunas**

Hace algunos años se ha venido observando una tendencia de *Shigella spp* a adquirir resistencia a los antibióticos e incluso a los de última generación, por lo que es obvio la necesidad de una vacuna contra la shigelosis. Además, la rehidratación oral tiene escaso valor terapéutico en los pacientes con disentería, puesto que la deshidratación no es necesariamente una característica importante en la enfermedad grave. Por otra parte, el tratamiento de los casos graves es costoso, pues necesita una atención especializada que puede requerir la administración de antibióticos nuevos y caros. La urgencia en la implementación de esta medida profiláctica radica en la elevada tasa de morbilidad y mortalidad que provoca esta enterobacteria. (Schaetti C. 2009).

Los posibles candidatos a vacunas se encuentran a diferentes niveles de investigación, pero aún no están disponibles para los propósitos de la Salud Pública (World Health Organization. 2006; Phalipon A y cols. 2008).

Actualmente, existen varias tendencias en el camino a la obtención de una vacuna eficaz contra *Shigella* como son candidatos por subunidades, de cepas vivas atenuadas, proteosoma, vacuna de célula completa inactivada y muchas otras (Smith MJ y cols. 2006); pero sin éxito final que pudieran estar dadas porque no se conocen aún los mecanismos moleculares que intervienen en la fagocitosis de *Shigella* por las células epiteliales; sin embargo, se han identificado varias PME codificadas por el Plásmido de Virulencia que pueden desempeñar funciones fundamentales y ser antígenos en una formulación vacunal (Sansoneetti y col., 1986; Turbybill KR y cols. 2008).

Como se ha observado en las infecciones naturales y experimentales de *Shigella* los anticuerpos séricos IgG y los IgA secretores producidos en las secreciones locales, se dirigen ambos principalmente contra el LPS. La función del antígeno O de *Shigella* en la virulencia bacteriana no está definida por completo, pero un LPS liso puede ser importante para la supervivencia intraluminal de *Shigella* como para proteger de la actividad bactericida del suero a las bacterias que se encuentran en los tejidos (Sansoneetti y col., 1986) demostrándose, su importancia en la inmunidad conferida a pacientes infectados natural o experimentalmente (Turbyfill y col., 2000; Fries y col., 2001).

Dentro de los candidatos vacunales se encuentran las vacunas vivas atenuadas (Zuzuki T y cols. 2006), una de las más recientes es la confeccionada con el virG sf301 Delta y dsbA33G de *Shigella flexneri* 2<sup>a</sup> por Ingeniería Genética suministrada oralmente, la cual se plantea pudiera inducir niveles elevados de anticuerpos IgA e IgG contra sf301 LPS en los fluidos mucosales de animales inmunizados (Yang XF y cols., 2005).

El polisacárido O del LPS es la base de algunas vacunas que están en etapas avanzadas de ensayos clínicos con buenas expectativas. (Passwell y col., 2001). Turbyfill en el 2008 plantea haber obtenido buena eficacia e inmunogenicidad con una vacuna confeccionada a base de un complejo de invasinas altamente purificada de *Shigella flexneri* donde incluye la IpaB y la IpaC junto a una masa de alto peso molecular con un contenido importante de LPS (Turbybill KR y cols. 2008).

También forma parte de la estrategia de los investigadores, la obtención de proteoliposomas de *Shigella* altamente enriquecidos en PME con características de alta inmunogenicidad como las proteínas Ipa (Orr y col., 1993). En este sentido, también aparecen referidas otras variantes, como la formación de complejos hidrofóbicos entre el LPS de *Shigella* y las

PME de *Neisseria meningitidis* (Fries y col., 2001), mientras que otros autores plantean que la PME de 34kDa puede ser una de los mejores componentes en el desarrollo de una vacuna por subunidades contra la shigelosis (Mukhopadhaya A y cols., 2006).

En la última década (2005-2010) se han planteado nuevos proyectos de vacunas con resultados similares con buena protección e inmunogenicidad como son el uso de transportadores probióticos con las que se han obtenido títulos de anticuerpos específicos en suero, aunque hasta el momento no parece ser suficiente la protección media (Buddenborg C y cols., 2008). Otro intento son las vacunas confeccionadas a base de un toxoide transformado genéticamente, que contiene la subunidad StxA2 enzimáticamente inactivada y la subunidad nativa StxB1 con la que se obtuvo protección al reto con 10DL (Smith MJ y cols. 2006). No obstante Kaminski, publica una nueva vacuna por subunidades inactivada para prevenir la shigelosis y plantea que a pesar del desarrollo de múltiples tecnologías acerca de las vacunas a partir de bacterias vivas, atenuadas y muertas que resaltan los estudios e investigaciones actuales, los mecanismos inmunes y de protección no están completamente explorados, no conociendo a ciencia cierta como ocurre todo este proceso (Kaminski RW y cols., 2009).

Podemos decir que a pesar de toda esta preocupación por desarrollar una vacuna que cubra las expectativas de Salud, las lagunas acerca de este género no permiten llegar a un final deseado, no obstante desde nuestro punto de vista la más acertada es la construcción de un complejo compuesto por las proteínas Ipa y LPS que ha logrado obtener resultados esperanzadores hasta reto en modelos animales.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Caracterización por expresión de proteínas de membrana externa (PME) de los aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei* para la selección de posibles cepas vacunales.**

##### **3.1.1 Identificación bioquímica y metabólica de los aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei* de pacientes con diagnóstico presuntivo de Shigelosis.**

###### **3.1.1.1 Aislamientos bacterianos.**

Se utilizaron en este trabajo experimental un total de 32 aislamientos de *Shigella spp*, 30 correspondientes a aislamientos autóctonos de pacientes con diagnóstico de shigelosis en la Provincia de Ciudad Habana y 2 cepas ATCC de las especies *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*. Se partió de tubos con medio de conservación para enterobacterias (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1984), mantenidos a temperatura de laboratorio y en condiciones de oscuridad.

###### **3.1.1.2 Identificación Fenotípica.**

###### **Medio de selección en placa.**

Los aislamientos de *Shigella spp* fueron sembradas en medio Agar Mackonkey, a partir de precultivos de 18-24 horas, incubándose por igual tiempo a 37°C. Las colonias aisladas tenían color blanquecino, eran pequeñas y ligeramente abultadas, características de *Shigella spp* en este medio.

**Motilidad:** Se le determinó mediante el medio de prueba de motilidad descrito para enterobacterias (Lennette EH. 1982).

###### **Pruebas bioquímicas.**

**Prueba de la Oxidasa:** Se realizó con cultivos procedentes de cuñas de TSA. Una gota de la solución al 1 % del reactivo N, N, N, N Tetrametil Parafenilén Diamina fue vertido en un papel de filtro dispuesto sobre una placa de Petri, esparciendo posteriormente un pequeño inóculo bacteriano con un asa de platino. La reacción positiva a la prueba de la oxidasa corresponde a la aparición de un color rojo púrpura oscuro sobre el papel de filtro en un tiempo de 10 segundos, debido a la reducción del reactivo empleado, por la citocromo

Oxidasa (CDC/NCID. OPS. Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de *V. cholerae* 1994. Programa Especial de Publicaciones. Washington, D. C. Estados Unidos)

**KIA:** Se seleccionaron al menos 10 colonias características de *Shigella spp* crecidas en medio Agar MacConkey, estas colonias fueron sembradas por el método de punción y estrías en medio KIA, incubándose 24 horas a 37°C. Este medio se empleó para determinar la fermentación de glucosa y de lactosa, además de la producción de gas a partir de la glucosa así como de ácido sulfhídrico que precipita a sulfuro de hierro. Contiene como indicador de pH el rojo fenol, que a pH ácido toma color amarillo y a pH alcalinos adquiere color rojo. La fermentación de la glucosa y la lactosa se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas, por lo que se analizó el fondo del tubo, dándose como resultado positivo la aparición de color amarillo y como negativo la presencia de color rojo. Los tubos se mantienen además en condiciones de aerobiosis. (Giono S y cols. 1991).

**LIA:** Se tomaron colonias procedentes de la misma cuña que se utilizó para la prueba del KIA, se sembró en medio LIA por el método de punción y de estrías. A través de esta prueba se comprobó la descarboxilación y desaminación de la lisina, las cuales se llevan a cabo en condiciones anaeróbicas y aeróbicas respectivamente. El indicador de pH es el púrpura de bromocresol, el cual a pH ácido se torna amarillo, mientras que a pH básico toma color púrpura. Se considera una descarboxilación negativa de la lisina cuando el fondo del tubo se torne amarillo (ácido) y la cuña color púrpura (alcalina). (Giono S y cols. 1991).

**Catalasa:** Se realizó en una lámina portaobjetos, resuspendiendo la asada de inóculo bacteriano con una gota de peróxido de hidrógeno. La producción de pequeñas burbujas de gas se reporta como un resultado positivo, indicando la presencia de la enzima catalasa (CDC/NCID. OPS. Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de *V. cholerae* 1994. Programa Especial de Publicaciones. Washington, D. C. Estados Unidos)

**Urea:** El cultivo puro se inocula por estría superficial sobre el medio y se incuba a 37°C. Generalmente los organismos con fuerte actividad ureásica permiten lecturas muy tempranas entre las 3 y 5 horas. La reacción se hace evidente por el cambio de color del medio que pasa de anaranjado a rosa fucsia, debido a la fuerte alcalinización que provoca la liberación del amoníaco. (Swing EPW. 1972).

**Citrato:** El cultivo celular se inoculó en Agar Citrato de Simmons por picadura profunda en tubos inclinados, utilizando un inóculo pequeño. La presencia de un indicador facilita la lectura ya que la degradación del Citrato produce una alcalinización que se manifiesta por el viraje del indicador a azul intenso. (Swing EPW. 1972).

**Indol:** A un cultivo de agua peptonada de 40 - 48 horas de incubado a 37°C se le agregó primeramente 0.5 mL del reactivo de Kovacs y se agitó el tubo suavemente. Se considera una reacción positiva la formación de color rojo intenso. En los casos en que el resultado fue negativo, el cultivo debe incubarse 24 horas más. (Lennette EH. 1982).

**Ornitina:** El medio se preparó en caldo con descarboxilasa de Moeller, en la que se adicionó L-Ornitina al 1%. La siembra se hace por estría y picadura superficial. Se cubrió el cultivo con una capa de 4 - 5 mm de aceite mineral estéril o parafina. Se incubó a 37°C y se examinó diariamente durante 4 días. La reacción positiva está indicada por reacción alcalina (púrpura). (Lennette EH. 1982).

**Dulcitol:** Se partió de un medio basal de fermentación y se adicionó el dulcitol a una concentración final del 10%. Se tomó como criterio positivo que el medio se torne amarillo, si el microorganismo no degrada el azúcar del medio adquiere una tonalidad verdosa. (Lennette EH. 1982).

**Fenil-alanina:** El medio se preparó en caldo con descarboxilasa de Moeller, con fenil-alanina al 1%. Se sembró la superficie de la cuña con abundante inóculo y se incubó durante 12-16 horas a 37°C. Se añadió 0,2 mL de una solución al 10 % de cloruro férrico de forma que inunde todo el crecimiento. La prueba es considerada positiva por la aparición de un color característico verde-azulado en la superficie, al cabo de un minuto aproximadamente. (Swing EPW. 1972).

### **3.1.2 Caracterización a nivel de especie.**

La caracterización hasta especie se realizó por aglutinación en láminas en placas de macroaglutinación con antisueros, donados por el Centro de Producción de Biológicos Carlos J. Finlay, contra los grupos B y D, que corresponden con las especies, *S. flexneri*, y *S. sonnei* respectivamente. Las suspensiones microbianas se preparan a partir de Agar Nutriente. Se añadió 1 mL de solución salina fenolada (NaCl 0.85% + fenol 0.5%), se

homogenizó y se vertió en tubos limpios de 13x100 mm para enfrentarse posteriormente a los antiseros señalados. En este ensayo se utilizaron los siguientes controles positivos: ATCC 12022 de *Shigella flexneri*, y ATCC 25931 de *Shigella sonnei*. (Lennette EH. 1982).

### **3.1.3 Selección de la cepa candidata vacunal.**

#### **3.1.3.1 Estudio de los perfiles de PME en SDS-PAGE para cada una de los aislamientos autóctonos.**

##### **Métodos empleados para determinar el crecimiento.**

##### **Análisis del crecimiento bacteriano**

Partimos de conservaciones de los 10 aislamientos de *Shigella sonnei* incluyendo la cepa ATCC 25391 en medio sólido para enterobacterias, se sembraron en medio MacConkey y se incubó a 37°C, durante toda la noche. Al día siguiente, se le realizó control de pureza por tinción de Gram y se inoculó con ese precultivo un erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio TSB, a 0.03 unidades de absorbancia de concentración. Este se incubó a 37°C, en zaranda (Infors GV, Suiza) con una agitación de 160 rpm y se realizó la lectura a una longitud de onda de 600 nm en espectrofotómetro (Pharmacia Ultrospec III, Inglaterra) cada 30 minutos hasta las dos horas, a partir de este momento se determinó la absorbancia cada una hora hasta cumplimentar las 6 horas de cultivo. (Lennette EH. 1982).

##### **Determinación de Consumo de Sustrato.**

La determinación del consumo de sustrato se realizó determinando la concentración de azúcares reductores durante el cultivo. El método utilizado fue el del ácido 3,5 Dinitrosalicílico. Las muestras de cultivo se tomaron a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6 horas). Estas muestras se centrifugaron a 10000g durante 15 min en microcentrífuga (Sartorius, Alemania). Posteriormente se tomó 1 mL del sobrenadante en un tubo de ensayo adicionándole al mismo 2 mL de la solución reactivo de ácido 3,5 Dinitrosalicílico mezclándolo cuidadosamente. La mezcla se puso en baño en ebullición durante 5 minutos; transcurrido este tiempo se enfrió rápidamente y se enrasó con agua destilada a volumen

final de 10 mL y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. La curva estándar se preparó con una solución de glucosa 2g/L. (Westphal O y cols. 1965).

### **Determinación de MSG.**

El parámetro MSG se determinó indirectamente a través de mediciones por turbidimetría. Para esto se hizo necesario correlacionar ambos parámetros (absorbancia y masa seca). Se partió de un precultivo bacteriano desarrollado de la misma manera que en el acápite anterior y se inoculó un erlenmeyer de 2L con 500 mL de medio TSB, partiendo nuevamente de un inóculo bacteriano con 0.03 unidades de absorbancia, medida a 600 nm. El cultivo se incubó bajo los mismos parámetros que en el acápite anterior hasta la cuarta hora. Posteriormente se centrifugó a 10000g, durante 45 minutos y el precipitado celular obtenido se resuspendió en 100 mL de medio de cultivo TSB estéril, a partir de esta suspensión concentrada se prepararon diluciones dobles seriadas en SSE hasta 1/64; se agitó vigorosamente en agitador (Janke&Kunkel. IKA-Suiza. VF2) y se midió la absorbancia de cada una de ellas a 600 nm (Lennette EH 1982). A continuación se centrifugaron cada una de las diluciones a 10000g durante 45 minutos y los precipitados celulares se pesaron en la balanza de peso seco (MA-30. Sartorius, Alemania).

### **Determinación del momento idóneo para detener el cultivo microbiano.**

Se trabajó además con la cepa ATCC 25931 de *S. sonnei*. El cultivo se realizó como se describe anteriormente, partiendo de un inóculo a 0,03 unidades de absorbancia. Las mediciones por turbidimetría fueron realizadas cada 30 minutos, determinándose en cada tiempo los parámetros de velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación. El cultivo se mantuvo hasta la sexta hora. El criterio de determinación del momento idóneo para detener el cultivo fue el inicio de la fase de desaceleración dado por la disminución de la velocidad específica de crecimiento.

### **Determinación de UFC.**

El parámetro UFC se determinó paralelamente con las mediciones por turbidimetría. Se partió del mismo cultivo que en los acápites anteriores. Previo a la centrifugación se

tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada cepa y se realizó el conteo de viables por el micrométodo de diluciones (Lennette EH. 1982).

A estos 100  $\mu\text{L}$  se le adicionaron 900  $\mu\text{L}$  de STFE a pH 7,4. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas de 1/10 ( $10^{-1}$  hasta un orden de  $10^{-9}$ ).

Las suspensiones fueron sembradas en placas de TSA por duplicado y se determinaron las UFC para cada dilución obtenida a partir del cultivo de los aislamientos de *Shigella sonnei*.

### **Determinación de la presencia del Plásmido de Virulencia.**

A los cultivos microbianos de cada cepa se les tomó, a las 4 horas de iniciado el mismo, 100  $\mu\text{L}$  y se le adicionaron 900  $\mu\text{L}$  de STFE. Se realizaron diluciones seriadas de 1/10, similar al método de conteo de colonias y se sembraron por duplicado 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones correspondientes a los órdenes  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  en placas de TSA con 0.01% del colorante RC (Parsot y cols. 1995; Parsot y cols. 1997). Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas. Las colonias que portaron el plásmido de virulencia adquirieron coloración roja y las que no, mantuvieron su color blanquecino. El por ciento de colonias con presencia de plásmido se determinó como el cociente entre las colonias positivas y el total de colonias presentes en la placa para cada una de las diluciones evaluadas por cepa.

### **Obtención de extractos de proteínas de membrana externa (STA).**

Partimos de las mismas condiciones de cultivo hasta inocular un erlenmeyer de 2L con 1L de medio de cultivo TSB, con un inóculo nuevamente de 0.03 unidades de absorbancia. Se detuvo a las 4 horas (final de la fase exponencial). El cultivo se colocó en frascos de centrifuga estériles de 500 mL, pesados con anterioridad. Posteriormente se centrifugó a 10000g durante 45 minutos en centrifuga Beckman J2-21, Bélgica. El sobrenadante se decantó y se pesó el precipitado celular. Una vez obtenido este valor se le adicionaron 5 mL de una solución tampón de extracción (LiCl 0.2 M; Na 0.1 M, PH = 5.8) por cada 3g de masa bacteriana, el precipitado se resuspendió cuidadosamente y se le añadieron perlas de vidrio estériles. Estos se colocaron en baño de María a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 2 h con agitación constante en agitador térmico (HAAKE SWB 20, Alemania). Seguidamente centrifugamos a 17000g durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente recolectamos el sobrenadante y lo centrifugamos a 100000g en ultracentífuga (Kontron Instruments Centrikon T-1055, Suiza)

durante 2 horas a 4°C. Por último se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 µl de una solución de Azida Sódica al 0,02 %. (Lammler NK. 1970).

#### **Determinación de la concentración proteica.**

Se realizó por el método descrito por Lowry (Lowry OH y cols. 1951). La curva patrón se confeccionó con BSA a partir de una concentración de 0,2 mg/mL.

#### **Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.**

Las muestras de extractos proteicos se prepararon en condiciones desnaturalizantes con 2β-Mercaptoetanol y fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Para la separación de las proteínas en los diferentes pesos moleculares se utilizó un gel separador de acrilamida al 10% y un gel concentrador al 5% de acrilamida, realizándose la electroforesis en tampón de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192mM, SDS 0.1%) en una cámara electroforética (Pharmacia LKB, USA) acoplada a una fuente (Multidrive Pharmacia LKB, Suecia) con corriente constante de 30 mA (Lammler NK. 1970). Se aplicaron en cada pocillo 20 µg de proteína. La tinción se realizó con solución de tinción que contiene Azul brillante Comassie G250 5g, Ácido Acético 100 mL, agua destilada 450 mL y Etanol 450 mL, por dos horas. La decoloración se realizó a través de la solución decolorante (ácido acético 50 mL, agua destilada 300 mL y etanol 450 mL) durante 1 hora, posteriormente el gel se colocó en agua destilada a 100°C durante 5 minutos.

Se utilizaron dos patrones proteicos de peso molecular, el patrón I, (Electran) rinde las siguientes bandas: 78 000, 66 250, 42 700,30 000, 17 200 y a 12 300 Da; mientras que el patrón II posee bandas que migran a 205 000, 116 000, 97 400, 66 000, 45 000, 29 000, Da. (Pharmacia LKB: Gel filtration. Principle and methods. 1993).

#### **Análisis de la expresión de Proteínas de Membrana Externa.**

Los geles obtenidos por SDS-PAGE fueron cuantificadas usando el ImagMaster VDS system (Pharmacia), siguiendo las instrucciones del productor. (Application note. ECF Western. ImageMaster. VDS-CL. An 18-1139-14 AA, 1999.p1-p2). Para analizar las proteínas de bajo peso molecular se utilizó la curva de calibración log de Peso Molecular contra movilidad correspondiente al patrón proteico I y para el análisis de las proteínas de

alto peso molecular se utilizó el patrón II. A cada una de las bandas obtenidas en la migración de los extractos proteicos en SDS-PAGE se les calculó a través del programa asociado a este sistema, el valor de intensidad relativa (IR), así como el por ciento que representa cada banda con respecto al total de proteínas del extracto. (Lammlí NK. 1970)

Los resultados fueron analizados a través del paquete estadístico STAT GRAPHICS PLUS (Versión 5.0), a través de las pruebas de comparaciones múltiples de Duncan a 95 % de nivel de confianza y en algunos casos se utilizó el estadígrafo t de Student.

#### **3.1.4 Preparación del lote de siembra de referencia de la cepa seleccionada candidata a vacuna.**

Se partió de cultivos bacterianos conservados en medio agar semisólido para enterobacterias (Lennette EH. 1982) de los lotes de trabajo del laboratorio de Fisiología Bacteriana del Instituto Finlay. Se tomó con un asa una porción del crecimiento y se resuspendió en 1 mL de medio TSB, se colocó 1 hora en la incubadora a 37°C, luego se sembraron 2 placas de medio TSA+RC 0.01% por el método de siembra por agotamiento, se incubó a 37°C durante 24 horas.

Pasado este tiempo el cultivo se observó al microscopio estereoscópico para comprobar las características culturales típicas de las colonias de *Shigella spp.* al igual que el cambio de coloración a color púrpura por la presencia del plásmido de virulencia. En caso de observarse colonias blancas se desechó el cultivo. Se seleccionaron las colonias que tomaron el color púrpura y se sembraron en 4 placas de medio TSA incubándose 24 horas a 37°C.

Se recogió con un hisopo estéril toda la biomasa de las placas incubadas y se suspendió en tubos que contenían 5 mL de TSB, a razón de una placa por tubo. Luego se realizó tinción de Gram a la suspensión bacteriana para observar al microscopio óptico las características morfológicas tintoriales de *Shigella spp.* A continuación se inocularon 2 erlenmeyers de 500 mL con 100 mL de TSB cada uno y se incubaron en zaranda orbital termostata a 160 rpm y 37°C durante 4 horas.

Fue seleccionado el mejor cultivo (según los valores de absorbancia y las características morfológicas tintoriales) y se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min. El pellet fue resuspendido en 50 mL de leche descremada al 20%. Se tomaron 100 µL de la suspensión

para determinar las UFC/mL empleando como medios de cultivo: TSA y TSB incubándose durante 24 horas a 37°C.

Para el proceso de liofilización se distribuyeron a razón de 400 µL por ampolleta, hasta obtener un total de 100 o más, fueron enumeradas consecutivamente las mismas a medida que se iban llenando, preparamos y colocamos las ampollas en la bandeja, siguiendo las instrucciones del Cepario del Instituto Finlay. Finalmente procedimos a la liofilización, etiquetado y almacenamiento de las muestras.

La preparación del lote se realizó por personal calificado, no se manipularon otros materiales biológicos en paralelo, por las mismas personas ni en las mismas instalaciones, con el objetivo de garantizar que no ocurriera contaminación cruzada (Noriega FR y cols. 1999; Haimovich B y cols. 2006).

### **Caracterización del Lote de Siembra de Referencia**

#### **Ensayos de identidad:**

Se realizó la observación de características culturales en TSA + RC 0.01%, siembra en KIA y LIA, así como las pruebas de citocromo oxidasa. La potencialidad de crecimiento en medio optimizado para *Shigella* fue determinada.

#### **Ensayo de pureza:**

Se realizó por observación microscópica del cultivo obtenido en TSA + RC 0.01%, teñido por el método de Gram según Lennette EH. 1982.

**Viabilidad:** Se realizó el recuento de UFC/mL por diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$  y siembra en superficie en TSA+ RC 0.01%. Se consideró satisfactoria una concentración celular igual o superior a  $10^5$  UFC/mL.

### **3.2 Obtención de un medio de cultivo óptimo semisintético para el crecimiento de la cepa seleccionada.**

#### **3.2.1 Selección de un medio basal apropiado donde se pueda evaluar la función objetivo.**

El medio basal seleccionado fue el MFM recomendado para la obtención de PME y es utilizado con este objetivo en la vacuna VAMENGOC BC. (Paz MF y cols. 2003).

### **3.2.2 Método de Optimización**

El método de optimización utilizado fue el MRM, que es un método de optimización No Lineal adecuado que nos permite obtener el óptimo de la función objetivo propuesta, fijando como función objetivo un máximo crecimiento del microorganismo sin perder su plásmido de virulencia. Se utilizó este método de búsqueda directa, ya que tiene en cuenta las interacciones entre los distintos componentes a optimizar, nos permite discriminar los que no son necesarios para la función objetivo escogida. Además facilita hacer tres variables de cada variante. Este método incluye comparaciones de medias utilizando la t de Student. (Votruba J y cols. 1975).

### **3.2.3 Obtener y purificar el complejo PME-LPS a partir de la biomasa obtenida en los cultivos en fermentación con el medio optimizado y determinar la concentración de proteínas y LPS.**

#### **Cepa bacteriana.**

Se utilizó la cepa seleccionada de *Shigella sonnei* A-04

#### **Condiciones de cultivo.**

- ✓ Medio de cultivo semisintético optimizado para la cepa A-04.
- ✓ Fermentación discontinua en fermentador CHEMAP, volumen de trabajo 5 L
- ✓ Temperatura 37 °C, controlada automáticamente.
- ✓ pH 7.4, controlado automáticamente.
- ✓ Presión de O<sub>2</sub> disuelto libre.
- ✓ Aireación superficial.
- ✓ Agitación mecánica, con impelentes tipo paleta.

### **Obtención y purificación del complejo PME-LPS.**

La biomasa celular obtenida como resultado de la centrifugación del cultivo a 17 700 x g durante 30 min. a 4°C, se resuspendió en solución tampón 30 mM Tris - 2 mM EDTA, a 140 mg/mL. A la suspensión celular homogenizada se le añadió SDS al 0,5% a razón de 0,25 ml de detergente/g de biomasa. La suspensión se incubó en baño de agua con hielo durante 1h en agitación lenta y posteriormente fue centrifugada a 17 700 x g durante 30 min. a 4°C, se desechó el sedimento y el sobrenadante se sometió a un tratamiento con DNAsa y RNAsa (0.1mg/20mL) durante 1h a 37°C. Luego se efectuó una centrifugación a 33 300 x g durante 15 min. a 4°C, el sedimento se desechó y el sobrenadante se ultracentrifugó a 65 000 x g durante 8h a 4°C. El sedimento obtenido finalmente se resuspendió en solución tampón 30 mM Tris-2 mM EDTA pH 8.5, se filtró a través de filtros Sartorius Minisart-plus de 0.45 y 0.2 µm.

### **Determinación de la concentración de proteínas.**

El contenido de proteínas se evaluó siguiendo el método de Lowry descrito en 1951.

### **Determinación de la concentración de LPS.**

El contenido de LPS se evaluó por el método modificado del ácido tiobarbitúrico (TBA), descrito por Osborn en 1963.

### **3.2.4 Análisis del perfil cromatográfico mediante cromatografía de filtración en Sephacryl S-1000.**

Con el objetivo de definir el patrón cromatográfico de cada una de las muestras en estudio, se aplicó de 0.2 a 1 mL de las muestras (0.5 – 2 mg / mL) en un lecho sedimentado de 56.8 mL de Sephacryl S – 1000, equilibrado con 30 mM Tris HCL – 2 mM EDTA – DOC 0,5% pH 8.5, con velocidades de flujo de 0.4 mL / min y se les determinó la absorbancia a 280 nm a las fracciones y la presencia de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida. Se determinó el volumen total (Vt) en el que eluye el máximo de absorbancia de la acetona 1 % y el volumen de elución (Ve) en el que eluye el máximo de absorbancia de las muestras aplicadas disueltas en una u otra solución. Se determinó la

relación entre estos volúmenes:  $V_e/V_t$ , como criterio de integridad molecular. La calidad del empaquetamiento de la columna se determinó a través de: número de platos teóricos (N), altura de platos teóricos (HETP) y asimetría (Af) del pico. La evaluación se realizó a partir del tamizaje molecular de la acetona 1 % y de lo recomendado para la determinación de estos parámetros (Farmacia LKB. Gel Filtration Principle and Methods. 1993).

Análisis estadístico:

A los valores obtenidos de la cuantificación de proteínas y LPS en los cinco procesos estudiados se les calculó el coeficiente de variación para determinar la homogeneidad de los mismos.

### **3.3 Desarrollo de los modelos animales para la evaluación de la inmunogenicidad y protección.**

#### **3.3.1 Selección de una cepa virulenta de *Shigella sonnei* y una de *Shigella flexneri* como cepas de reto homóloga y heteróloga respectivamente.**

De los 30 aislamientos autóctonos que formaron nuestro universo inicial de trabajo, seleccionamos una cepa homóloga de reto *Shigella sonnei* W40 y una cepa de reto heteróloga *Shigella flexneri* X19, ya que cumplieron con todos los requisitos establecidos de características microbiológicas y bioquímicas correspondientes a este género, manteniendo bajo todas las condiciones ensayadas el plásmido de virulencia y las mejores características de crecimiento.

#### **3.3.2 Montaje de dos biomodelos: “Ratón – Pulmón y Test de Sereny”.**

##### **3.3.2.1 Biomodelo Ratón-Pulmón.**

Para la evaluación de la cepa seleccionada de *Shigella sonnei* A-04, se utilizó el modelo de inoculación intranasal en ratones Balb/c de 20-25g de peso. Los mismos fueron suministrados por el CENPALAB, con su correspondiente certificado de salud, mantenidos antes y durante los ensayos según las instrucciones que aparecen en la “Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación” (Canadian, Council on Animal Care. Guide to the Care and Use of Experimental Animal, Ottawa, Ont.: CCAC. Vol. 2. 1984). Para su manutención se utilizaron cajas de polipropileno tipo T2. Los protocolos de trabajo fueron

analizados y aprobados por la Comisión de Ética del Instituto Finlay para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Para la inoculación intranasal de los ratones, los mismos fueron anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital sódico e inoculados con 30µL de la cepa bacteriana a una concentración de  $5 \times 10^7$ - $10^{11}$  UFC. Durante los 10 días de duración del experimento se fue determinando la supervivencia diaria y al final se extrajeron los pulmones para hacer cultivo bacteriano y estudios histopatológicos.

### **Estudio microbiológico del pulmón.**

En condiciones de esterilidad, los pulmones fueron extraídos, lavados tres veces con SSE, y macerados en morteros de porcelana estériles para su posterior siembra en placas de Petri con medio TSA + RC al 0,01%, se incubaron a 37<sup>0</sup>C de 18 - 24 horas. (Methner U y cols. 2004).

### **Estudio anatomopatológico.**

Todos los animales fueron sometidos a un análisis anatomopatológico macroscópico para constatar la existencia de alguna alteración en órganos o tejidos, realizando las correspondientes descripciones en caso de observarse alguna patología en los mismos.

Para los análisis histopatológicos fueron tomadas muestras de los pulmones de cada uno de los ratones del ensayo, las mismas fueron procesadas por la técnica de inclusión y cortes de parafina siendo coloreadas con Hematoxilina – Eosina realizando una descripción detallada de las observaciones. (Vaca L. 1985).

### **Determinación de DL<sub>50</sub> en ratones Balb/c con cepas de reto seleccionadas utilizando la vía de inoculación intranasal en el modelo Ratón – Pulmón.**

Para la determinación de la DL<sub>50</sub> se inocularon los ratones por vía intranasal con 30µL de diferentes concentraciones de las cepas de reto seleccionadas. Los animales previamente fueron anestesiados por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico. Durante el experimento se fue determinando la supervivencia diaria. El método utilizado para el cálculo fue el de Reed y Muench (Reed LJ y cols. 1938).

### 3.3.2.2 Biomodelo Test de Sereny.

Fueron utilizados curieles machos, obtenidos del CENPALAB de 18 semanas de edad y entre 250-300g de peso con su correspondiente certificado de salud, se mantuvieron antes y durante los ensayos, según instrucciones que aparecen en la "Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación" (Canadian, Council on Animal Care,. Guide to the Care and Use of Experimental Animal, Ottawa, Ont.: CCAC. Vol. 2. 1984). Los protocolos de trabajo fueron analizados y aprobados por la Comisión de Ética del Instituto Finlay para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se utilizaró la misma cepas de *Shigella sonnei* A-04 que para el estudio del modelo ratón – pulmón.

Los curieles se inocularon con 50µL de una suspensión bacteriana con concentración de  $7 \times 10^7 - 10^{10}$  UFC en el saco conjuntival de uno de los dos ojos, dejando el otro ojo como control aplicando la misma técnica; pero con una SSE al 0,85% como inóculo.

El grado de queratoconjuntivitis fue interpretado sobre la base del tiempo de desarrollo de síntomas, severidad de los mismos y su regresión, se interpretó según la intensidad de la inflamación observada desde grado 0 hasta grado 3; monitoreada durante siete días y regida por los siguientes niveles (Word PK y cols. 1986; Barry EM y cols. 2006).

**Grado 0: No hay síntomas de reacción ni de irritación leve. (ojo normal).**

**Grado 1: Leve conjuntivitis o desarrollo tardío y/o rápida desaparición, lagrimeo o edema en el párpado.**

**Grado 2: Síntomas del nivel 1 más hiperemia conjuntival. Queratoconjuntivitis no purulenta con ligera sudoración**

**Grado 3: Queratoconjuntivitis purulenta completa.**

**Determinación de la Protección.** Se realizó según Hartman AB y cols. 1994 y 1998.

**Total:** Se divide el número de ojos que fueron evaluados con 0 entre el total de ojos retados.

**Parcial:** Se divide el número de ojos que fueron evaluados con 1 entre el total de ojos retados.

**Combinada:** Se divide el número de ojos que fueron evaluados con 0 y 1 entre el total de ojos retados.

### **3.4 Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectogénica (contra *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*) del complejo PME-LPS en ratones.**

#### **3.4.1 Inmunización de ratones Balb/c por vía intramuscular con el complejo PME-LPS y reto por modelo Ratón-Pulmón.**

##### **Esquema de inmunización.**

Para la evaluación de la inmunogenicidad de las muestras obtenidas, se utilizó el modelo de inoculación intramuscular en ratones Balb/c de 20-25 g de peso. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos de diez ratones cada uno y otro de 5 ratones como control. Cada grupo se colocó en cajas independientes.

En dos de los grupos los ratones fueron inmunizados con 3 dosis, cada una de 50µg de inmunógeno, cuantificado en mg-proteína/mL por el método de Lowry. La inyección se realizó directamente en la pata trasera izquierda. Las 3 dosis fueron separadas 14 días una de la otra (días 0, 14, y 28), las extracciones de sangre se realizaron antes de cada inoculación así como a los 7 y 14 días después de la tercera dosis: tiempo 35 (T35) y tiempo 42 (T42) respectivamente.

Un grupo se inoculó con el mismo esquema pero con SSE y el cuarto grupo se dejó como control.

##### **Esquema de reto:**

Quince días después de la última dosis se procedió a la inoculación intranasal para el reto en ratones, se realizó siguiendo los mismos pasos que el acápite 3.3.2.1; pero las concentraciones utilizadas de cada cepa de reto utilizada, fueron diseñadas para corresponder con la DL<sub>50</sub> y 10DL<sub>50</sub>.

#### **3.4.2 Inmunización de curieles por vía intramuscular con el complejo PME-LPS y reto por Test de Sereny.**

##### **Esquema de Inmunización:**

Los curieles se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos de 3 curieles cada uno colocados en jaulas independientes. A cada curiel se le inocularon 3 dosis, cada una de 50 µg de inmunógeno, cuantificado en mg proteína/mL por el método de Lowry (Lowry OH y cols.

1951). La inoculación se realizó directamente en la pata trasera izquierda. Las 3 dosis fueron separadas 14 días una de otra (días 0, 14, y 28).

### **Esquema de reto.**

Quince días después de la última dosis se procedió a la inoculación ocular para el reto en curieles, se realizó siguiendo los mismos pasos que el acápite 3.3.2.2; pero la concentración utilizada de la cepa bacteriana fue la correspondiente a la DMI, que corresponde con aquella que induce Grado 2 de queratoconjuntivitis. En este caso la observación diaria de las lesiones oculares fueron las que nos dieron el grado de protección en este modelo.

### **3.4.3 Evaluación de Inmunogenicidad contra el complejo PME-LPS por ELISA e inmunoidentificación de las proteínas relevantes por Western Blot.**

#### **Determinación del título de anticuerpos IgG anti PME-LPS.**

La respuesta de anticuerpos IgG anti-PME-LPS como resultado de la unión de los sueros de los ratones inmunizados, se determinó por medio de un ELISA indirecto (Benitez, J y cols. 1999). Se emplearon placas de poliestireno de 96 pocillos, Polysorp (Nunc, Dinamarca), las cuales fueron recubiertas con detritos celulares de *Shigella sonnei* A-04 (12.5µg/mL). Se realizaron diluciones dobles seriadas del pool de sueros y se utilizó un conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Como sustrato se utilizó “o-phenylenediamine” (Sigma, St. Louis Mo.) en solución tampón Citrato de Sodio 0.1M, pH 5 y peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción se detuvo con la adición de ácido sulfúrico 2.5 N y la densidad óptica fue registrada a 492 nm en un lector de placas Titerkek Multiskan Plus, Inglaterra.

La determinación del título de anticuerpos IgG anti-PME-LPS fue definido como el inverso de la dilución del suero (calculado por interpolación), que da un valor de absorbancia de 0.4 unidades por encima del valor de fondo. Los resultados son expresados como el logaritmo del título medio aritmético.

#### **Inmunoidentificación de las proteínas relevantes por Western Blot.**

La unión de todos los sueros de los ratones inmunizados, con título de anticuerpos IgG anti-PME-LPS conocidos se enfrentó al inmunógeno que lo generó y a un lisado de células de

las especies *Shigella sonnei* (cepa 1), también lo enfrentamos a un lisado de *Shigella dysenteriae* (cepa ATCC, número 13313), a otro de *Shigella flexneri* (cepa 9) y a un lisado de células de *Vibrio cholerae* (cepa C7258). La transferencia de proteínas se desarrolló según la metodología descrita por Tsang VC y cols. 1983, a papel de nitrocelulosa (PNC) con porosidad de 0.45µm (Schleicher y Dassel, Alemania) empleando una cámara de electrotransferencia sumergida (Mini-TransBlot, Pharmacia) durante 2 horas a 350 mA.

Los sueros diluidos 1:1000 en PBS Twin fueron incubados toda la noche a 4°C y se empleó un conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa (Sigma-Chemical Co., St Louis, Mo). Para el revelado se utilizó como sustrato la diaminobenzidina en solución tampón fosfato salina (PBS), pH 7,4 y peróxido de hidrógeno al 30%.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **4.1 Caracterización microbiológica y por expresión de proteínas de membrana externa (PME) de los aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei* para la selección de posibles cepas vacunales.**

#### **4.1.1 Identificación bioquímica y metabólica de los aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei* en pacientes con diagnóstico presuntivo de shigelosis.**

En la Tabla 1 se presentan los 30 aislamientos autóctonos utilizados en nuestro estudio. Como resultado, se pudo observar que el total de los aislamientos de pacientes con diagnóstico de shigelosis presentaron las mismas características morfológicas y culturales a cepas pertenecientes al género *Shigella*.

En el medio Agar MacConkey, comprobamos que los aislamientos autóctonos crecieron formando colonias pequeñas (3-4mm de diámetro), de color blanquecino, debido a que generalmente son lactosa negativa. Luego se picaron colonias para tinción de Gram y se observaron al microscopio óptico las características morfológicas y la pureza del cultivo, correspondiendo en todos los casos con bacilos rectos pequeños de 1.5µm de longitud y 0.8µm de diámetro (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984).

Para identificar fenotípicamente los aislamientos autóctonos, nos guiamos por una batería de pruebas bioquímicas planteada por Brooks en el 2004 como aptas para la identificación de este género. Nuestros resultados se exponen en la Tabla 2.

En las pruebas de caracterización primaria KIA y LIA, los aislamientos mostraron la imagen típica del agente causal de la shigelosis. En la prueba de KIA se observó para todas los aislamientos, el fondo amarillo debido a la acidez que existe en el medio producto del metabolismo de la glucosa, mientras que la cuña se tornó roja por la alcalinización. En la prueba de LIA, el medio se mantuvo con la coloración inicial en la cuña (alcalina) y en el fondo se tornó color amarillo (ácida), lo que demuestra la incapacidad de estos aislamientos autóctonos de descarboxilar la lisina. Además, no hubo en ningún caso producción de gas ni sulfhídrico. (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984). Todos los aislamientos manifestaron un comportamiento positivo ante la prueba de la catalasa y negativo ante la prueba oxidasa.

Ninguna de los aislamientos autóctonos estudiados utilizó el citrato, ni el dulcitol, como única fuente de carbono y no mostraron capacidad para hidrolizar la urea. Los aislamientos

autóctonos analizados reaccionaron de manera negativa ante la prueba de la fenilalanina, lo que revela la no presencia de la enzima fenilalanina desaminasa. Otra prueba analizada en nuestro estudio fue la del Indol obteniendo resultados negativos. Los resultados expuestos hasta aquí concuerdan con el patrón bioquímico de respuesta de *Shigella spp* descritos en el Bergey´s Manual of Sistematic Bacteriology, 1984.

En el caso específico del ensayo para determinar la presencia de ornitina descarboxilasa, usada para identificar dentro del género los aislamientos correspondientes a la especie de *Shigella sonnei*, pudimos observar que teníamos 10 aislamientos con una reacción positiva y el resto con un comportamiento negativo (22 aislamientos); por lo tanto, dentro de nuestro universo de trabajo contábamos con 10 aislamientos de la especie *Shigella sonnei* de las cuales debíamos seleccionar la posible cepa vacunal.

#### **4.1.2 Caracterización hasta especie de los aislamientos autóctonos de *Shigella spp*.**

El estudio serológico para la caracterización hasta especie de los aislamientos autóctonos, aparece reportado en la Tabla 3. Se observó que de los 32 aislamientos estudiados, 22 reaccionaron fuertemente con el antisuero B, perteneciendo entonces a la especie *Shigella flexneri* (70%). El resto de los aislamientos caracterizados reaccionaron con el antisuero D, correspondiente a la especie *Shigella sonnei* (30%). Si bien el número de muestras no es elevado, nuestros resultados coinciden con los datos epidemiológicos actuales, que revelan que el patrón de cepas circulantes en estos momentos para la provincia de Ciudad Habana involucra como especie más representativa a *Shigella flexneri*, encontrándose un porcentaje intermedio de representatividad para *Shigella sonnei* y casos muy aislados de *Shigella boydii* y *Shigella dysenteriae* (Centro Provincial de Higiene y Epidemiología, Comunicación personal).

**Tabla 1: Relación de aislamientos autóctonos de *Shigella spp* y cepas ATCC utilizadas en el trabajo experimental**

<b>Aislamientos</b>	<b>Lugar de procedencia</b>	<b>Fecha de aislamiento</b>
<b>ATCC 25931</b>	Fundación Osvaldo Cruz Fiocruz	—
<b>ATCC 12022</b>	Fundación Osvaldo Cruz Fiocruz	—
<b>M02</b>	Hospital Marfán	Septiembre, 1999
<b>M03</b>	Hospital Marfán	Septiembre, 1999
<b>A04</b>	Hospital Aballí	Septiembre, 1999
<b>F05</b>	Hospital Fajardo	Septiembre, 1999
<b>F06</b>	Hospital Fajardo	Octubre, 1999
<b>X09</b>	Hospital Calixto García	Octubre, 1999
<b>C10</b>	Hospital Pediátrico del Cerro	Octubre, 1999
<b>C11</b>	Hospital Pediátrico del Cerro	Noviembre, 1999
<b>C12</b>	Hospital Pediátrico del Cerro	Noviembre, 1999
<b>M13</b>	Hospital Marfán	Noviembre, 1999
<b>M14</b>	Hospital Marfán	Noviembre, 1999
<b>M15</b>	Hospital Marfán	Noviembre, 1999
<b>M16</b>	Hospital Marfán	Diciembre, 1999
<b>X17</b>	Hospital Calixto García	Diciembre, 1999
<b>X18</b>	Hospital Calixto García	Diciembre, 1999
<b>X19</b>	Hospital Calixto García	Diciembre, 1999
<b>F20</b>	Hospital Fajardo	Diciembre, 1999
<b>X21</b>	Hospital Calixto García	Enero, 2000
<b>X22</b>	Hospital Calixto García	Enero, 2000
<b>L25</b>	Hospital Leonor Pérez	Enero, 2000
<b>M26</b>	Hospital Marfán	Enero, 2000
<b>M27</b>	Hospital Marfán	Enero, 2000
<b>M28</b>	Hospital Marfán	Enero, 2000
<b>M29</b>	Hospital Marfán	Enero, 2000
<b>M31</b>	Hospital Marfán	Febrero, 2000
<b>C33</b>	Hospital Pediátrico del Cerro	Febrero, 2000
<b>C35</b>	Hospital Pediátrico del Cerro	Febrero, 2000
<b>C37</b>	Hospital Pediátrico del Cerro	Febrero, 2000
<b>C38</b>	Hospital Pediátrico del Cerro	Febrero, 2000
<b>W40</b>	Hospital William Soler	Febrero, 2000

Tabla 2. Comportamiento bioquímico de los aislamientos autóctonos de *Shigella spp*

Aisl.	KIA Fondo / Cuña	LIA Fondo / Cuña	Oxidasa	Catalasa	Urea	Citrato	Indol	Ornitina	Dulcitol	Fenil- alanina
M02	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
M03	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
A04	K/A	K/A	-	+	-	-	-	+	-	-
F05	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
F06	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
X09	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
C10	K/A	K/A	-	+	-	-	-	+	-	-
C11	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
C12	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
M13	K/A	K/A	-	+	-	-	-	+	-	-
M14	K/A	K/A	-	+	-	-	-	+	-	-
M15	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
M16	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
X17	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
X18	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
X19	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
X20	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
X22	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
L25	K/A	K/A	-	+	-	-	-	+	-	-
M26	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
M27	K/A	K/A	-	+	-	-	-	+	-	-
M28	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
M29	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
M31	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
C33	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
C35	K/A	K/A	-	+	-	-	-	+	-	-
C37	K/A	K/A	-	+	-	-	-	-	-	-
C38	K/A	K/A	-	+	-	-	-	+	-	-
W40	K/A	K/A	-	+	-	-	-	+	-	-

**Tabla 3. Resultados de la técnica de aglutinación en lámina aplicada a de los aislamientos autóctonos del género *Shigella***

Aislamientos	<i>Shigella flexneri</i> . Serotipo B	<i>Shigella sonnei</i> . Serotipo D
M02	+	-
M03	+	-
A04	-	+
F05	+	-
F06	+	-
X09	+	-
C10	-	+
C11	+	-
C12	+	-
M13	-	+
M14	-	+
M15	+	-
M16	+	-
X17	+	-
X18	+	-
X19	+	-
F20	+	-
X21	+	-
X22	+	-
L25	-	+
M26	+	-
M27	-	+
M28	+	-
M29	+	-
M31	+	-
C33	+	-
C35	-	+
C37	+	-
C38	-	+
W40	-	+

Se observa también en trabajos reportados por el Laboratorio de Referencia Nacional para Enterobacterias del Instituto “Pedro Kouri”, datos epidemiológicos de un estudio realizado durante 5 años que reflejan un 62.58% del total de cepas circulantes en Cuba pertenecientes a *Shigella flexneri*, mientras que el 29% correspondía a *Shigella sonnei* (Llop A y cols. 2000). Estos datos concuerdan con un estudio realizado recientemente que recogió 240 cepas, donde la mayoría de ellas correspondían a *Shigella flexneri* (serogrupo B) con 124 cepas para un 59% y en segundo lugar *Shigella sonnei* (serogrupo D) con 76 cepas para un 32% (Ramirez M. 2008).

Sin embargo un reporte del año 2003 de Costa Rica mostró que el serogrupo con mayor frecuencia encontrado en el Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera fue el de *Shigella sonnei* con un 24%, en una proporción de microorganismos aislados en muestras diarreicas desde 1995 hasta 2003, seguido por *Shigella flexneri* (19%) y *Campylobacter spp* (12%). (Pérez C y cols. 2003).

#### **4.1.3 Selección de la cepa candidata vacunal**

##### **4.1.3.1 Obtención de PME de los aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei*.**

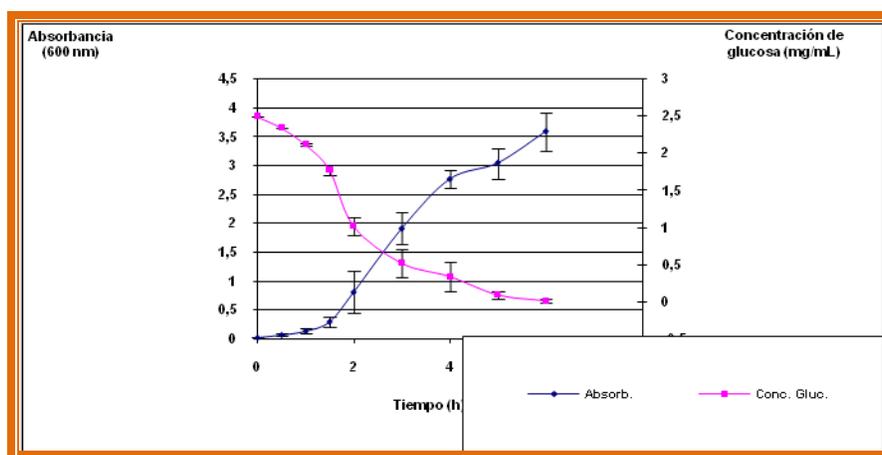
###### **Análisis del crecimiento bacteriano.**

El estudio comparativo del crecimiento microbiano es de gran importancia, tanto para conocer su comportamiento en nuestras condiciones de cultivo; así como para correlacionar la expresión de PME y su crecimiento, haciéndose necesario conocer el tiempo aproximado idóneo para detener el cultivo microbiano y realizar la extracción proteica por el método señalado.

En la Figura 5 aparecen las curvas de crecimiento de los 10 aislamientos de *Shigella sonnei*. Se evidenció un crecimiento propio de enterobacterias, caracterizado por una fase de latencia corta, debido a que el inóculo parte de un precultivo correspondiente al mismo medio utilizado para el ensayo. La fase exponencial se caracteriza por durar aproximadamente hasta las 3 horas y media o 4 de iniciado el cultivo, con velocidades específicas de crecimientos similares y relativamente altos (0.8-1.2). Al analizar estos valores se observó que a partir de las 4 horas de cultivo la Velocidad Específica comenzaba a disminuir, lo que revela que la población microbiana concluyó su fase exponencial y comenzó la fase de aceleración negativa, hubo un consumo de glucosa entre un 84.5 y 85%

de la concentración inicial que confirma un aprovechamiento máximo de la fuente de carbono. Por estas razones se seleccionó las 4 horas de cultivo como el momento idóneo para detener el crecimiento bacteriano. (Datos no mostrados)

Estos resultados concuerdan con otras investigaciones realizados donde se hace una evaluación de las condiciones de fermentación de varias cepas de *Shigella sonnei*, su extracción y consumo de sustrato (glucosa) con valores elevados de hasta 86%, a las cuatro horas de iniciado el cultivo, encontrándose en ese momento los valores más significativos. (Gil PS. 2003).



**Figura 5. Curva de crecimiento y consumo de glucosa promedio de los aislamientos autóctonos de *S. sonnei*. Cada punto representa el promedio de los aislamientos.**

La Figura 6 ofrece los niveles promedios de MSG alcanzados por los aislamientos autóctonos de *S. sonnei* a las 4 horas de cultivo (3.26-3.69 mg/mL), que constituye el momento crítico seleccionado para la extracción de proteínas. Se hizo un análisis estadístico constatándose que no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los aislamientos.

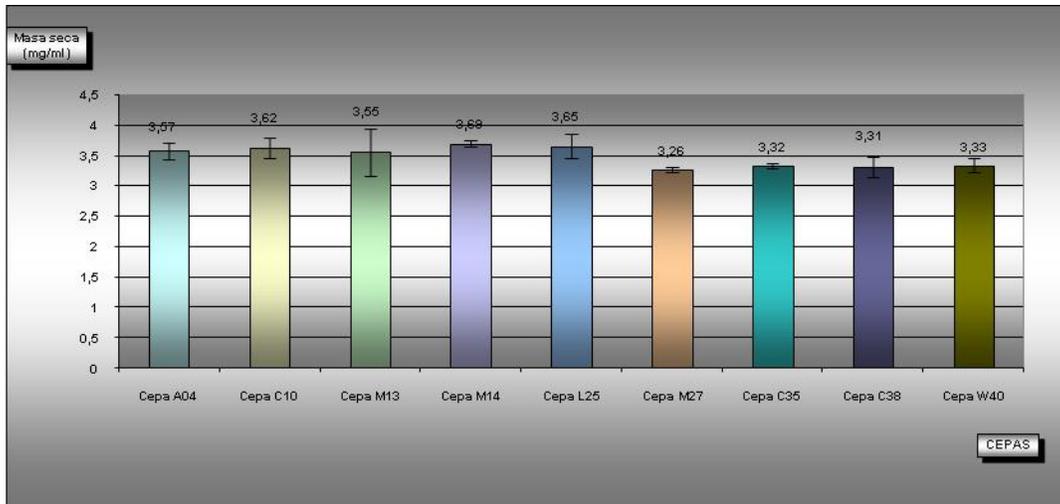


Figura 6. Valores promedio de Masa seca gravimétrica obtenidos de los aislamientos autóctonos de *S. sonnei*.

La viabilidad del cultivo se mostró a través de la determinación de la UFC presente en el momento escogido para la extracción proteica. La Figura 7 muestra los valores de UFC, alcanzados por cada una de los aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei* las que tuvieron un comportamiento similar con valores entre  $1.68 \times 10^9$ - $2.62 \times 10^9$ .

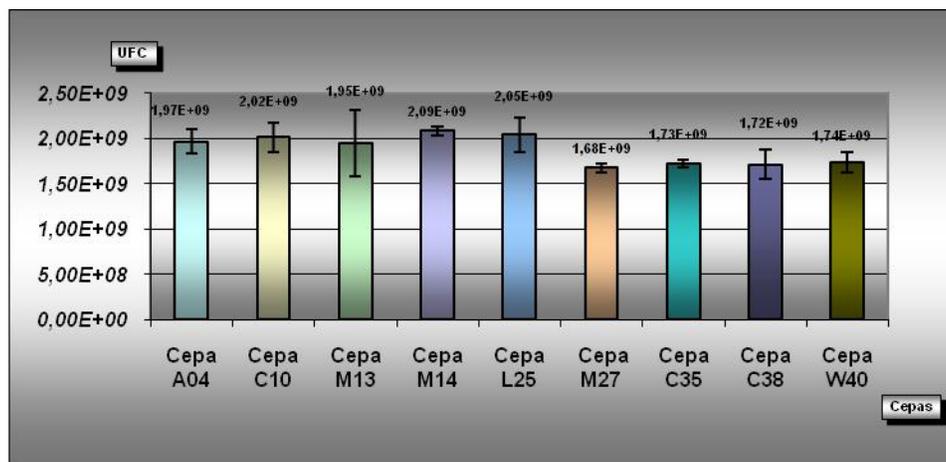


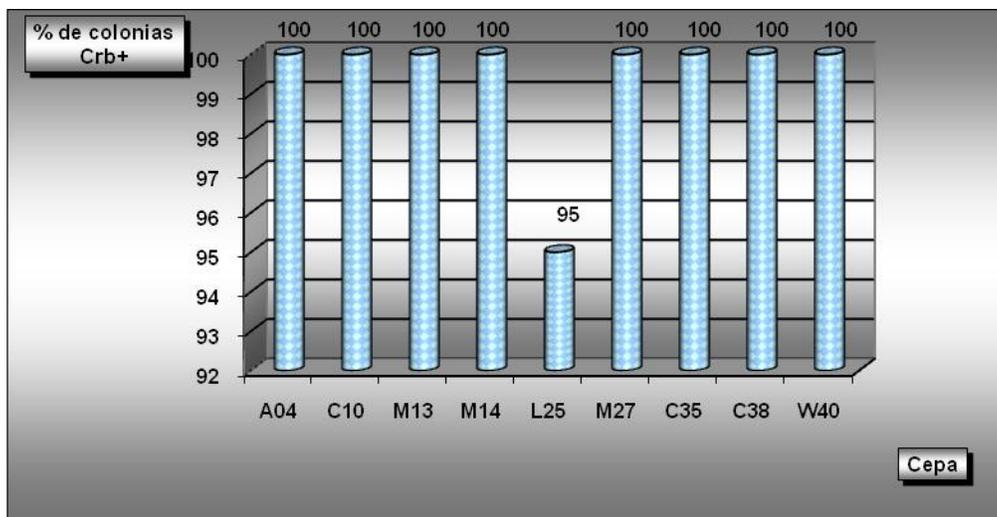
Figura 7. Valores de unidades formadoras de colonias obtenidos de los aislamientos autóctonos de *S. sonnei*.

El estudio comparativo de crecimiento microbiano entre los aislamientos fue necesario para conocer su comportamiento dadas las nuevas condiciones de cultivo; así como, para relacionar la presencia o estabilidad del plásmido de virulencia y la expresión de PME con el crecimiento microbiano.

Muchos patógenos entéricos, incluyendo el género *Shigella*, poseen grandes plásmidos que codifican una variedad de segmentos de virulencia. La pérdida o el reordenamiento de estos ocurren espontáneamente durante el crecimiento, teniendo como resultado invariablemente el surgimiento de derivados avirulentos incapaces de infectar los tejidos hospederos y por ende defectuosos secretores de las proteínas involucradas en el proceso de patogénesis (Watanabe y cols. 1985).

Para distinguir entre los aislamientos autóctonos portadores de este plásmido y los no portadores se utiliza la técnica del rojo congo, la cual es una de las pruebas más sencillas empleadas para este fin. La pérdida de la unión al RC usualmente está acompañada de alteraciones moleculares en el plásmido de virulencia. (Maurelli y cols. 1984; Shamlal y cols. 1997).

En el trabajo se analiza a las cuatro horas de cultivo (tiempo seleccionado para la extracción de PME), el porcentaje de células que mantienen el fenotipo de invasividad; es decir, RC(+). En la Figura 8 se pudo observar que todos los aislamientos autóctonos mostraron un 100% de colonias RC(+), excepto la cepa L25 que manifestó un 95%, lo que no representa diferencia estadísticamente significativa con respecto a los demás aislamientos estudiados.



**Figura 8. Porcentaje de colonias Rojo Congo positivas obtenidas en los aislamientos autóctonos de *S. sonnei***

Por lo general, las PME de los microorganismos constituyen metabolitos primarios asociados directamente al crecimiento (Lépori LR 2007); en este caso, las proteínas en las que centramos la atención, poseen determinismo plasmídico, por lo que se hizo necesario conocer las características del crecimiento, pues en estos casos no siempre un crecimiento rápido y con una pendiente marcada, representa un incremento en el número de células portadoras del plásmido de virulencia al final del cultivo microbiano (Brook TD y cols. 1994). Se ha demostrado, en el caso específico de *Shigella spp*, que alteraciones espontáneas presentes en la estructura del plásmido de virulencia, incrementan la capacidad para crecer “in vitro”. Se plantea que en condiciones de cultivo “in vitro”, la célula microbiana no se encuentra en condiciones para activar los mecanismos de expresión de sus antígenos de virulencia, codificados en gran parte en este plásmido, por lo que tiene tendencia, como fenómeno de ventaja adaptativa y economía celular, a desviar la maquinaria metabólica en función del crecimiento en las nuevas condiciones y canalizar para otros fines la energía empleada en el mantenimiento y replicación de esta estructura genética extracromosomal (Sasakawa Cy cols. 1986).

No obstante se hizo necesario, en caso de que se fuera a utilizar una cepa de *Shigella* como cepa vacunal para la obtención de PME, detectar la presencia de este plásmido a la hora de

extracción proteica, para tener la garantía de expresión de los antígenos de interés desde el punto de vista inmunogénico.

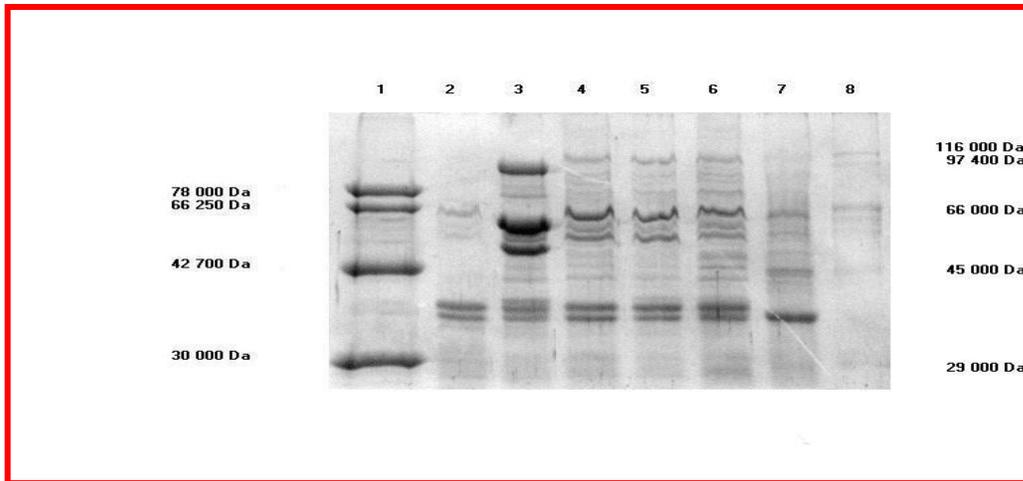
### **Análisis de la expresión de PME.**

El método de extracción de PME utilizado, empleando calor y una solución de extracción, ha sido aplicado con buenos resultados para bacterias Gram negativas (Frasch CE. 1990); sin embargo, no hemos encontrado evidencias en la bibliografía de su uso específico para el género *Shigella*; pero nos decidimos a aplicarlo en nuestro estudio por la experiencia que teníamos en la obtención de extractos proteicos de *Neisseria meningitidis* para la vacuna VA-MENGOC-BC.

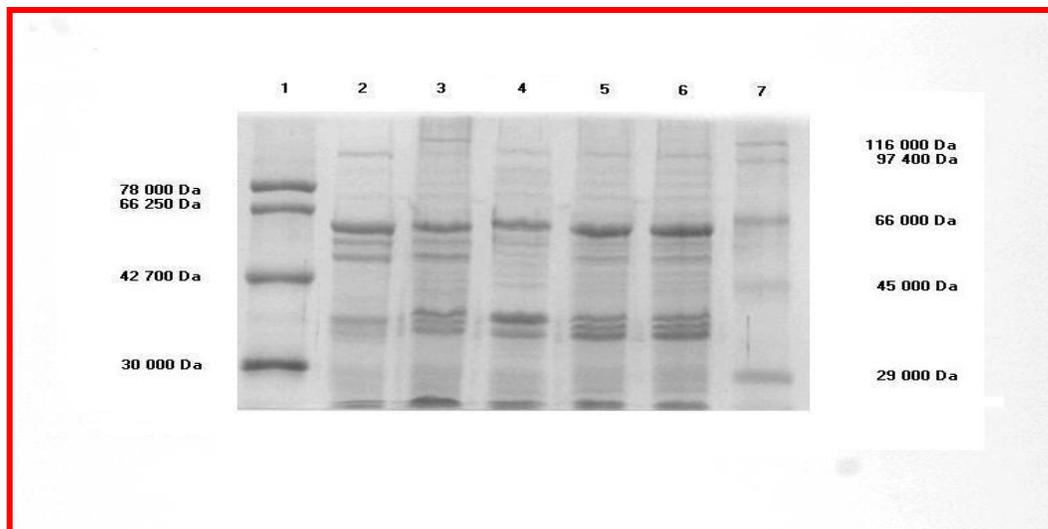
Las corridas electroforéticas realizadas mostraron el perfil de PME para cada uno de los aislamientos analizados. En las Figuras 9 y 10 aparecen los perfiles de expresión de PME correspondientes a los aislamientos de *Shigella sonnei*.

Se observó la presencia de diferentes bandas proteicas; algunas muy conservadas en cada uno de los aislamientos y otras manifestadas de una manera menos específica. Por ejemplo una banda proteica, de muy baja intensidad relativa de expresión, que migró a la altura de los 29 kDa en muchas de ellas. Esta proteína pudiera corresponder con la de 30 kDa reportada por otros autores que han estudiado el perfil de expresión de PME de *Shigella spp*, la cual constituye un factor regulador positivo de los niveles transcripcionales para algunas proteínas asociadas a la virulencia. (Sakai T y cols. 1986; Sakai T y cols. 1988).

Aparecen también en alguno de los aislamientos autóctonos, bandas que migran a los 45 y 74 kDa. Estas proteínas pudieran corresponder con las proteínas Ipa C (43 kDa) e Ipa A (72 kDa) respectivamente, ambas reportadas en la literatura como proteínas directamente relacionadas con el proceso de invasividad de este género microbiano. (Turbyfill KR y cols. 1998).



**Figura 9: Electroforesis (SDS-PAGE) de los diferentes aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei*. 1: PPMI: Patrón de peso molecular; 2ATCC; 3: A04; 4: M13; 5: C10; 6: M14; 7: L25; 8: PPMII: Patrón de peso molecular**

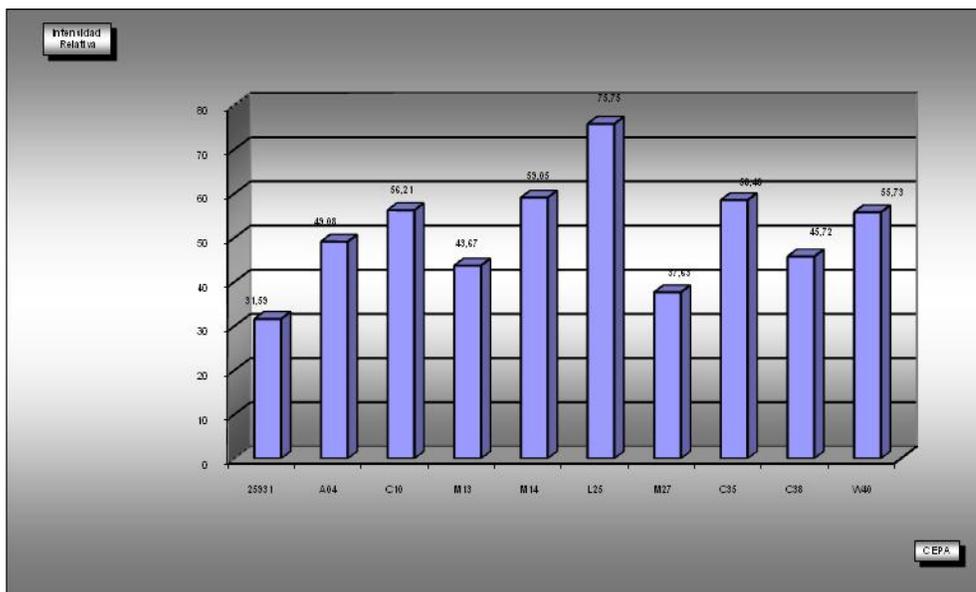


**Figura 10: Electroforesis (SDS-PAGE) de los diferentes aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei*. 1: PPMI: Patrón de peso molecular 1;; 2 ATCC; 3: M27; 4: C35; 5: C38; 6: W40; 7: PPMII: Patrón de peso molecular**

Después de esta caracterización del perfil y los niveles de expresión de algunas de las PME más representativas entre los aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei*, se integraron todos los niveles de expresión, medidos a través de IR, para determinar aquellos aislamientos de mayor rango de secreción de estos antígenos, ya que el objetivo final de este trabajo es la obtención de cepas que puedan constituir posibles candidatos vacunales,

sobre todo en la variante de vacunas de PME-LPS, de esta forma conocimos no solo el peso molecular de las proteínas, sino también el porcentaje que representan cada una con respecto al total, así como la IR asociada a ellas y el análisis realizado por el sistema ImageMaster para la determinación de los niveles de IR asociados a cada perfil de expresión, lo que permitió el desarrollo de este ensayo con una adecuada precisión. Se seleccionaron aquellos que alcanzaron los mayores valores de IR y que además se conservaron de manera homogénea entre todos los aislamientos. Fueron, por tanto, escogidas a través de este criterio, las proteínas que migraron a la altura de 35, 38, 58, 65 y 101 kDa para *Shigella sonnei*.

La Figura 11, muestra los diferentes niveles de intensidad relativa para los aislamientos autóctonos de *Shigella sonnei* con respecto a la proteína de 35 kDa, se consideró como altamente expresor el L25. El M27, apareció como el que menor representación tenía de esta proteína en membrana externa, entre los aislamientos estudiados de esta especie.

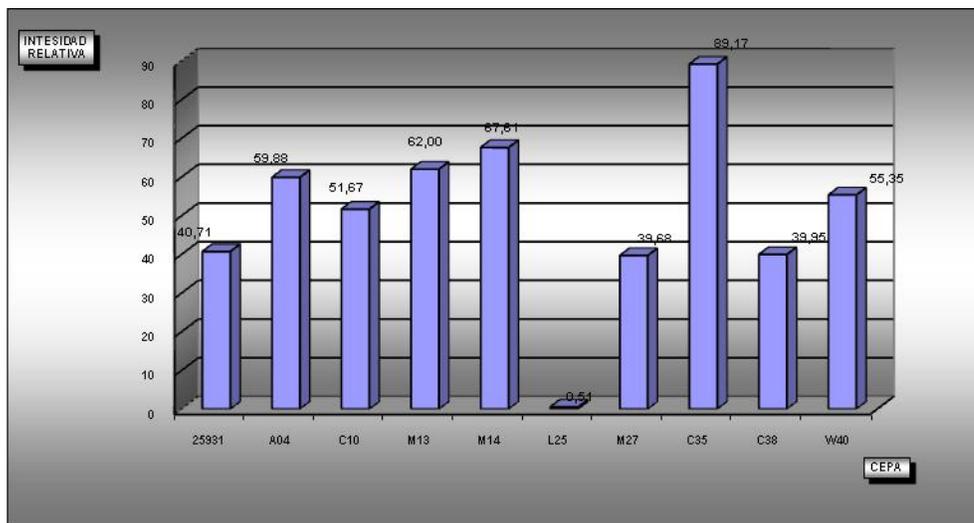


**Figura 11. Niveles de intensidad relativa alcanzados de la proteína 35 KDa en los aislamientos de *S. sonnei*.**

Estudios realizados acerca de las PMEM de *Shigella spp* plantean, que las mismas eluyen en una columna de gel de filtración con un PM aparente a los 130 kDa (Brook TD y cols.

1994). Esta proteína purificada sin calentamiento previo, migra en la electroforesis como una banda oligomérica de 78 kDa. Cuando la muestra es tratada a 100°C durante cinco minutos y en presencia de SDS antes de la electroforesis, la proteína migra en un rango de 35 a 37 kDa para las especies *S. flexneri* y *S. sonnei*, no siendo así para *S. dysenteriae*, donde migra a una altura de 38 kDa. Por tanto, somos del criterio que esta proteína que aparece representada en el perfil de expresión de PME de aislamientos autóctonos de *S. sonnei* a la altura de 35 kDa, debe corresponder con la planteada por Turbyfill KR y cols., 2000.

En los perfiles de PME de *Shigella sonnei*, se ve en todos los casos una banda que migra a la altura de 38 kDa. En la Figura 12, aparece la comparación, en cuanto a la intensidad de expresión de esta proteína para los diez aislamientos de esta especie. Se observó que a la inversa del comportamiento observado para la proteína de 35 kDa, en este caso el que más bajo nivel alcanzó fue el L25, mientras que el C35, alcanzó niveles muy superiores al promedio de los aislamientos analizados, seguido por los M14, M13 y A-04.



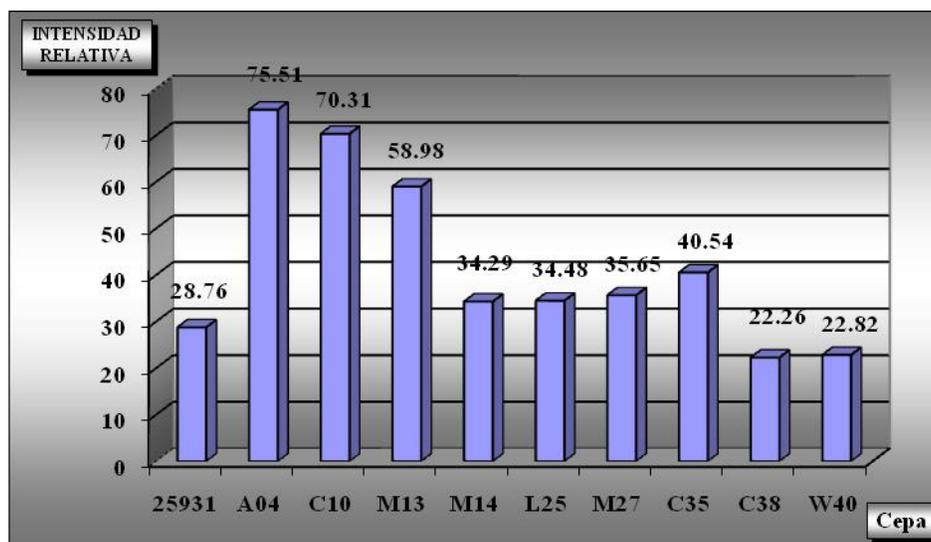
**Figura 12. Niveles de intensidad relativa alcanzados de la proteína 38 KDa en los aislamientos autóctonos de *S. sonnei***

Pal T y col., 1989 revelaron la presencia de esta proteína en perfiles de PME de cepas virulentas aisladas de pacientes con shigelosis la cual está asociada a la IpaD. El rol que juega esta proteína en la invasión a las células blanco del epitelio gastrointestinal del

hospedero no está claro aún, no obstante se conoce que mutantes de IpaD son no invasivos, no hemolíticos y presumiblemente incapaces de escapar del fagosoma, lo que avala en gran medida su importancia en el proceso de patogénesis de este género microbiano (Menard RPJ y cols. 1993; Zychlinsky A y cols. 1994; Turbyfill KR y cols. 1998). Se ha demostrado la implicación de esta proteína en la formación de complejos proteínicos de alto PM, derivado de la extracción de estos a partir de cepas virulentas de *Shigella flexneri* 2a. Estos hallazgos sugieren que IpaD se asocia con otra invasina Ipa para mediar la secreción de las proteínas correspondiente a este segmento extracromosomal (ipa), así como que puede ser parte de un complejo proteínico Ipa extracelular.

La Figura 13 muestra los valores de IR asociados a la expresión de la proteína de 58 kDa en los aislamientos de *Shigella sonnei*, los correspondientes a A04 y C10 alcanzaron buenos niveles de expresión, mientras que C38 y W40 mostraron los valores de intensidad más bajo del total de aislamientos de esta especie.

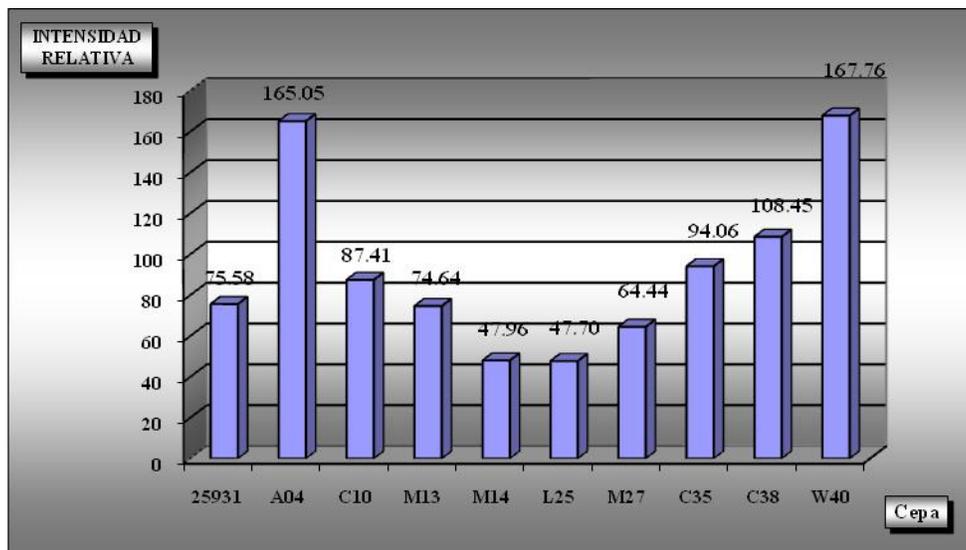
El segmento génico ipa, que codifica algunas de las proteínas más importantes como blanco de la respuesta inmune del hospedero contra la shigelosis, cuenta entre sus representantes con la proteína IpaB, de aproximadamente 58 kDa.



**Figura 13.** Niveles de intensidad relativa alcanzados de la proteína 58 KDa en los aislamientos autóctonos de *S. sonnei*.

Se ha descrito que IpaB e IpaC son secretadas en forma de complejo, siendo esto de suma importancia en la potenciación de la respuesta celular epitelial, necesaria para promover la entrada de este patógeno en las células diana del hospedero (Watarai y cols. 1996; Guichon A y cols. 2001). Varios autores han demostrado a través de técnicas de Inmunoblotting, que la presencia de extractos proteicos de membrana externa de una banda a la altura de 58 kDa, corresponde con la proteína IpaB de *Shigella* (Buysse JM y cols. 1987; Dinari G y cols. 1987; Pál T y cols. 1989; Menard R y cols. 1993); por tanto, la presencia de esta banda en los perfiles de PME mostrados, sugiere la presencia de esta proteína.

También en todos los aislamientos de *Shigella sonnei* apareció una banda que migró, al compararla con el patrón proteico de peso molecular, a la altura de 64 kDa. La Figura 14 revela los valores de intensidad relativa, medidos por densitometría, correspondientes a esta proteína en los aislamientos de *Shigella sonnei* pudiéndose observar mejor comportamiento ante la secreción de la proteína de 64 kDa en los islmientos de A-04 y W40, mientras que los malos productores de este antígeno proteico fueron en este caso M14 y L25.



**Figura 14. Niveles de intensidad relativa alcanzados de la proteína 65 KDa en los aislamientos autóctonos de *S. sonnei*.**

Un interesante estudio realizado deja ver que cepas virulentas de *S. flexneri 2a*, crecidas en medio TSB con presencia del colorante RC, mostraban un incremento en los niveles de secreción de tres proteínas con PM de 43, 58 y 63 kDa (Sankarán K y cols. 1989). Un

aspecto importante de este estudio es el hecho de que estas tres proteínas, mostraron un fuerte reconocimiento por parte de sueros de humanos y monos en fase convaleciente (Hale TL y cols. 1985; Dinari G y cols. 1987).

Es probable que la proteína de 64 kDa, que apareció en los patrones de expresión de PME de los aislamientos estudiados, se corresponda con la proteína antigénica de *Shigella sonnei* de PM semejante reportada en la literatura (Dinari G y cols. 1987; Boudry y cols. 1988; Sakai T y cols. 1988; Venkatesan MM y cols.1988).

Se destaca también la condición de invasividad que tiene esta bacteria, la que es capaz de penetrar y proliferar dentro de la mucosa colónica humana. Se ha podido demostrar en cultivos celulares “in vitro” que el ingreso de esta bacteria al hospedero está mediada por los antígenos de invasión plasmídica: IpaB, IpaC e IpaD, convirtiéndolos en esenciales para la entrada al epitelio celular. (Menard, R y cols.1993; Sansonetti P.J. y cols. 1993; Hueck CJ. 1998; De Geyber C. y cols. 2000; Cersini A y cols. 2003).

Todos los genes bacterianos necesarios para que ocurra la invasividad se encuentran dentro de la región 30 kb - 220kb del plásmido de virulencia, por lo que las proteínas de alto PM constituyen antígenos importantes a tener en cuenta para la obtención de preparados vacunales de un complejo PME-LPS (Kaisar AT y cols. 2003). En la Figura 15 los aislamientos correspondientes a A-04 y W40 fueron los que mayor nivel de expresión tuvieron con respecto a la proteína de 101 kDa, mientras que L25 mostró ser el de más bajo poder de secreción de dicho antígeno.

Las proteínas de alto peso molecular constituyen antígenos importantes a tener en cuenta para la obtención de preparados vacunales de PME-LPS, pues se conoce su impacto en la presentación ante el sistema inmunológico (Brook TD y cols. 1994). Esta es la causa por lo que también se hace un estudio comparativo entre los aislamientos de *Shigella sonnei* teniendo en cuenta la proteína de 101 kDa. Si bien los niveles alcanzados para esta proteína no fueron elevados, al compararlas con el resto de las cuatro estudiadas, consideramos que debíamos tenerla en cuenta, pues se conoce su impacto en la presentación ante el sistema inmunológico. (Brook TD y cols. 1994).

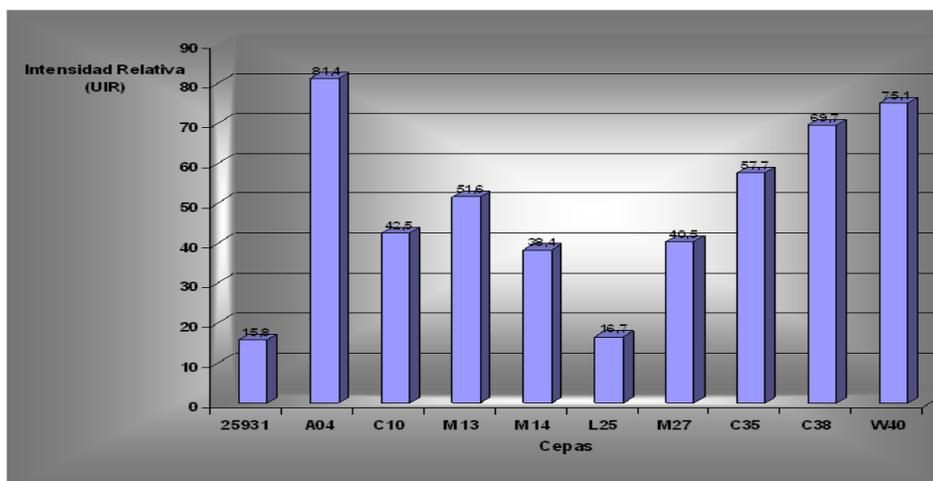


Figura 15. Niveles de intensidad relativa alcanzados de la proteína 101 kDa en los aislamientos autóctonos de *S. sonnei*.

La Figura 16 muestra el promedio de los valores de IR, asociados a la expresión de las cinco proteínas que representan grupos con valores homogéneos o similares desde el punto de vista estadístico para un nivel de confianza del 95%. Aquí no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre A-04, W40, C35, C10, M13, C38 y M14; pero sí se comportaron significativamente diferentes desde el punto de vista estadístico los correspondientes a M27, ATCC 25931 y L25 con una  $p < 0.05$ .

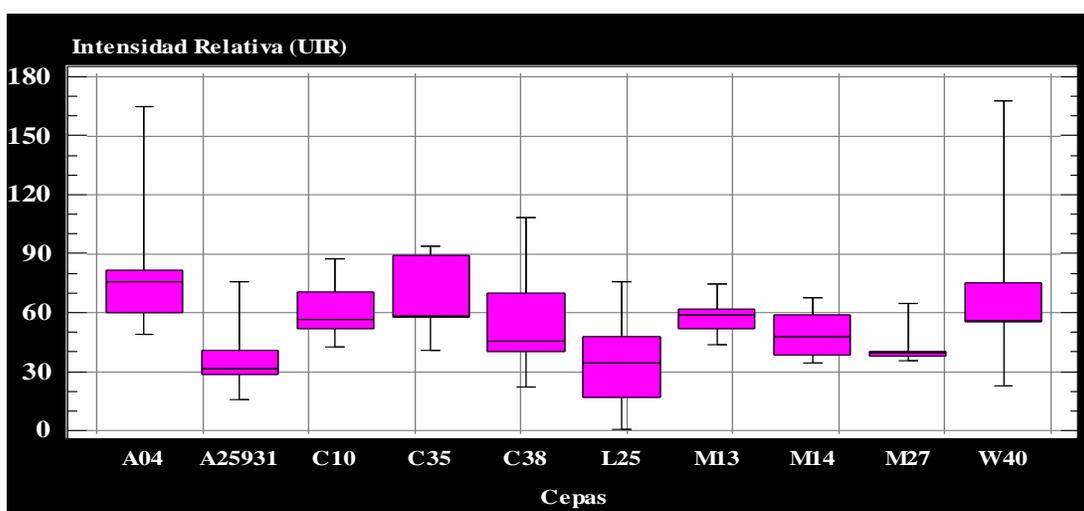


Figura 16. Valores promedio de Intensidad Relativa asociados a la expresión de las proteínas de 35, 38, 58, 64 y 101 kDa de *S. sonnei*.

El aislamiento C35, apareció como el de mayor poder de síntesis para las proteínas estudiadas. Si se tiene en cuenta que todos mantuvieron el 100% de sus colonias como portadoras del plásmido de virulencia en el momento de la extracción, se pudiera afirmar que este aislamiento podría ser el seleccionado para la extracción de vesículas de membrana externa; pero hay un detalle de suma importancia y es que las características de crecimiento no fueron las mejores, aspecto imprescindible para la selección de una cepa con estos propósitos.

Por otro lado se debe tener en cuenta que la cepa seleccionada preferiblemente debe ser la mejor secretora del compendio de antígenos proteicos de interés estudiados incluyendo la proteína de 101 kDa, en este caso el C35 tiene un 57.7%. El A-04 siguió en el orden de poder de síntesis de las proteínas estudiadas al C35, además fue portador del 100% del plásmido de virulencia a las 4 horas del cultivo, cumplió con los parámetros de selección correspondientes a pruebas bioquímicas y metabólicas. Está presente con porcentajes elevados de IR en las cinco proteínas que resultaron seleccionadas del análisis por IMAGEMASTER y es el mejor expesor con un 81.4% de la proteína de alto peso molecular; por lo que proponemos a partir de estos estudios que este aislamiento sea nuestra posible cepa vacunal.

No es menos cierto, que el patrón epidemiológico de cepas circulantes juega un papel fundamental en los criterios de selección de cepas vacunales; no obstante, los objetivos de este trabajo para el futuro se basan en la obtención de preparados proteicos enriquecidos en proteínas Ipa, las cuales se plantean que son, no solamente altamente inmunogénicas, sino que también están conservadas entre cepas de una misma especie y entre especies diferentes dentro del género, lo que permite a través de la reactividad cruzada, un cruce inmunogénico elevado. Proteínas como las PMEM, son fuertemente inmunogénicas, expuestas en la superficie y antigénicamente relacionadas a las otras especies de *Shigella*. Estas constituyen un antígeno común entre las especies de *Shigella* y pudieran ser una macromolécula significativa a estudiar también, particularmente cuando se hace necesaria una vacuna para contrarrestar la emergencia de cepas resistentes a las drogas antimicrobianas. (Mota MI y cols. 2005).

#### 4.1.4 Confección de los Lotes de Referencia y de Trabajo de la cepa seleccionada.

Cumpliendo con los principios básicos de las BPL y BPP, en el presente trabajo se crearon los lotes de siembra de trabajo de la cepa A-04 de *Shigella sonnei*, candidata a cepa vacunal contra la shigelosis. Los mismos se prepararon a partir del lote de siembra de referencia liofilizado.

El lote de trabajo de la cepa A04 con una concentración inicial de  $10^9$  UFC/mL se mantuvo viable sin variación de la concentración. Las condiciones y el método de almacenamiento utilizado permitieron una estabilidad en cuanto a la viabilidad de este candidato vacunal. Las características microbiológicas y bioquímicas del mismo aparecen en la Tabla 4.

**Tabla 4. Características de los Lotes de Siembra de la cepa A-04 de *S. sonnei***

<b>Pruebas</b>	<b>Criterio de Aceptación</b>
<b>Determinación de viabilidad (UFC/mL)</b>	$\geq 10^5$ UFC/mL
<b>PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS</b>	
<b>Características culturales en Agar Triptona Soya + Rojo Congo 0.01%.</b>	Colonias redondas, translúcidas, bordes enteros, color púrpura por la presencia del plásmido de virulencia
<b>Pureza</b>	Cocobacilos, Gram (-). Pueden estar solos, en parejas o formando pequeñas cadenas
<b>Potencialidad de crecimiento en medio optimizado para <i>Shigella sonnei</i></b>	A la cuarta hora de cultivo los valores de absorbancia (Abs) deben ser $\geq$ a 1.0.
<b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS</b>	
<b>Agar Hierro Kligler (KIA)</b>	KIA: superficie inclinada roja, fondo amarillo, no producción de gas ni de sulfuro de hidrógeno.
<b>Agar Hierro Lisina (LIA)</b>	LIA: superficie inclinada púrpura y fondo amarillo, no producción de sulfuro de hidrógeno.
<b>Prueba de citocromo oxidasa,</b>	<b>Citocromo oxidasa: negativa (no se observa color púrpura intenso).</b>

## **4.2 Obtención de un medio de cultivo óptimo semisintético para el crecimiento de la cepa seleccionada.**

### **4.2.1 Selección de un medio basal apropiado donde se pueda evaluar la función objetivo.**

Teniendo en cuenta que el proceso de obtención del candidato vacunal involucra necesariamente un proceso de purificación de PME, se decidió obtener un medio semisintético el cual fuera capaz de brindar un mayor crecimiento bacteriano, sin que la cepa perdiera las condiciones por las cuales fue seleccionada como posible cepa vacunal y que presentara las menores interferencias posibles en el proceso de purificación. Para esto usamos el Método Rosenbrok Modificado (Rosenbrock HH. 1960); que por ser acelerado y directo, indica tendencia más que diferencia significativa, identificando pequeñas diferencias en los valores de DO como diferencias significativas. Es un método de búsqueda directa, de Programación No Lineal, que tiene en cuenta las interacciones entre los distintos componentes a optimizar y admite discriminar los que no son necesarios para la función objetivo escogida; además, admite hacer tres variables de cada variante en un mismo experimento lo que nos brinda la posibilidad de hacer una evaluación correcta y precisa.

En el primer experimento se utilizaron los medios TSB como medio basal que es el utilizado para el crecimiento de este microorganismo (Lennette y cols. 1982) y MFM recomendado para la obtención de PME donde realizamos las variantes cambiando las concentraciones del Extracto de Levadura y Glucosa, utilizados como fuente de nitrógeno orgánico y de carbono respectivamente por *Shigella spp.* (Paz MF y cols. 2003).

Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 5. En este experimento la variante con una concentración de EL de 10 g/L y una de Glucosa de 2 g/L fue la que arrojó mejores resultados en cuanto al promedio de DO con respecto al medio TSB; por lo que pasó a ser el nuevo medio basal en el próximo experimento.

**Tabla 5. Comparación entre el medio TSB y las variantes planteadas para el medio Frantz Modificado**

Nº Variante	Descripción	D.O. Promedio	Coef. Var.
V0	TSB	2,650333333	0,18777778
V1	Frantz		
	10g/L EL	3,060666667	0,13777778
	2 g/L Glucosa		
V2	Frantz		
	10g/L EL	2,910333333	0,01444444
	5g/L Glucosa		
V3	Frantz	2,590222223	0,005

El segundo experimento es un paso de discriminación que nos permite conocer los componentes del MFM necesarios para el crecimiento de este microorganismo, se utilizó el medio basal seleccionado en el primer experimento y a partir del mismo se hicieron las variantes para determinar la necesidad de suplementar la L-Cisteína, el Acido Glutámico y Sulfato de Magnesio, teniendo en cuenta el contenido de los dos últimos en los 10 g/L de EL presente en el medio basal. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Experimento Nº 2. Ausencia de L-Cisteína, Acido Glutámico y Sulfato de Magnesio como variantes del MFM**

Nº Variante	Descripción	D.O. Promedio	Coefficiente de Variación
V0	Frantz		
	10g/L EL	2,594	0,07
	2 g/L Glucosa		
V1	Sin L-Cisteína	2,387333333	0,06555556
V2	Sin Sulfato de Mg	2,527333333	0,12222222
V3	Sin A. Glutámico	2,850666667	0,13888889

Como se puede apreciar, los mejores resultados se obtuvieron cuando no se le suministró Ácido Glutámico al medio, lo que implica que para el crecimiento de este microorganismo, el suministrado en el EL es suficiente. De esta forma la variante 3 pasó a ser el medio basal

para el próximo experimento, por ser el paso discriminatorio considerado por el método como la última variante.

#### 4.2.2 Aplicación del Método de Optimización No Lineal en la obtención del medio optimizado para la cepa seleccionada de *Shigella sonnei* A-04

Se fijó como función objetivo el máximo crecimiento del microorganismo, sin perder su plásmido de virulencia.

En este tercer experimento se comenzó con el primer paso de optimización que se hizo con el medio seleccionado como medio basal y sus variantes para lograr el objetivo principal. La variante #1 para este experimento consistió en aumentar la concentración de EL a 12,5g/L, la variante #2 aumentamos el cloruro de amonio a 1,75g/L y la variante #3 fue agregar el Cloruro de Calcio a una concentración de 0,09g/L ya que ha sido empleado según la literatura en trabajos sobre la permeabilidad de la membrana celular (Lépori, 2007).

Se obtuvieron resultados superiores en la variante #3 con una  $p < 0.01$  y una ligera diferencia significativa con una  $p < 0.5$  para la variante #1; pero se mantuvo el mismo medio basal por las consecuencias que pudiera traer para nuestro cultivo elevar la concentración del EL desde el punto de vista práctico y económico. Tabla 7.

**Tabla 7. Experimento N° 3. Primer Paso de Optimización para el medio Frantz Modificado**

N° Variante	Descripción	D.O. Promedio	Coefficiente de Variación
V0	Medio Basal	2,578	0,118
V1	Medio Basal + 2.5 g/L de EL	2,633	0,110
V2	Medio Basal + 0.5 g/L de NH <sub>4</sub> Cl	2,590	0,120
V3	Medio Basal + 0,08 g/L de CaCl <sub>2</sub>	2,329	0,152

El experimento 4 fue el segundo paso de optimización del medio de cultivo. Mantuvimos en todos los casos como medio basal el seleccionado en el experimento anterior. La variante #1 fue disminuir la concentración de EL a 8,750g/L, la variante #2 disminuir el Cloruro de Amonio a 1,125g/L y la variante #3 disminuir la concentración de Cloruro de Calcio a 0,045g/L. Aunque se puede observar que la variante #1 fue la mejor; es decir, donde se disminuyó la concentración de Extracto de levadura en 1,25 g/L, los resultados no arrojaron diferencias estadísticas significativas, por lo que para el siguiente paso de optimización se mantuvo también el mismo medio basal. Tabla 8.

**Tabla 8. Experimento N° 4. Segundo Paso de Optimización para el medio Frantz Modificado**

N° Variante	Descripción	D.O. Promedio	Coficiente de Variación
V0	Medio Basal	2,984	0,073
V1	Medio Basal - 1,25 g/L de Ext. Lev.	2,986	0,152
V2	Medio Basal - 0,125 g/L de NH <sub>4</sub> Cl	2,921	0,170
V3	Medio Basal - 0,045 g/L de CaCl <sub>2</sub>	2,819	0,209

En el experimento #5 solamente se hizo una variante del medio basal que consistió en aumentar la concentración de cloruro de potasio a 0.18g/L y pudimos observar que los resultados de esta variante fueron inferiores a los obtenidos con el medio basal; por lo tanto, el mejor para nuestro trabajo resultó ser este medio basal. Tabla 9.

**Tabla 9. Experimento N° 5. Tercer Paso de Optimización para el medio Frantz Modificado**

N° Variante	Descripción	D.O. Promedio	Coficiente de Variación
V0	Medio Basal	3.558	0.124
V1	Medio Basal + 0,09 g/L de KCl	3.288	0.069

Los resultados obtenidos con la cepa A-04, permitieron finalmente obtener un medio semisintético óptimo que en las condiciones de cultivo descritas, brindara mayor biomasa con iguales condiciones de virulencia y producción de PME; es decir, sin perder el objetivo del trabajo.

Estudios similares han sido realizados empleando este mismo método demostrándose mayor estabilidad en el proceso de optimización de medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos y en la producción de vacunas, que con los métodos de gradientes (Votruba J y cols. 1975). Igualmente se ha utilizado en la evaluación de cepas de *Salmonella typhi* presumiblemente hiperproductoras de polisacárido Vi para buscar mayor producción de polisacárido. (Hernández A. 2005; Miranda G. 2006).

Podemos resumir que el Medio Optimizado Semisintético obtenido en zaranda está compuesto por los reactivos que se muestran en la Tabla 10:

**Tabla 10. Composición del Medio de Cultivo Optimizado para *Shigella sonnei* A-04**

Componentes	g/L
Extracto de Levadura	10.000
Glucosa	2.000
Sulfato de Magnesio	0.600
Cloruro de Sodio	6.000
Fosfato di-básico de Sodio (anhidro)	1.994
Cloruro de Amonio	1.250
Cloruro de Potasio	0.090
Cloruro de Calcio	0.090
L-Cysteina	0.015

#### **4.2.3 Evaluación del perfil de PME por STA y en electroforesis desnaturizante por (SDS – PAGE) de la cepa de *S. sonnei* A-04 obtenidos con el Medio de Cultivo Óptimo.**

Para cumplir con este objetivo, se obtuvieron los complejo PME-LPS de los cultivos realizados en el medio optimizado con la cepa A-04, partiendo de un cultivo en zaranda y otro en fermentador, ambos se realizaron simultáneamente usando el mismo preinóculo. El inóculo fue cultivado en ambos casos bajo las mismas condiciones que los cultivos anteriores.

La presencia del plásmido de virulencia fue comprobada como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos obteniendo un 100% de colonias RC +.

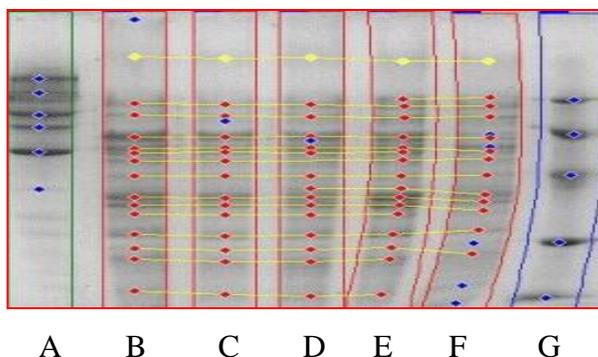
Los resultados obtenidos en cuanto a concentración de PME, concentración de LPS, y rendimiento de proteínas en base a MSG se muestran en la Tabla 11.

Se hicieron 5 fermentaciones bajo las mismas condiciones de cultivo con el objetivo de obtener repetibilidad en los resultados en cuanto a características y concentración de PME y LPS.

**Tabla 11. Concentraciones de Proteínas y LPS alcanzadas en un cultivo en zaranda y otro en fermentador, partiendo ambos del mismo preinóculo con la cepa *Shigella sonnei* A-04 en MO.**

Muestra	Concentración de proteínas (mg/mL <sup>-1</sup> )	Concentración de LPS (µg/mL <sup>-1</sup> )	Concentración (mg/g MSG <sup>-1</sup> )
Zaranda	0.609 ± 0.007	379,75	352,31
Fermentador	2.544 ± 0.012	659,18	781,73

La Figura 17 muestra el análisis de los perfiles de proteínas obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), seguido de una tinción con Azul de Coomassie mediante el software ImageMaster, como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. Se compararon los resultados de la extracción en cuanto a los perfiles de proteínas que presentó el complejo extraído en cada uno de los procesos y sus pesos moleculares aproximados. Además, en la comparación entre las intensidades de las bandas realizado mediante dicho software, se observó la similitud entre los perfiles de migración.



**Figura 17. Electroforesis en gel de poliacrilamida, tinción con Azul de Comassie y aplicación del software ImageMaster. Evaluación del perfil proteico de las bandas correspondiente a cada fermentación. Proteínas coincidentes por cada perfil. A: Patrón de alto peso molecular, B: Proceso no. 1, C: Proceso no.2, D: Proceso no.3, E: Proceso no. 4, F: Proceso no. 5 y G: Patrón de bajo peso molecular.**

Otro resultado que arrojó la electroforesis, fue el valor del peso molecular de las proteínas que aparecen en las bandas observadas y el porcentaje que cada una de ellas representa del total de proteínas. Estos resultados aparecen en la Tabla 12.

**Tabla 12. Peso Molecular y porcentaje del total de proteínas presentes en el complejo PME-LPS. Resultados obtenidos a partir de Electroforesis en gel de poliacrilamida y analizados con software ImageMaster.**

Proceso No.1		Proceso No.2		Proceso No.3		Proceso No.4		Proceso No.5	
% Banda	M (Da)								
8,12	138052	8,1	136183	7,36	137114	10,52	132519	7,18	134339
						4,52	93604	6,28	96850
8,73	90468	9,31	89243	9,79	89243	5,47	88034	5,94	89243
5,82	81120	4,42	80569	6,99	80021	6,66	79478	7,64	81120
8,38	66569	9,33	66569	6,83	67025	7,77	66569	2,85	66569
4,45	59691	4,58	60099	5,29	60099	4,58	60099	3,58	59285
3,39	57299	4,29	57690	9,67	57299	3,11	57690		
4,63	53523	5,41	53523			5,26	53889	5,59	55002
4,08	46384	4,52	46384	4,57	46384	4,69	46384	5,47	47666
				2,95	41591	2,41	41591	8,2	39925
8,62	38325	10,17	38064	5,87	38325	7,64	38325	4,93	37294
4,15	35799	5,52	35556	5,58	35799	6,14	35556	4,96	34364
4,84	32987	4,24	32541	4,82	32541	3,35	32987		
7,11	27256	7,51	26886	7,87	27070	6,81	27256	6,38	28783
3,51	24108	2,75	23620	3,23	23782	4,15	24273	2,98	25634
8,79	21914	11,13	21324	11,25	21324	10,03	21914	7,78	23300
7,08	16346	5,87	15799	5,77	15585	6,9	15799	5,48	17381

Como se puede apreciar la mayoría de las proteínas aparecen representadas en cada uno de los procesos y en % análogos, por lo que se puede inferir que los perfiles de proteínas obtenidos en las distintas fermentaciones son similares.

#### **4.2.4 Obtención y purificación del complejo PME-LPS a partir de la biomasa obtenida en los cultivos en fermentación con el medio optimizado y la determinación de la concentración de proteínas y LPS.**

Se conoce que los antígenos de la superficie celular, como el LPS, constituyen moléculas de interés vacunal debido a su importante papel en la patogénesis de la bacteria y fundamentalmente, porque existen evidencias de su capacidad de inducir inmunidad protectora en hospederos (Sudipta RA y cols. 1994).

Con el propósito de extraer tales componentes de la membrana celular y obtenerlos en forma solubilizada, se escogió un proceso de obtención de PME y LPS que involucra la acción del SDS a una concentración del 0.5%, por ser un eficiente agente solubilizante que permite remover la mayoría de los componentes proteicos de membrana, mimetizando además, el ambiente hidrofóbico en el que estos se encuentran (Sudipta RA y cols., 1994), el cual es referido en estudios de obtención de complejos PME-LPS de *V. cholerae* (González Y. 2002). De esta manera se garantizó la extracción de los componentes hidrofóbicos de la membrana, sin provocar cambios drásticos en la estructura de los mismos, que pudieran afectar grandemente sus propiedades antigénicas.

De los cinco procesos de fermentación discontinua realizados, se extrajeron a partir de lotes de biomasa obtenidos, los componentes de superficie PME y LPS de la cepa A-04. A las muestras obtenidas en cada proceso de extracción, se les realizó una evaluación físico-química preliminar. Los resultados de la cuantificación de proteínas y LPS en las mismas, se ilustran en la Tabla 13.

**Tabla 13: Contenido de proteínas, LPS y relación  $\mu\text{g}$  LPS/mg proteína de cada muestra de los procesos de extracción**

<b>Procesos</b>	<b>mg de proteína</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> de LPS</b>	<b>Relación <math>\mu\text{g}</math> LPS/mg prot.</b>
<b>1</b>	<b>16.26</b>	<b>6044.09</b>	<b>371.71</b>
<b>2</b>	<b>14.84</b>	<b>5794.83</b>	<b>390.48</b>
<b>3</b>	<b>13.00</b>	<b>5774.60</b>	<b>444.20</b>
<b>4</b>	<b>10.74</b>	<b>5985.27</b>	<b>557.28</b>
<b>5</b>	<b>16.05</b>	<b>9950.84</b>	<b>619.99</b>
<b>Coef. Variación (%)</b>	<b>16,3463765</b>	<b>27,0569938</b>	<b>22,6256186</b>

Los valores resultantes de la cuantificación de proteínas y LPS, así como, la relación entre ellas en los cinco procesos resultaron estables al presentar coeficientes de variaciones adecuados menores de un 30%. (Resolución N° 47-2007. “Evaluación del Desempeño de los Diagnosticadores”. CECMED.)

Sobre la variabilidad entre procesos de extracción, debe tenerse en cuenta que la obtención de las PME y de las moléculas de LPS, constituye un proceso complejo, cuya materia prima es la biomasa celular, que por tratarse de organismos vivos está sometida a una fuente de variabilidad biológica. La expresión en la superficie de PME y LPS, es de por sí un proceso complejo, mediado por mecanismos enzimáticos modulados por la fase de crecimiento bacteriana, el requerimiento nutricional, condiciones de crecimiento tales como: la temperatura, el pH del medio, la agitación, la aeración, entre otras. Cualquier variación en estos factores, afecta el crecimiento celular, la expresión de antígenos, y por lo tanto, se traduce en la obtención de biomasas con características diferentes.

#### 4.2.5 Análisis de los perfiles cromatográficos mediante cromatografía en gel de filtración Sephacryl S-1000.

Después de conocidas las concentraciones de LPS de cada muestra se les realizó el análisis cromatográfico que se presenta a continuación en Sephacryl S-1000 (Figura 18), se identificó en todos los perfiles cromatográficos un pico mayoritario que eluye en un volumen similar al volumen total de la columna, lo que infiere que se logró obtener el complejo PME-LPS, resultados similares han sido reportados por otros autores utilizando las mismas técnicas de extracción y purificación de estos complejos (Pérez y cols. 2009). La Tabla 14, muestra la relación  $V_e/V_t$  de cada pico.

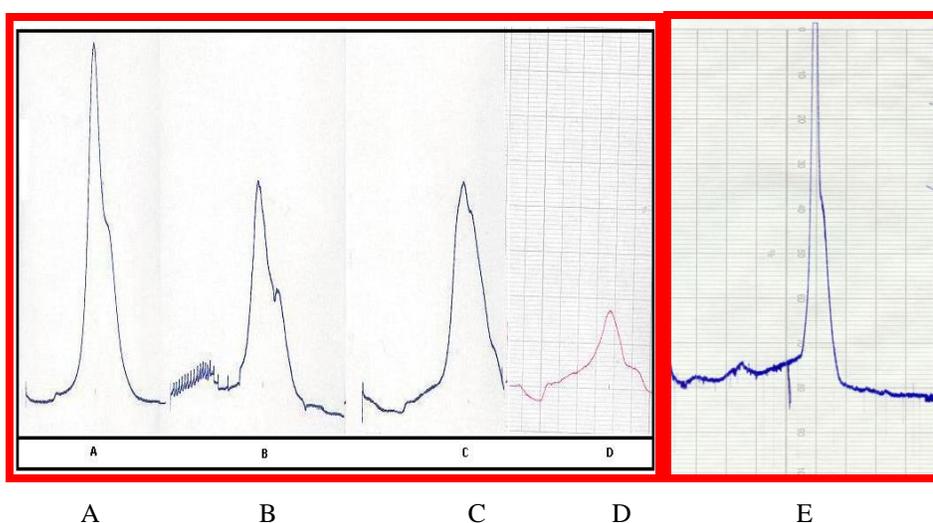


Figura 18. Perfiles cromatográficos típicos de los complejos PME-LPS extraídos con SDS 0.5%. Se utilizó como solución tampón de equilibrio: 30 mM Tris–2 mM EDTA–DOC 0,5% pH 8.5. Se aplicó de 0.2 a 1 mL de las muestras (0.5–2 mg / mL) en un lecho sedimentado de 56.8 mL de Sephacryl S–1000, con velocidades de flujo de 0.4 mL / min y se les determinó la absorbancia a 280 nm a las fracciones y la presencia de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Tabla 14: Relación  $V_e/V_t$  de los picos cromatográficos mostrados en la Figura 14

Procesos	No de picos	Coefficiente $V_e/V_t$ de cada proceso
1	1	0.84
2	1	0.85
3	1	0.87
4	1	0.90
5	1	0.94

La caracterización físico-química preliminar realizada, aporta resultados válidos en el análisis de la composición de PME y LPS en las muestras obtenidas. En el presente estudio, estos constituyen herramientas auxiliares para la caracterización biológica preliminar de las muestras.

#### **4.3 Desarrollo de los modelos animales para la evaluación de la inmunogenicidad y protección.**

##### **4.3.1 Selección de una cepa virulenta de *Shigella sonnei* y una de *Shigella flexneri* como cepas de reto homóloga y heteróloga respectivamente**

El universo de trabajo fueron los mismos 30 aislamientos autóctonos utilizados en el trabajo como se muestra en la Tabla 1.

Para la selección de la cepa de reto homóloga nos valimos de los mismos aislamientos de *Shigella sonnei* que conforman la investigación, por lo que se escogió la cepa W40 ya que tuvo un comportamiento similar en todos los aspectos analizados a la cepa A-04. De igual forma para la cepa heteróloga, se tuvo en cuenta que presentara el 100% de las colonias con respuesta positiva al RC y un crecimiento con buenas características, resultando escogida la cepa X19 de *Shigella flexneri*.

##### **4.3.2 Montaje de dos biomodelos “Ratón-Pulmón” y “Test de Sereny”**

Ha sido tarea difícil la evaluación de la eficacia protectora tanto de posibles cepas vacunales potenciales, como de candidatos vacunales contra la shigelosis, debido a que hasta el momento no se ha descrito un modelo animal que desarrolle una disentería bacilar igual ni parecida a la de los humanos; por lo tanto, se hizo necesario el desarrollo de modelos animales que permitieran una confiable y eficaz caracterización de la inmunogenicidad y eficacia de las mismas y la evaluación de procesos de un gran número de candidatos vacunales. (Cersini y cols. 2003)

El montaje de dos modelos animales descritos por diferentes autores han servido para probar cepas de *Shigella spp* con buenos resultados; estos son modelo Ratón-Pulmón y Test de Sereny en curieles, utilizados en estudios de eficacia y reactogenicidad, para comparar principalmente vías de administración y frecuencia de una inmunización; al igual que en estudios de reto en ambos modelos (Levenson VJ y cols. 1995; Li W y cols. 2009)

El modelo Ratón-Pulmón para *Shigella* se caracteriza por invadir el epitelio pulmonar, produciendo infiltrados inflamatorios que semejan la shigelosis intestinal y el Test de Sereny nos muestra que *Shigella* es capaz de invadir el tejido corneal produciendo queratoconjuntivitis, semejando así el proceso de invasión que ocurre en el epitelio mucosal (Voino-Yasenetskoya MK y cols. 1977; Hartman AB y cols. 1991).

#### **4.3.2.1 Biomodelo Ratón-Pulmón.**

Se inocularon los ratones como se describió en Materiales y Métodos siguiendo un protocolo de trabajo previamente establecido y aprobado por el Comité de Ética del Instituto Finlay, en los que se probaron diferentes concentraciones de las dos cepas de reto. Los animales inoculados fueron separados en grupos de hasta 10 animales por jaula y concentración bacteriana.

Los resultados obtenidos durante los 10 días de duración del ensayo fueron los esperados, ya que mediante la inspección diaria de los ratones se pudieron observar las manifestaciones clínicas descritas por diferentes autores. (d' Hauteville y cols. 2002)

A partir de las 24 horas se observó decaimiento, disminución de su actividad, pérdida de apetito, fiebre, erizamiento de los pelos, hasta shock séptico mortal (Cersini y cols. 2003). La cepa heteróloga resultó ser mucho más virulenta como era de esperar ya que *Shigella flexneri* es más infectiva, por lo que las concentraciones de bacteria inoculadas intranasalmente en los ratones provocaron un 100% de mortalidad en todos los casos, mientras que para la cepa homóloga no hubo en ninguna concentración porcentajes tan elevados de mortalidad (85%). Los animales controles se inocularon con SSE no presentando sintomatología alguna.

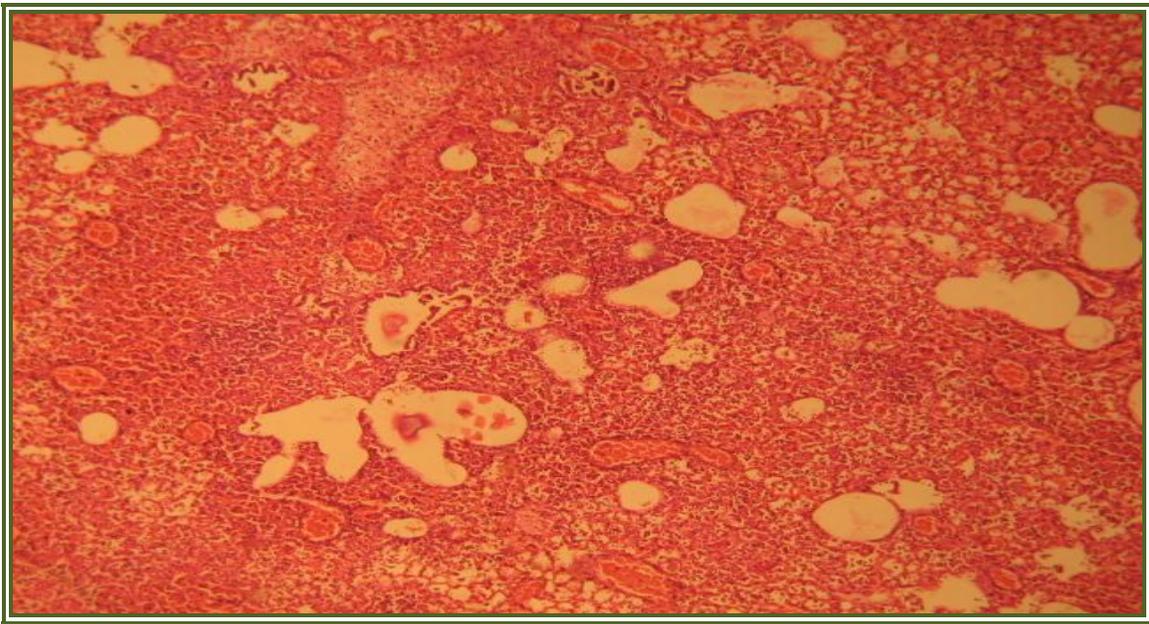
#### **Estudio microbiológico del pulmón.**

En la siembra de los pulmones de los animales inoculados obtuvimos cultivo puro de colonias de *Shigella sonnei* en todos los casos a las 24 horas de incubados a 37°C. El caso de los animales controles no se obtuvo crecimiento bacteriano.

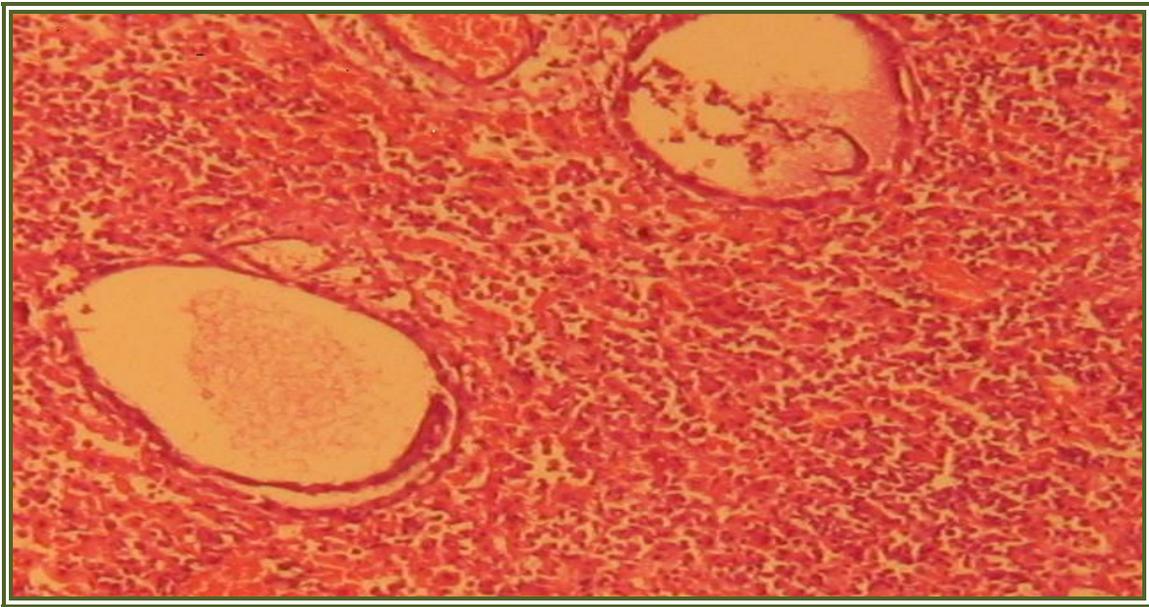
#### **Estudio anatomopatológico.**

Microscópicamente se observaron áreas de color rojo oscuro en los pulmones, los cuales presentaban una superficie algo deprimida al corte y presión, rezumaban un líquido

blancoamarillento espumoso. En el análisis histopatológico de estas alteraciones, pudieron observarse además, lesiones caracterizadas por infiltrados de abundantes PMN neutrófilos que ocupaban todo el parénquima pulmonar haciendo desaparecer la arquitectura normal del órgano, así como la presencia de abundante fibrina depositada entre los alvéolos, también se apreció dilatación de los bronquios y bronquiolos, al igual que focos de necrosis; (Fotos 1 y 2) lo cual permitió diagnosticar una neumonía fibrinopurulenta aguda grave en las lesiones descritas. En los ratones controles no se presentaron alteraciones morfológicas que sugieran lesiones, lo cual permite establecer una relación causa efecto directa entre las lesiones antes descritas y las inoculaciones bacterianas practicadas



**Foto 1: Podemos observar los infiltrados agudos supurativos, focos de necrosis, fibrosis purulenta y bronquiectasia producidas por la inoculación de *Shigella sonnei* A-04 intranasalmente em ratones. H.E. 100X**



**Foto 2: Imagen a mayor aumento de la fotografía anterior. H.E. 160X**

**Determinación de  $DL_{50}$  en ratones Balb/c con cepas de reto seleccionadas utilizando la vía de inoculación intranasal en el modelo ratón – pulmón.**

Se inocularon los ratones como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 15 y 16.

**Tabla 15. Determinación de  $DL_{50}$  con cepa de reto homóloga.**

Cepa de reto homóloga <i>Shigella sonnei</i> (W40). Días de evolución según esquema de trabajo											
Concentración	Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día	Quinto día	Sexto día	Séptimo día	Octavo día	Noveno día	Décimo día	Total de muertos
$1.5 \times 10^{12}/30\text{ul}$	2	1	5	-	-	-	-	-	-	-	8
$7.5 \times 10^{11}/30\text{ul}$	1	1	2	2	-	-	-	-	-	-	6
$3.75 \times 10^{11}/30\text{ul}$	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2
$1.87 \times 10^{11}/30\text{ul}$	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1

**Tabla 16. Determinación de DL<sub>50</sub> con cepa de reto heteróloga.**

Cepa de reto heteróloga <i>Shigella flexneri</i> (X19). Días de evolución según esquema de trabajo											
Concentración	Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día	Quinto día	Sexto día	Séptimo día	Octavo día	Noveno día	Décimo día	Total de muertos
3.70x10 <sup>9</sup> /30ul	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
3.70x10 <sup>8</sup> /30ul	9	-	1	-	-	-	-	-	-	-	10
3.70x10 <sup>7</sup> /30ul	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8
3.70x10 <sup>6</sup> /30ul	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2

Estos experimentos fueron realizados 3 veces permitiéndonos obtener valores similares y así poder concluir con la determinación de la DL<sub>50</sub> de ambas cepas, las que nos sirvieron para próximos estudios con posibles preparados vacunales. Para el caso de *Shigella flexneri* la DL<sub>50</sub> fue de 3.77x10<sup>7</sup> bacterias/mL y para *Shigella sonnei* 6.0x10<sup>10</sup> bacterias/mL.

Nuestros valores de DL<sub>50</sub> resultaron ser muy parecidos a los hallados por otros autores, los que han sido utilizados para estudios de reto en ensayos de propuestas vacunales. Estos estudios hablan de DL<sub>50</sub> en un rango entre 10<sup>6</sup> – 10<sup>11</sup> según cepa utilizada, teniendo en cuenta las condiciones de los animales, condiciones de la cepa, y que las cepas de *Shigella sonnei* son menos invasivas que las de *Shigella flexneri* para la cual se reporta una DL<sub>50</sub> de 10<sup>8</sup> (d'Hauteville y cols. 2002; Cersini A y cols. 2003). En un estudio de protección que utilizan este biomodelo, plantean haber determinado una DL<sub>50</sub> en todos los casos de *Shigella flexneri* dentro de los valores de 10<sup>7</sup> (Cyr y cols. 2009).

#### 4.3.2.2 Biomodelo Test de Sereny.

Se inocularon los curieles como se describe en Material y Métodos. Para la cepa homóloga los curieles resultaron más resistentes a la inoculación, se pudo observar queratoconjuntivitis no purulenta (grado 2) en las concentraciones más elevadas del inóculo 10<sup>10</sup> col/mL y un lagrimeo con enrojecimiento de la conjuntiva en diluciones de 10<sup>9</sup> col/mL. Los curieles inoculados con la cepa reto heteróloga mostraron las patologías correspondiente a grado 3 (queratoconjuntivitis purulenta) en la dilución 10<sup>8</sup> col/mL y en grado 2 (queratoconjuntivitis no purulenta) la dilución 10<sup>7</sup> col/mL con pérdida de visión reversible, no encontrando patología alguna en los ojos controles para ambas cepas. De

esta manera se determinó como DMI aquella que produjo una queratoconjuntivitis grado 2. Estas concentraciones fueron para *Shigella sonnei*  $10^{10}$  col/mL y para *Shigella flexneri*  $10^7$  col/mL. Tabla 17. Fotos 3, 4, 5 y 6.

Estas concentraciones son parecidas a las encontradas por otros autores que a su vez han sido utilizadas para comparar diferentes vías de administración y frecuencia de una inmunización con retos de animales con DMI de  $10^{10}$  para *Shigella sonnei* y  $10^9$  para *Shigella flexneri* (Hartman AB y cols.1994). Estudios de reacción cruzada entre diferentes serotipos homólogos de *Shigella*, buscando protección conjuntival como es el caso del trabajo realizado por Noriega y colaboradores donde plantean a través de este modelo una protección conjuntival de un 85% (Noriega FR y cols.1999). También han sido empleadas como control positivo en investigaciones de enterobacterias invasivas (Magalhaes V y cols. 1996; Li y cols. 2009). Estudios más recientes hablan de un nuevo modelo animal de shigelosis en curieles para estudios de protección por vía intrarectal donde se reporta que todos los animales presentaron una rectocolitis aguda y severa en todos los casos (Shim DH y cols.2007).

**Fotos 3 y 4. Determinación de Dosis Media Infecciosa de *Shigella sonnei*. Queratoconjuntivitis  
Grado 2 provocada por la cepa.**



**Fotos 5 y 6. Determinación de Dosis Media Infecciosa de *Shigella flexneri*. Queratoconjuntivitis  
Grado 2 provocada por la cepa.**



#### **4.4 Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectogénica del complejo PME-LPS contra *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*.**

La inmunización de ratones Balb/c por vía intramuscular y reto en modelo Ratón-Pulmón, nos permitió observar que después de suministrar 3 dosis de inmunógeno (en los días 0, 14 y 28), cada una de 50µg en base al contenido de proteínas, fueron buenos en todos los grupos retados tanto con DL<sub>50</sub> como con 10DL<sub>50</sub>.

Los resultados obtenidos en los experimentos por medio de este modelo con la cepa homóloga W40 mostraron que la supervivencia expresada por el porcentaje promedio obtenido con la DL<sub>50</sub> fue del 90% y con la 10DL<sub>50</sub> fue del 53,3% (Tabla 17). Para la cepa heteróloga X19, la supervivencia obtenida con la DL<sub>50</sub> fue del 76,6% y con la 10DL<sub>50</sub> del 20% (Tabla 18). Resultados similares han sido reportados por otros autores en estudios de protección en ratones con infección local con *Shigella sonnei* donde hacen reto con dosis de 6 y 12 DL<sub>50</sub> inoculados intranasalmente con una supervivencia aumentada en todos los ratones vacunados (Levenson LV y cols. 1995; Kaminski RW y cols. 2009).

El comportamiento de los experimentos realizados mediante la inmunización en curieles para el reto con las cepas homóloga y heteróloga por el Test de Sereny tuvo un análisis diferente, ya que aquí se trabajó con DMI, con porcentaje de protección total y protección combinada que es como se describe en la literatura para este modelo animal (Orr N y cols. 1993). Se observó que no hubo protección total ni combinada cuando se realizó el reto con las cepas homóloga y heteróloga en los animales que no fueron inmunizados previamente, mientras que en los animales que si se inmunizaron, mostraron un 100% de protección total con la cepa homóloga y un 55% de protección combinada con la cepa heteróloga. Tabla 19 y 20. Estudios similares con el objetivo de evaluar inmunogenicidad en curieles después de una vacunación con *Shigella sonnei*, han sido reportados obteniendo una protección del 50 al 80% usando DMI para ambas especies (Kerekes L. 1976). Con porcentajes parecidos se reportan Li W y cols. 2009 en el desarrollo de una vacuna viva atenuada recombinante de *Shigella*.

**Tabla 17. Resumen de los experimentos de reto con cepa homóloga de *Shigella sonnei* W40 para medir protección en el modelo Ratón-Pulmón.**

Resumen de Experimentos de Reto en Ratones con cepa homóloga (W40).									
Grupos	Retados con	Primer Experimento		Segundo Experimento		Tercer Experimento		% Promedio Obtenido en los Experimentos	
		V	M	V	M	V	M	V	M
1 SSE	LD <sub>50</sub>	6	4	2	8	3	7	<b>36.66</b>	<b>66.33</b>
2 Complejo	LD <sub>50</sub>	10	0	8	2	9	1	<b>90.00</b>	<b>10.00</b>
3 Complejo	10LD <sub>50</sub>	4	6	6	4	6	4	<b>53.33</b>	<b>46.67</b>
4 (Control)	-	5	0	5	0	5	0	100	0

**Tabla 18. Resumen de los experimentos de reto con cepa heteróloga *Shigella flesneri* X19 para medir protección en el modelo Ratón-Pulmón.**

Resumen de Experimentos de Reto en Ratones con cepa heteróloga (X19).									
Grupos	Retados con	Primer Experimento		Segundo Experimento		Tercer Experimento		% Promedio Obtenido en los Experimentos	
		V	M	V	M	V	M	V	M
1 SSE	LD <sub>50</sub>	4	6	3	7	7	3	<b>56.66</b>	<b>43.33</b>
2 Complejo	LD <sub>50</sub>	6	4	5	5	8	2	<b>76.66</b>	<b>23.33</b>
3 Complejo	10LD <sub>50</sub>	2	8	1	9	3	7	<b>20.00</b>	<b>80.00</b>
4 (Control)	-	5	0	5	0	5	0	100	0

**Tabla 19. Determinación de protección con la cepa homóloga y la cepa heteróloga en curieles No vacunados mediante modelo Test de Sereny**

<b>Determinación de Protección en Curieles No Vacunados</b>							
<b>Grupos de curieles</b>	<b>Inoculados con</b>	<b>Nº de ojos</b>	<b>Grado 0</b>	<b>Grado 1</b>	<b>Grado 2</b>	<b>Grado 3</b>	<b>% Protección</b>
<i>S. sonnei</i>	DMI	20			20		0
<i>S. flexneri</i>	DMI	20				20	0

**Tabla 20. Determinación de protección con la cepa homóloga y la cepa heteróloga en curieles vacunados con el complejo PME-LPS mediante modelo Test de Sereny**

<b>Determinación de Protección en Curieles Vacunados</b>							
<b>Grupos inmunizados</b>	<b>Inoculados con</b>	<b>Nº de ojos</b>	<b>Grado 0</b>	<b>Grado 1</b>	<b>Grado 2</b>	<b>Grado 3</b>	<b>% Protección</b>
<i>S. sonnei</i>	DMI	20	20				100 (Total)
<i>S. flexneri</i>	DMI	20	3	8	9		55 (Combinada)

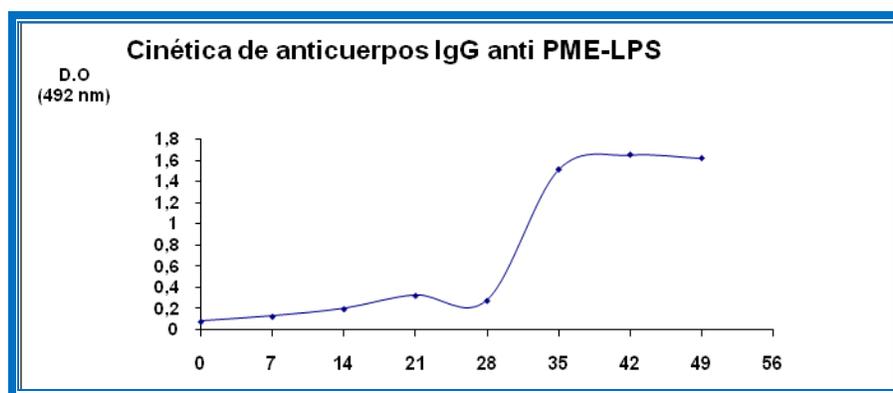
#### **4.4.1 Evaluación de Inmunogenicidad contra el complejo PME-LPS por ELISA e inmunoidentificación de las proteínas relevantes por Western Blot.**

Los resultados de inmunogenicidad que se mostrarán en lo adelante, han sido obtenidos en ratones Balb/c por el modelo de la inmunización intramuscular del complejo PME-LPS.

La cinética de respuesta obtenida, evidencia de manera general, el nivel de anticuerpos IgG anti PME-LPS en suero, los cuales desempeñan una importante función en la inmunidad contra la shigelosis, (Passwell y cols. 2001) los que aumentan luego de cada inoculación hasta alcanzar su máximo a los 42 días posteriores a la primera inmunización. En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos de la unión de los sueros de cada tiempo de inmunización, obtenidos por la técnica de ELISA descrita por Benitez y cols. 1999 donde se puede observar que en T35 y T42 después de las 3 dosis hay una elevación de los valores del título de anticuerpos. Otros autores plantean que estos dos modelos animales son útiles

para medir producción de Ac anti IgA e IgG, en los que han obtenido resultados satisfactorios. (Orr N y cols. 1993).

Nuestros resultados homologan los presentados por otros autores que plantean que en la tercera dosis de inoculación es donde han alcanzado los mejores valores de anticuerpos con diferentes esquemas de inmunización en un estudio acerca del desarrollo y evaluación de una vacuna de *Shigella sonnei* (Orr N y cols. 1993; Turbyfill KR y cols. 2000; Oaks EV y cols. 2006). De igual forma se han probado vacunas de células completas en ensayos pre-clínicos a doble ciego y placebo controlado (Fase 1) con un esquema de inmunización 0, 4 y 28 días en el que se midieron anticuerpos en suero contra LPS e IpaC por ELISA con respuesta IgG e IgA del 86% de los pacientes, al LPS del 57% y a IpaC del 61%, considerándose que se había logrado una buena capacidad inmunogénica y protectogénica contra *Shigella sonnei* (McKenzie R y cols. 2006). Por otro lado, un estudio realizado en la Universidad de la Habana con un complejo PME-LPS de *Shigella sonnei*, demostró que a la tercera dosis era donde se obtenían mayores títulos de anticuerpos tanto en IgG anti LPS como para IgG anti PME por mediación de la técnica de ELISA (Sánchez O. 2004)



**Figura 19. Evaluación por ELISA de la respuesta de anticuerpos IgG contra el complejo PME-LPS. Cinética que demuestra la inmunogenicidad obtenida.**

La evaluación de la capacidad de las PME y el LPS de inducir respuesta de anticuerpos IgG en suero al ser administrados por vía intramuscular a ratones con reto en ambos modelos animales, es una herramienta importantísima para poder evaluar la inmunogenicidad, lo cual constituye el criterio de selección preliminar para un estudio de este tipo. (Orr N y cols. 1993; Chowers Y y cols. 2007)

Otro estudio efectuado fue la realización de un Western Blot donde utilizamos el mismo suero de ratones al que se le conocía con anterioridad el título de anticuerpos IgG anti PME-LPS con el objetivo de:

1. Identificar las PME inmunogénicas presentes en el complejo PME-LPS.
2. Evaluar el reconocimiento de los anticuerpos del suero específicos a las PME, cuando éstas se encuentran en la membrana celular.
3. Identificar las PME presentes en el complejo PME-LPS obtenido a partir de un cultivo de la cepa seleccionada de *Shigella sonnei* A-O4, que se conservan en *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y el enteropatógeno *Vibrio cholerae*.

Para ello el pool de sueros se enfrentó al inmunógeno y a lisados de cada una de las cepas a reconocer. En la Figura 20, se muestran los resultados obtenidos del ensayo de identidad. Se pudo observar que son varias las PME identificadas en el Inmunógeno de los pesos moleculares aproximados: 96, 58, 38, 20 y 17 KDa. De ellas las tres últimas son las más consistentemente reconocidas.

Por otro lado vemos que las PME identificadas, son reconocidas cuando están formando parte de la célula bacteriana, con la misma intensidad con la que son reconocidas en el inmunógeno. Constituye la excepción, la proteína de PM aproximado de 96 KDa que se observa más fuertemente reconocida en los lisados. Existen proteínas prácticamente no identificadas en el inmunógeno, que son bien reconocidas en los lisados, por ejemplo, aquellas de peso molecular aproximado de 65, 40 y 28 KDa.

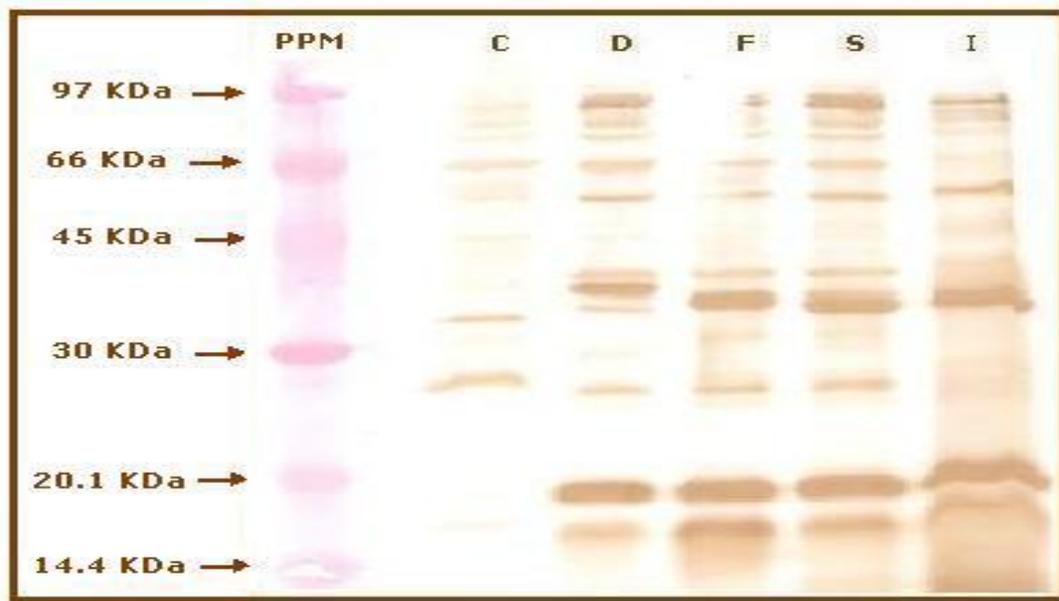


Figura 20. Ensayo Western Blot realizado con el pool de sueros obtenido de la inmunización. PPM: patrón de peso molecular; C: *V. cholerae*, cepa C7258; D: *S. dysenteriae*, cepa ATCC número 13313; F: *S. flexneri*, cepa 9; S: *S. sonnei*, cepa A-04; I: inmunógeno.

Las PME de *Shigella sonnei*, se conservan en *Shigella flexneri* y *Shigella dysenteriae*. No se aprecian diferencias en el perfil de proteínas reconocidas entre una especie y otra.

Igualmente las PME de *V. cholerae* fueron identificadas por el pool de sueros en el lisado de *V. cholerae* cepa C7258, puede observarse en las bandas de proteínas que muestran pesos moleculares aproximados de 28 y 35-38 KDa. Proteínas de semejante peso molecular, fueron identificadas en los lisados de las tres especies de *Shigella*, y con más baja intensidad en el inmunógeno, como es el caso de la PME de 28 KDa. Esta proteína, fue detectada en todas las muestras obtenidas al realizar el análisis de los perfiles electroforéticos.

Otros autores han hecho ensayos de inmunogenicidad y protección con experimentos inmunoblot y han encontrado que las PME fueron reconocidas por el antisuero aunque se conoce que los mecanismos de protección en shigelosis no están establecidos con certeza, las PME especialmente 39, 34, 23 y 20 kDa pudieran ser los mejores antígenos en la inducción de la respuesta inmune protectora (Mukhopadhaya A y cols. 2003; Jennison AV y cols. 2004; Oaks EV y cols.2006).

El presente trabajo aporta resultados que constituyen la base para las investigaciones futuras encaminadas a desarrollar una vacuna contra la shigelosis.

La evaluación de las propiedades inmunogénicas y protectogénicas del complejo obtenido, en condiciones no precisamente estandarizadas; aunque si homogéneas para todos los casos, permitió obtener resultados que indican que la cepa A-04 fue una buena elección como cepa propuesta a candidata vacunal, ya que la extracción del complejo PME-LPS de la superficie celular de esta cepa pudo ser evaluada mediante dos modelos animales utilizados en los estudios de inmunogenicidad y protección. Además generó elevados títulos de anticuerpos séricos IgG anti PME-LPS en ratones inmunizados por vía intramuscular.

Sería bueno seguir realizando estudios de otro tipo para conocer con exactitud la naturaleza de las PMEM que están presentes en nuestro complejo. Además realizar estudios con nuevos modelos animales capaces de reflejar la sintomatología de la shigelosis en humanos. Los resultados indican una metodología de trabajo y selección adecuada que posibilitó obtener muestras con las posibles Ipa, PME de alto PM y muestras altamente inmunogénicas y protectogénicas evaluadas por los dos biomodelos establecidos, por lo que consideramos pueden ser utilizados para obtener y evaluar antígenos de interés vacunal.

## CONCLUSIONES

1. En la primera etapa de selección de la cepa vacunal, en base a su mayor robustez microbiológica, bioquímica y metabólica, además, por la consistencia y amplitud de espectro de las fundamentales proteínas de membrana externa, se seleccionó el aislamiento de *Shigella sonnei* A-04 como posible cepa vacunal, con la cual se cumplieron los requisitos para elaborar los lotes de referencia y de siembra.
2. El proceso de optimización del medio de cultivo y las demás condiciones del mismo en zaranda y en fermentador realizado para la cepa A-04 sobre la base del rendimiento y consistencia del perfil de PME obtenido y un perfil cromatográfico PME-LPS satisfactorio , conformó la segunda etapa de selección de la cepa vacunal.
3. Se montaron y calibraron dos modelos animales, uno en ratones y otro en curieles (modelo Ratón-Pulmón y Test de Sereny) independientes y reconocidos internacionalmente, mediante los cuales se comprobó la inmunogenicidad y protección en ensayos preclínicos del preparado vacunal experimental, basado en las PME-LPS de la cepa *Shigella sonnei* A-04. Así mismo, mediante la utilización de éstos, se seleccionaron dos cepas virulentas, una homóloga W40 y una heteróloga X19.
4. El complejo PME-LPS demostró ser inmunogénico al ser evaluados por la técnica ELISA los sueros de ratones vacunados; además de ser identificadas por Western Blot las proteínas relevantes presentes en el complejo al enfrentar estos sueros a lisados de células de *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* y *Shigella dysenteriae*

## RECOMENDACIONES

1. Continuar los estudios preclínicos y clínicos necesarios encaminados a obtener un preparado vacunal eficaz y seguro contra la shigelosis a partir del complejo PME-LPS de la cepa *Shigella sonnei* A-04.
2. Completar la caracterización del complejo PME-LPS con el objetivo de estudiar las proteínas de membrana externa mayoritarias (PMEM)
3. Tener en cuenta el diseño experimental utilizado en este trabajo como posible metodología a seguir para la selección de cepas candidatas vacunales.

## BIBLIOGRAFIA

1. Allaoui A, Sansonetti PJ, Menard R, Barzu S, Mounier J, Phalipon A. MxiG, a membrane protein required for secretion of *Shigella spp.* Ipa invasions: involvement in entry into epithelial cells and in intercellular dissemination. *Mol Microbiol.* 1995. 17: 461-470.
2. Allaoui A, Sansonetti PJ, Parsot C. MxiDJ, a lipoprotein involved in secretion of *Shigella* Ipa invasions, is homologous to YscJ, a secretion factor of the *Yersinia* Yop proteins. *J. Bacteriol* 1992. 174: 7661-7669.
3. Allaoui A, Sansonetti PJ, Parsot C. MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins. *Mol Microbiol* 1993. 7: 59-68.
4. Andrews GP, Maurelli AT. MxiA of *Shigella flexneri* 2a, with facilitates export of invasion plasmid antigens, encodes a homolog of low-calcium response protein, Lcr P, of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1992. 61: 3825-3831.
5. Application note. ECF Western. ImageMaster. VDS-CL. An 18-1139-14 AA, 1999.p1-p2.
6. Arockiasamy A, Krishnaswamy S. Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from *Salmonella Typha* for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial outer-membrane protein. *Analytical Biochemistry.* 2000. 283: 64-70.
7. Baron's Handbook. Baron's Medical Microbiology. Cuarta edición, 2000
8. Barry EM, Wang J, Wu T, Tamar D, Levine MM. Immunogenicity of multivalent *Shigella* ETEC candidate vaccine strains in a guinea pig model. *Vaccine.* 2006. 24: 3727.3734.
9. Barzu S, Fontaine A, Sansonetti P, Phalipon A. Induction of a local anti-IpaC antibody response in mice by use of a *Shigella flexneri* 2<sup>a</sup> vaccine candidate: implications for use of IpaC as a protein carrier. *Infect. Immun.*1996. 64: 1190-1196.
10. Basualdo W, Laconich M, Campos A, Arbo-Sosa A. Susceptibilidad "in vitro" de azitromicina frente a cepas de *Shigella spp* provenientes de niños con diarrea disintérica. *Arch Pediatric Urug.* 1998. 69 (3 supl): S 45 – 48.
11. Baudry B, Kaezorek M, Sansonetti PJ. Nucleotides sequence of the invasion plasmid antigen B and C genes (ipaB and ipaC) of *Shigella flexneri*. *Microb. Pathog.* 1988. 4: 345-357.
12. Benitez JA, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B et al. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX  $\Phi$  – negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor as a cholera vaccine candidate. *Infect. Immun.* 1999. 67: 539-545.
13. Bennish ML Wojtyniak J. Mortality due to shigellosis: community and hospital data. *Rev. Infect. Dis.* 1991. 13: 5245-5251.

14. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1984
15. Bernardini ML, Mounier J, d'Haubeville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra and intercellular spread through interaction with F-actin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1989. 86: 3867-3871.
16. Boudry B, Kaczorek M, Sansonetti PJ. Nucleotide sequence of invasion plasmid antigen B and C genes (ipaB and ipaC) of *Shigella flexneri*. Microb. Pathog. 1988. 4:345-357
17. Brewer NR. Respiratory physiology, p. 252. In HL Foster, JD Small, JG Fox (ed). The mouse in biomedical research: normative biology, immunology, and husbandry. Academic Press, Inc., New York. 1983.
18. Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Biology of Microorganisms, seventh Edition. 1994. 564-565
19. Brooks GF, Jawetz. Melnick & Adelberg's – Medical Microbiology. 23 ed. McGraw – Hill Companies. 2004.
20. Buddenberg C, Daudel D, Liebrecht S, Greune L, Humberg V, Schmidt MA. Development of a tripartite vector system for live oral immunization using a gram-negative probiotic carrier. Int J Med Microbiol. 2008. 298(1-2): 105-14.
21. Buysse JM, Stover CK, Oaks EV, Venkatesan MM, Kopecko DJ. Molecular cloning of invasion plasmid antigen (ipa) genes from *S. flexneri* analysis of ipa gene products antigenic mapping. J. Bacteriol. 1987. 169: 2561-2569.
22. Cabrera R, Echeíta A, Herrera S, Usera MA, Ramirez M, Bravo L, et al. Resistencia a los antimicrobianos, perfil plasmídico y ribotipificación en cepas de *Shigella sonnei* aisladas en Cuba. Rev. Esp. Quimioterap, 2006. Vol 19 (No 1): 76-78
23. Canadian, Council on Animal Care, Guide to the Care and Use of Experimental Animal, Ottawa, Ont.: CCAC. Vol. 2. 1984
24. CDC/NCID. OPS. Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de *V. cholerae* 1994. Programa Especial de Publicaciones. Washington, D. C. Estados Unidos
25. Center for Infectious Diseases. Division of Bacterial and Mycotic Diseases, 2005
26. Cersini A, Martino MC, Martini I, Giacomo R, Bernardini ML. Analysis of Virulence and inflammatory Potential of *Shigella flexneri* Purine Biosynthesis Mutants. Infection and Immunity. 2003. Vol. 71, No. 12: 7002-7013.
27. Chamekh J. Immunomodulation using genetically engineered bacteria for type III-mediated delivery of heterologous antigens and cytokines: Potential application in vaccine and therapeutical developments. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2009. Sep 24 (Epub ahead of print).
28. Chowers Y, Kirschner J, Keller N, Barshack I, Bar-Meir S, Ashkenazi S, et al.. Specific polysaccharides vaccine-induced IgG antibodies prevent invasion of *Shigella* into Caco-2 cells and may be curative. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. 104(7): 2396-2401.

29. Clerc P. "Etude de L'interaction Des bacteries du genre *Shigella*. Avec les cellules Eucaryotes"(These presentee' pour obtenir le diplome de Doctoral). Paris; Institute Pasteur. 1988.
30. Cohen D, Ashkenazi S, Green M, Gdalevich M, Robin G, Slepon R. et al. Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet*. 1999. 349: 155-159.
31. Coster TS, Hoge CW, VanDeVerg LL, Hartman AB, Oaks EV, Venkatesan MM. Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. *Infect. Immun*. 1999. 67: 3437-3443.
32. Cyr SL, Angers I, Guillot L, Stoica-Popescu I, Lussier M, Qureshi S, et al. TLR4 and MyD88 control protection and pulmonary granulocytic recruitment in a murine intranasal RSV immunization and challenge model. *Vaccine*. 2009. 27(3): 421-430.
33. d'Hauteville H, Khan S, Maskell DJ, Weintrauh A, Mathison J, Ulevith RJ, et al. Two msb B genes encoding maximal acylation of lipid A are required for invasive *Shigella flexneri* to mediate inflammatory rupture and destruction of the intestinal epithelium. *J. Immunol*. 2002. 168: 5240-5251.
34. d'Hauteville H, Sansonetti PJ. Phosphorilation of Ics A by cAMP-dependent protein kinase and its effect on intracellular spread of *S.flexneri*. *Mol. Microbiol*. 1992. 6(7):883-841.
35. De Geyber C, Vogt B, Benjelloun-Touimi Z, Sansonetti PJ., Ruyschaert J, Parsot C et al. Purification of IpaC, a protein involved in entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells and characterization of its interaction with lipid membranes. *FEBS Letters*. 1997. 400:149-164.
36. De Geyber C, Wattiez R, Sansonetti PJ, Falmagne P, Ruyschaert JM, ParsoC t, et al. Characterization of the interaction of UpaB and IpaD, proteins required for entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells, with a lipid membrane. *Eur. J. Biochem*. 2000. 267: 5769-5776.
37. De-Qi X, Cisar JO, Ambulos N, Burr DH, Kopecko DJ. Molecular cloning and characterization of genes for *Shigella sonnei* form I O Polysaccharide: proponed biosynthetic pathway and stable expression in a live *Salmonella* vaccine vector. *Infect. Immun*. 2002. 70: 4414 -4423.
38. Dinari G, Hale TH, Austin SW, Formal SB. Local and systemic antibody responses to *Shigella* infection in Rhesus monkeys. *J. Infect. Dis*. 1987. 155: 1065-1069.
39. Dupont HL, Hornick RB, Zinder MJ, Libonati JP, Formal SB, Gangarosa EJ. Immunity in shigellosis. Response of man to attenuated strains of *Shigella*. *J. Infect. Dis*. 1972. 125: 5-11.
40. Echeverría P, Sethabutr O., Pitarangsi C. Microbiology and diagnosis of infections with *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis*. 1991.13: 220-225.
41. Eiseinstein BI. Molecular Techniques for Microbiol Epidemiology and The Diagnosis of Infectious Disease. *Inf. Dis*. 1990.161: 595-602.

42. Ferrecio CVP, Ojeda A, Cayaso M, Abrego P, Guers L, MM Levine. Epidemiologic patterns of acute diarrhoea and endemic *Shigella* infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* 1991. 134: 614-627.
43. Ferroiccio L. Elaboración de vacunas contra la shigelosis: Memorando de una reunión de la OMS. *Bulletin of the WHO.* 1996. 65: 445-446.
44. Formal SB, Hale TH, Kapfer C, Cogan JP, Snoy PJ, Cheng R et al. Oral vaccination of monkeys with an invasive *Escherichia coli* K-12 hybrid expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen. *Infect. Immun.* 1984. 46: 465-469.
45. Formal SB, Kent TH, Austin S, LaBrec EH. Fluorescent antibody and histological study of vaccinated and control monkeys challenged with *Shigella flexneri*. *J. Bacterial.* 1996. 91: 2368-2376.
46. Frasch CE. Production and Control of *Neisseria meningitides*. *Vaccines. Adv. Biotechnol. Processes.* 1990. 13: 123-145.
47. Fries LF, Montemarano AD, MalletCP, Taylor DN, Hale TL, Lowell GH. Safety and immunogenicity of a proteosome-*Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults. *Infect. Immun.* 2001. 69: 4545-4553.
48. Galdiero F, de Lero GC, Benedetto M, Galdiero N, Tufano MA. Release of cytokines induced by *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 1993. 61. 155-161.
49. Galdiero F, Tufano MA, Galdiero M, Masiello S, DiRosa M. Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 1990. 58: 183-188.
50. Gangarosa EJ, Perera DR, Mata LJ, Mendizábal-Morris C, Guzman G, Reller LB. Epidemic Shiga bacillus dysentery in Central America. 1970. II. Epidemiologic studies in 1969. *J. Infect. Dis.* 122:181-190.
51. Gary EK: Ph.D Biol 230 Microbiology Lecture Guide. Disponible: [www.cat.cc.md.us/course/bio141/lecguide/](http://www.cat.cc.md.us/course/bio141/lecguide/). (28 de febrero del 2004)
52. Gil PS. "Evaluación de las condiciones de Fermentación de una cepa de *Shigella sonnei*". Trabajo Diploma, ISPJAE Facultad de Ingeniería Química presentado para publicar. 2003.
53. Giono S, Gutiérrez L, Hinojosa AM. Manual de procedimientos para el aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* 01. Publicación Técnica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica # 10, México, DF. 1991.
54. Gómez HF, Cleary TG. *Shigella* in Feigin and Cgerry. *Textbook of Pediatric Infectious disease* Ed 4<sup>th</sup>. 1998. Vol 1 chapter 113, p. 1307-17.
55. González Y. Caracterización preliminar de un candidato a vacuna por subunidades contra el cólera. Tesis en opción al grado de Licenciado en Bioquímica. Ciudad de la Habana Instituto Finlay. 2002.
56. Grayd LD, Murria PR, Baron EJ, Faller P, Tenove, FC, Yalkin RH. *Escherichia, Salmonella, Shigella and Yersinia*. En *Manual of Clinical Microbiolgy* 6th edition USA. American Society for Microbiology Washington DC: 1995. Chapter 33. 453-454.

57. Guichon A, Hersh D, Smith MR, Zychlinsky A. Structure-function analysis of the *Shigella* virulence factor IpaB. *Journal of Bacteriology*. 2001. 183(4): 1269-1276.
58. Haimovich B, Venkatesan MM. *Shigella* and *Salmonella*: death as a means of survival. *Microbes and Infection*. 2006. 8: 568–577.
59. Hale TL, Oaks EV, Formal SB. Identification and antigenic characterization of virulence-associated plasmid-encoded proteins of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. 1985. 50: 620-629.
60. Hancock REW. Role of porins in outer membrane permeability. *J. Bacteriol*. 1987.169: 929-933.
61. Harlev JH, Ashkenazi S, Chu C, Miron D, Ramon R. Safety and immunogenicity of improved *Shigella* O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines in adults in Israel. *Infect. Immun*. 2001. 69:1351-1357.
62. Hartman AB, Powell CJ, Schulta CL, Oaks EV, Eckels KH. Small-animal model to measure efficacy and immunogenicity of *Shigella* vaccine strains. *Infect. Immun*. 1991. 59: 4075-4083.
63. Hartman AB, Van De Verg L, Collins HH, Douglas JR, Tang B, Bendiuk NO, et al. Local immune response and protection in guinea pig keratoconjunctivitis model following immunization with *Shigella* vaccines. *Infection and Immunity*. 1994. 62(2): 412-420.
64. Hartman AB, Venkatesan MM. Construction of a stable attenuated *Shigella sonnei* virG vaccine strain WRSS1, and protective efficacy and immunogenicity in the guinea pig keratoconjunctivitis model. *Infection and Immunity*. 1998. Sept. 4572 - 4576
65. Hernández A, Riverón L. Selección y evaluación de una cepa de *Salmonella Typhi* modificada genéticamente para la producción de Polisacárido Vi. Tesis Maestría. Ciudad Habana, Cuba. Instituto Finlay. 2005.
66. High N, Mounier J, Prevost MC, Sansonetti PJ. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J*. 1992. 11: 1991-1999.
67. Hoenger A, Pages JM, Fourel D, Engel A. The orientation of porins OmpF in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*. 1993. 233: 400-413.
68. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol Biol. Rev*. 1998. 62: 379-433.
69. Jennison AV, Naresh K V. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004. Vol. 28: 43-58.
70. Jin Q, Yuan Z, Xu J, Wang Y, Shen Y, Lee W, et al. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and 0157. *Nucleic Acids Res*. 2002. 30. 99: 4432-4441.
71. Kaiser AT, Islam Z, Islam MA, Dutta DK, Safa A, Ansaruzzaman M, et al. Phenotypic Genotypic Characterization of Provisional Serotype *Shigella flexneri* 1c

- and Clonal Relationship with 1a and 1b Strains Isolated in Bangladesh. *Journal Clinical Microbiology*. 2003. Vol. 41, N°1: 110-117.
72. Kaminski RW, Oaks EV. Inactivated and subunit vaccines to prevent shigellosis. *Expert Rev Vaccines*. 2009. 8(12): 1693-704.
  73. Kaminski RW, Turbyfill KR, Chao C, Ching WM, Oaks EV. Mucosal adjuvanticity of a *Shigella* invasin complex with DNA-based vaccines. *Clin. Vaccine Immunol*. 2009. 16(4): 547-586.
  74. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GC, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis*. 1985. 151: 775-782.
  75. Kato JI, KI Ito, Nakamura A, Watanabe H. Cloning of regions required for contact haemolysis and entry into LLC-Mk2 cells from *Shigella sonnei* from I plasmid virF is a positive regulator gene for these phenotypes. *Infect. Immun*. 1989. 57(5): 1391-1398.
  76. Kerekes L. Immunity of the guinea pigs eye after vaccination with *Shigella sonnei* phase I antigen. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*. 1976. 23(4): 353-358.
  77. Keusch GT, Sherwood L, Gorbach MD. Infectious diseases. International edition. 1992. 1484 -1488.
  78. Keusch GT, Venís ML. Shigellosis. Recent progress persisting problems and research issues. *Pediatric. Infect. Dis. J*. 1989. 8(10): 713-719.
  79. Khan MU, Roy NC, Islam MR. Fourteen years of shigellosis in Dhaka: an epidemiological analysis. *Int. J. Epidemiol*. 1985. 14:607-613.
  80. Kotloff KL, Herrington DA, Hale TL, Newland JW, Van De Verg L, Cogan JP. Safety, Immunogenicity and efficacy in monkeys and humans of invasive *Escherichia coli* K-12 Hybrid vaccine candidates expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen. *Infect. Immun*. 1992. 60:2218-2224.
  81. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL. Global burden of *Shigella* infections: Implications for vaccine development and implementation. *Bull WHO*; 1999. 77 (8): 651-66.
  82. Laine RO, Zeile W, Kang F, Purich DL. Southwick FS. Vinculin Proteolysis Unmasks an Acta Homolog for Actin-based *Shigella* Motility. *J. Cell Biol*. 1997. 138: 1255-1264.
  83. Lamli N K. Clearance of structural proteins during the assembly of the head of bacteria phage T4. *Nature*. 1970. 227: 680-685.
  84. Lennette Edwin H. *Manual of Clinical Microbiology* 3th edition, 1982
  85. Lépori LR. *Infecciones Bacterianas. Miniatlas, Infomédica Contenidos Médicos*, S.L. Barcelona, España. ISBN: 987-568-103-2. Depósito legal: M-10055. 2007.
  86. Levenson VJ, Mallett CP., Hale TL. Protection against local *Shigella sonnei* infection in mice by parenteral immunization with a Nucleoprotein Subcellular Vaccine. *Infection and Immunity*. July 1995. 2762-2765.

87. Li W, Liu H, Yang X, Zheng J, Wang Y, Si L. Development of prophylactic recombinant HPV 58-attenuated *Shigella* live vector vaccine and evaluation of its protective efficacy and immunogenicity in the guinea pig keratoconjunctivitis model. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2009. 41(2): 137-145.
88. Lindberg AA, Kámell A, Weintrauh A. The lipopolysaccharide of *Shigella* bacteria as a virulence factor. *Rev. Infect. Dis.* 1991. 13. Suppl. 4: S 279-284.
89. Lindberg AA, Pal T. Strategies for development of potential candidate *Shigella* vaccines. *Vaccine*. 1993. 11: 168-179.
90. Llop A, Tamargo I, Pérez M, Tamraño G, Ramirez M, Bravo L; et al. Antimicrobial resistance and microbiological surveillance in Cuba. En: Salvatierra-González R; Benguigui Y; eds. *Antimicrobial resistance in the Americas; magnitude and containment of problem*. Washington, DC: Pan American Health Organization. 2000. 111-118.
91. López EL, Prado V, O'Rayan M, Contrini M. *Shigella* and Siga toxin producing *E. Coli* causing bloody diarrhea in Latin America. In *Infect Dis Clin N AMER*. 2000. Vol 14, No. 1.
92. Lowry, OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R. A protein measurement with the folin-phenol reagent. *Biol. Chem.* 1951. 193: 265-275.
93. Lugtenberfg B. Structure and function of outer membrane proteins En: Korhonen TK, Dawes FA and Makela PH. *Enterobacterial surface antigens methods for molecular characterization*. Eds Elsevier Science Publishers (Biomedical of Division) 1985
94. Lupi, N, Bourgois A, Bernadae A, S Laboucarie, Pages JM. Immunological analysis of porin polymorphism in *Escherichia coli* B and K-12. *Mol. Immunol.* 1989. 26: 1027-1036.
95. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Biology of Microorganisms*. 8ª edición. Prentice Hall, 1997. Virilla G. *Microbiology and Infectious Diseases*. 3ª. Edición. Ed. Williams&Wilkins, 1997.
96. Magalhaes V, NC Leal, VM Melo, Marise Sobreira, Marcelo Magalhaes. Invasion of HeLa Cells by *Providencia alcalifaciens* Presumably is Plasmid-encoded. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1996. Vol 91.6.
97. Makino S, Sasakawa C, Kamata K, Yoshikawa M. A genetic determinant required for continuous reinfection of adjacent cells on large plasmid in *S. flexneri*. *Cell*. 1986. 46: 551-555
98. Mallet CP, Van De Verg L, CollinHH s, Hale T L. Evaluation of *Shigella* vaccine safety and efficacy in an intranasal challenged model. *Vaccine*. 1993. 11: 190-196.
99. Mata, L, Gangarosa E, Caceres A, Perera D, Mejicanos M. Epidemic Shiga bacillus dysentery in Central America. I. Etiologic investigations in Guatemala, 1969. *J. Infect. Dis.* 1970. 122:170-180.
100. Mathan, M.M. Morphology of rectal mucosa of patients with shigellosis. *Rev. Infect. Dis.* 1991. 164: 533-537.
101. Maurelli AT, Baudry B, d'Haudeville, Sansonetti PJ. Cloning of plasmid DNA

- sequences involved in invasion of HeLa cells by *S. flexneri*. Infect. Immun. 1985. 49: 164-171.
102. Maurelli, AT, Blckmon B, Curtis III. Loss of pigmentation of *Shigella flexneri* 2a is correlated with loss of virulence and virulence-associated plasmid. Infect. Immun. 1984. 43: 397-401.
  103. McKenzie R, Walker RI, Nabors GS, Van De Verg LL, Carpenter C, Gomes G et al. Safety and Immunogenicity of an oral, inactivated, whole cell vaccine for *Shigella sonnei*: preclinical studies and a Phase I trial. Vaccine. 2006. 24(18): 3735-3745.
  104. Ménard, R, Sansonetti, PJ, Parsot C. Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, C and D as effectors of *Shigella flexneri* entry into the epithelial cell. J. Bacteriol. 1993. 175: 5899-5906.
  105. Methner U, Barrow PA, Gregorova D, Rychlik I. Intestinal colonization-inhibition and virulence of *Salmonella* phoP, rpoS and ompC deletion mutants in chickens. Veterinary Microbio. 2004. 98:36-43.
  106. Miranda G, Riverón L. Estudio preliminar de la fermentación de una cepa de *Salmonella Typhi* modificada genéticamente para la producción de polisacárido Vi. Tesis de Maestría. Ciudad Habana. Instituto Finlay. 2006.
  107. Mota MI; Varela G; Gadea MP; Caffer MI; Sirok A; Schelotto F. Serotipos perfil plasmídico y antibiotipos de cepas de *Shigella flexneri* aisladas de niños menores de 5 años con diarrea sanguinolenta usuarios de los servicios de Salud Pública. Rev. Med. Uruguay. 2005. 21: 30-36.
  108. Mounier, J, Bahrani FK, Sansonetti PJ. Secretion of *Shigella flexneri* Ipa cells are growth stage dependent. Infect. Immun. 1997. 65: 774-782.
  109. Mukhopadhaya A, Mahalanabis D, Chakrabarti MK. Role of *Shigella flexneri* 2a 34kDa outer membrane protein in induction of protective immune response. Vaccine. 2006. 24(33-34): 6028-36.
  110. Mukhopadhaya A, Mahalanabis D, Khanam J, Chakrabarti MK. Protective efficacy of oral immunization with heat-killed *Shigella flexneri* 2a in animal model; study of cross protection, immune response and antigenic recognition. Vaccine 2003. 21: 3043-3050.
  111. Neglia TG, Marr TJ, Davis ST. *Shigella* dysentery with secondary *Klebsiella* sepsis. J. Pediatr. 1976. 63:253-254.
  112. Nikaido H, Nkoe T. The outer membrane of gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. 1979. 20: 163-170.
  113. Niyogi SK. Shigellosis. J Microbiol. 2005. 43(2): 133-43.
  114. Noriega FR, Fang ML, Maneval DR, Ren S, Formal SB, Levine MM. Strategy for cross-Protection among *Shigella flexneri* eerotypes. Infection and Immunity. 1999. 782-788.
  115. Oaks EV, Turbyfill.KR. Development and evaluation of a *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei* bivalent invasin complex (Invaplex) vaccine. Vaccine. 2006. 24: 2290-2301.

116. Olarte J, Galindo E, Formal S B. Serotypes of *Shigella flexneri* found in children in Mexico City. Bol. Sanit Panam. 1959. 47: 507-508.
117. Orr N, Robin G, Cohen D, Arnon R, Lowell GH. Immunogenicity and efficacy of oral or intranasal *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei* proteosome-lipopolysaccharide vaccine in animal models. Infection and Immunity. 1993. Vol. 61. N°6: 2390-2395.
118. Osborn MJ. Studies on the Gram negative cell in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1963. 50: 499-506.
119. Pál T, Newland J, Tall BD, Formal SB, Hale TH. Intracellular spread of *Shigella flexneri* associated with the kcpA locus and a 140 KDa protein. Infect. Immun. 1989. Vol 57 No2: 477-486.
120. Parsot C, Bahrani FK, Sansonetti PJ. Secretion of Ipa Proteins by *Shigella flexneri*: Inducer molecules and kinetics of activation. Infect. Immun. Oct. 1997. 4005-4010.
121. Parsot C, Menard R, Gounon P, Sansonetti PJ. Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa transcolon leads to assembly of intracellular proteins into macromolecular structure. Mol. Microbiol. 1995.16: 291-300.
122. Passwell JH, Harlev E, Ashkenazi S, Chu C, Miron D, Ramos R, et al. Safety and immunogenicity of improved *Shigella* O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines in adults in Israel. Infect. Immun. 2001. 69: 1351-1357.
123. Paz MF et al. Polysaccharide production in batch process of *Neisseria meningitidis* serogroup C comparing Frantz, modified Frantz and Cartlin 6 cultivation media. Braz. J. Microbiol. [online]. 2003. Vol. 34. N° 1: 27-32. ISSN 1517-8382)
124. Pérez M, Herrera L, Moya T, Campos M. Análisis epidemiológico de los principales microorganismos aislados, de heces en el Hospital Nacional de Niños, Dr. Carlos Sáenz Herrera Enero de 1 995 - abril de 2003. Rev. Méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) 2003. V.38 N°1-2 San José.
125. Phalipon A, Barzu S, Arindel J, Guillot S. Immunogenicity of IpaC-Hybrid proteins expressed in the *Shigella flexneri* 2a Vaccine Candidate SC602. Infect Immun. Jan 1998: 77-82.
126. Phalipon A, Mulard LA, Sansonetti PJ. Vaccination against shigellosis: is it the path that is difficult or is it the difficult that is the path?. Microbes Infect. 2008. 10(9): 1057-62.
127. Phalipon A, Tanguy M, Grandjean C, Guerreiro C, Bélot F, Cohen D. et al. A synthetic carbohydrate-protein conjugate vaccine candidate against *Shigella flexneri* 2a infection. J. Immunol. 2009. 182(4): 2241-47.
128. Pharmacia LKB: Gel filtration. Principle and methods. 1993
129. Philpott DJ, Edgeworth JD, Sansonetti PJ. The pathogenesis of *Shigella flexneri* infection: lesions from *in vitro* and *in vivo* studies. Phil. Trans. R. Soc. Land. B. 2000. 355: 575-586.
130. Plotkin SA. Vaccine in the 21 St Century. Infect Dis Clin North Am. 2001. 15: 307-327

131. Pore D, Chowdhury P, Mahata N, Pal A, Yamasaki S, Mahalanabis D, et al. Purification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of *Shigella flexneri* 2a. *Vaccine*. 2009. 27(42): 5855-64.
132. Purdy GE, Payne SM. The SHI-3 iron transport island of *Shigella boydii* O-1392 carries the genes for aerobactin synthesis and transport. *J. Bacteriol.* 2001. 183: 4176-4182.
133. Ramirez M, Alina LI. Resistencia antimicrobiana de las cepas de *Shigella* aisladas en Cuba. Marcadores epidemiológicos moleculares asociados. Tesis Doctoral. Ciudad Habana. Cuba. Instituto de Medicina tropical "Pedro Kouri". 2008.
134. Ramirez M, Bravo L, García B, Monté R. Estudio de la susceptibilidad de cepas de *Shigella* aisladas de niños con enfermedad diarreica. *Enfer. Inf. Microbiol.* 1996. 16(2): 112-115.
135. Ranallo RT, Thakkar S, Chen O, Venkatesan MM. Immunogenicity and characterization of WRSF2G11: a second generation live attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain. *Vaccine*. 2007. Mar 8. 25 (12): 2269-2278.
136. Rathman, M, Ohayon H, Gouman P, Sansonetti PJ. Myosin light chain kinase plays an essential role in *S. flexneri* dissemination. *J. Cell Sci.* 2000. 113: 3375-3386.
137. Rathman, MM, Khan MM, Aziz S, Islam MS, Kibriya AK. An outbreak of dysentery caused by *Shigella dysenteriae* type 1 on a coral island in the Bay of Bengal. *J. Infect. Dis.* 1975. 132:15-19.
138. Reed LJ, Muench H. "A simple method of estimating fifty percent endpoints". *The American Journal of Hygiene* 1938. 27: 493-497.
139. "Requisitos para la Evaluación del Desempeño de Diagnosticadores. CECMED. Resolución N°. 47-2007.
140. Rivera – Matos IR, Cleary TG. Footborne and waterborne illness in children. *Adv. Pediat Infect Dis.* 1996. Vol 1.
141. Robbins JB, Kubler-Kielb J, Vinogradov E, Mocca C, Pozgay V, Shiloach et al. Synthesis, characterization, and immunogenicity in mice of *Shigella sonnei* O-specific oligosaccharide-core-protein conjugates. *Proc Natl Sci USA.* 2009. 106(19): 7974-7978.
142. Rosenbrock HH. An automatic method for finding the greatest or least value of a function. *The Computer Journal.* 1960. Vol. 3. 3: 175-184.
143. Rosenbusch JP. Characterization of the major enveloped protein from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1974. 249: 8019-8029.
144. Rossi MA, Galas M, Terragno R, Tokumoto M, Guelfand L, Caffer MI, et al. Abstracts of International Congress on Infectious Diseases. 1: 89. WHONET- Capital Federal, Argentina. Argentina Collaborative Group, Inst. Nacional de Enfermedades Infecciosas, National network. 2000.
145. Roy S, Das AB, Biswas T. Purification pore-forming ability and antigenic relatedness of the Major Outer Membrane Protein of *Shigella dysenteriae* type 1. *Infect. Immun.*

1994. 62(10):4333-4338.
146. Sack RB, Rahman M, Yunus M, Khan EH. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrhoeal disease. *Clin. Infect. Dis.* 1997. 24: S 102-5.
  147. Said H, Phalipon A, Tanguy M, Guerreiro C, Bélot F, Frisch B et al. Rational design and immunogenicity of liposome-based diepitope constructs: application to synthetic oligosaccharides mimicking the *Shigella flexneri* 2a O-antigen. *Vaccine.* 2009. 27(39): 5419-5426.
  148. Sakai T, Sasakawa C, Makino S, Kamata K, Yoshikawa M. Molecular cloning of a genetic determinant for Congo Red binding ability which is essential for the virulence of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 1986. 51:476-482.
  149. Sakai T, Sasakawa C, Yoshikawa M. Expression of four virulence antigens of *S. flexneri* is positively regulated of the transcriptional level by the 30 KDa virF protein. *Mol. Microbiol.* 1988. 2: 589-597.
  150. Salyers AA, Whitt DD. *Shigella*. In: *Bacterial Pathogenesis: A molecular approach*. 2ed. American Society for Microbiology, 2001.
  151. Sánchez O. "Resultados preliminares de la obtención y caracterización de complejos PME-LPS de *Shigella sonnei*". Trabajo Diploma, UH. Facultad de Biología. Presentado para publicar 2004.
  152. Sankarán, K, Ranachandran V, Subrahmanyam YVBK, Rajarathnam S, Elango S. Congo Red-mediated regulation of levels of *Shigella flexneri* membrane proteins. *Infect. Immun.* 1989. 57(8): 2364-2371.
  153. Sansonetti P, Phalipon A. Shigellosis: from molecular pathogenesis of infection to protective immunity and vaccine development. 67<sup>th</sup> forum in immunology. 1993. 23: 595-602.
  154. Sansonetti PJ, C Parsot. Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J. Bacteriol.* 1993. 175: 5899-5906.
  155. Sansonetti PJ. Pathogenesis of Shigellosis. *Current topics in Microbiology and immunology.* 1992. 180: 1-143.
  156. Sasakawa C, Kamata K, Sakai T, Murayama SY, Makino S, Yoshikawa M. Molecular alteration 140 MDa plasmid associated with the loss of virulence and Congo Red binding activity in *S. flexneri*. *Infect. Immun.* 1986b. 51: 470-475.
  157. Schaetti C. Vaccines for enteric diseases: update on recent developments. *Expert Review of Vaccines.* 2009. Vol. 8, Nº12: 1653-55.
  158. Sereny B. Experimental Keratoconjunctivitis shigellosis. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 1957. 4: 367-376.
  159. Shamlal R. Detection of virulent *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by induction of the 43 kDa invasion plasmid antigen, IpaC. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 1997.17: 73-78.

160. Shim DH, Suzuki T, Park SM, Sansonetti PJ, Sasakawa C, Kweon MN. New animal model of shigellosis in the Guinea pig: its usefulness for protective efficacy studies. *J Immunol.* 2007 Feb 15. 178 (4): 2476-82.
161. Stein-Streilein. J. Immunobiology of lymphocytes in the lung. *Reg. Immunolog.* 1988. 1: 128-136.
162. Sudipta RA, Das AB, Ghosh AN, Biswas T. Purification, pore-forming ability, and antigens relatedness of the major outer membrane protein of *Shigella dysenteriae* type 1. *Infect. Immun.* 1994. 62: 10: 4333-4338.
163. Swing EPW. Identification of Enterobacteriaceae. Burgués Publishing Co., Minneapolis, Minn. 1972.
164. Tapiopalva E. Regulation of outer membrane proteins En: Korhonen TK, Dawes FA and Makela PH. Enterobacterial surface antigens methods for molecular characterization. Eds. Elsevier Science Publishers (Biomedical of Division) 1985.
165. Taylor DN, Trofa AC, Sadoff J, Chu C, Bryla D, Shiloach J, et al. Synthesis characterization, and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of the O-specific polysaccharides of *Shigella dysenteriae* type 1, *Shigella flexneri* type 2a, and *Shigella sonnei* (*Plesiomonas shigelloides*) bound to bacterial toxoids. *Infect. Immun.* 1993. 61: 3678-3687.
166. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. [...//sections.htm](#), Section 13. Infectious Diseases. [./sec13.htm](#), Chapter 157. Bacterial Diseases.
167. Ticket CO, Mason HS, Losonky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen J. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med.* 1998. 4: 607-609.
168. Torres ME, Pirez MC, Zchelotto F, Varela G, Parodi V, Allende F, et al. Etiology of children's diarrheic in Montevideo. Uruguay; associated pathogens and unusual isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2001. 39: 2134 – 2139.
169. Tsang, VC, Peralta JM, Semmons AR. Enzyme-linked immunoelectro transfer blot-techniques (EITB) for studying the specificity of antigen and antibody separation by gel electrophoresis. *Methods Enzimol.* 1983. 92: 377-391.
170. Turbyfill KR, Hartman AB, Oaks EV. Isolation and characterization of a *Shigella flexneri* invasive complex subunit vaccine. *Infect. Immun.* 2000. 68:6624-6632.
171. Turbyfill KR, Kaminski RW, Oaks EV. Immunogenicity and efficacy of highly purified invasion complex vaccine from *Shigella flexneri* 2a. *Vaccine.* 2008. 26(10): 1353-64.
172. Turbyfill KR, Mertz JA, Mallet CP, Oaks EV. Identification of epitope and surface-exposed domains of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigen D (IpaD). *Infect. Immun.* 1998. 66: 1999-2006.
173. Vaca L. Manual de Histoquímica. Barcelona: Ediciones Doyma; 1985
174. Valdés – Dapena M. Microbiología y Parasitología Médicas. Ecimed. Cuba. 2001. 251-287.

175. Van De Verg LL, Mallet CP, Collins HH, Larsen T, Hammack C, Hale TL. Antibody and cytokine responses in a Mouse pulmonary model of *Shigella flexneri* serotype 2<sup>a</sup> infection. *Infect. Immun.* 1995. 63: 1947-1954.
176. Vandeoutte-Rutten L, Kramer R A, Kroon J, Dekker N, Egmond MR, Gros P. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *The EMBO Journal.* 2002. 20: 5033-5039.
177. Varela G, Schelotto F, Pais MC, Dell'Acqua L, Zanetta E, Maglioine R, et al. Diarrea con sangre y Síndrome Hemolítico Urémico. Diagnostico Microbiológico en Montevideo. Uruguay XVIII Jornadas Uruguayas de Pediatría 1991 y 11 Congreso Latinoamericano de Microbiología 1991.
178. Vasselon T, Mounier J, Prevost MC, Hellio R, Sansonetti PJ. Enterobacterial surface antigens methods for molecular characterization. *Infect. Immun.*1991. 59(5): 1723-1732.
179. Vedros NA. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* Vol 1, pp 209-303. 1984.
180. Venkatesan M.M, Buysse M, Vandendries E, Kopecko DJ. Development and testing of invasion- associated DNA probes for detection of *Shigella spp.* and enteroinvasive *E.coli.* *Clin. Microbiol.* 1988. 26: 261-266.
181. Venkatesan, MM, Bussy JM, Kopecko DJ. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipa BCD) from *S. flexneri.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. 85: 9317-9321.
182. Virell G. *Microbiology and Infectious Diseases.* 3a edición. Ed. Williams & Wilkins, 1997.
183. Voino-Yasenetskoya M.K, Voino-Yasenetskoya MV. Intranasal challenge of laboratory animals with *Shigella* (the *Shigella* lung model), p. 114-125. In M.V. Voino-Yasenetskoya TB (ed). *Pathogenesis of intestinal infections.* Akademiai Kiado, Budapest. 1977.
184. Votruba J, Pilát P, Prokop A. Application of modified Rosenbrock's method for optimisation of nutrient media used in microorganism culturing. *Biotechnology and Bioengineering.* December 1975. Vol. 17. 12: 1833-1837.
185. Wassef J, Karen DF, Mailloux JL. Role of M cells in initial bacterial uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model in shigellosis. *Infect. Immun.* 1989. 57: 858-863
186. Watanabe H, Arakawa E, Ito K, Kato JI. Genetic analysis of an invasion region by use of Tn-3 lac transposon and identification of a second positive regulator gene, *inv E*, for cell invasion of *Shigella sonnei* significant homology of *InvE* with *ParB* of plasmad P1. *J. Bacteriol.* 1990. 172: 619-629.
187. Watanabe H, Nakamura A. Large plasmids associated with virulence in *Shigella* species have a common function necessary for epithelial cell penetration. *Infect. Immun.*1985. 48(1):260-262.
188. Watarai, M, Funato S, Sasakawa C. Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri*

- with alfa5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. J.Exp. Med. 1996. 183: 991-999.
189. Wel J, Goldberg MB, Burland V, Venkatesan MM, Deng W, Fournier G, et al. Complete genomic sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2<sup>a</sup> strain 2457T. Infect. Immun. 2003. 71: 2775-2786.
  190. Westphal O, Jam K. Methods in carbohydrate chemistry. Academia Press. Inc. New Cork. 1965. 5: 83-91.
  191. Word PK, Morris GO, Pamela LC. Comparison of DNA probes and the Sereny Test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. Journal of Clinical Microbiology. Sept 1986.498.500.
  192. World Health Organization. [Future needs and directions for Shigella vaccines. Background information and rationale for the meeting.](#) Wkly Epidemiol Rec. 2006. 81: 51-58.
  193. Yang XF, Zhou L, Zheng J, Si LS, Wang YL. Construction and characterization of a live attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain, sf301 Delta VirG and dsbA33G. Wei Sheng Wu Xue Bao. 2005. 45(5): 748-52.
  194. Zhong, QP. Pathogenic effects of O-polysaccharide from *Shigella flexneri* strain. World J. Gastroenterol. 1999. 5: 245-248.
  195. Zuzuki T, Yoshikawa Y, Ashida H, Iwai H, Toyotome T, Matsui H, et al. High vaccine efficacy against shigellosis of recombinant noninvasive *Shigella* mutant that express *Yersinia* invasins. J. Immunol. 2006 oct 1. 177 (7):4709-4717
  196. Zwadyk P. Chapter 35. Enterobacteriaceae: *Salmonella* and *Shigella*. Intestinal Pathogens. En Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfred CM. Zinsser Microbiology 20th edition Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut/San Mateo, California USA: 1992. 556-565.
  197. Zychlinsky A, Kenny B, Ménard R, Prévost MC, Holland IB, Sansonetti PJ. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. 1994. 11: 619-627.
  198. Zychlinsky A, Fitting C, Cavalliaion J. Sansonetti PJ. Interleukin-1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. J. Clin. Invest. 1996. 94: 1328-1332