



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DISTRIBUCIÓN DE ENTEROTOXINAS SHET1 Y SHET2 EN  
CEPAS DE *Shigella flexneri* y *shigella sonnei* AISLADAS DE  
NIÑOS CHILENOS CON CUADRO DIARREICO**

**MARIBEL LORCA GONZÁLEZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de **Medicina Preventiva**  
**Animal.**  
**Programa de Microbiología Instituto de**  
**Ciencias Biomédicas.**

**PROFESOR GUÍA: DR. CECILIA TORO UGALDE**

**SANTIAGO, CHILE**  
**2004**



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
DE CIENCIAS VETERINARIAS

## DISTRIBUCIÓN DE ENTEROTOXINAS SHET1 Y SHET2 EN CEPAS DE *Shigella flexneri* y *shigella sonnei* AISLADAS DE NIÑOS CHILENOS CON CUADRO DIARREICO

MARIBEL LORCA GONZÁLEZ

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina Preventiva  
Animal.  
Programa de Microbiología Instituto de  
Ciencias Biomédicas.

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. CECILIA TORO UGALDE	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DRA. M. LUISA SÁNCHEZ	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: SR. MARCO GALLEGUILLOS	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2004

*Esta tesis fue financiada por el proyecto DID ENL 02/21.*

# INDICE

	Página
• ABREVIATURAS	
• RESUMEN	
• SUMMARY	
• INTRODUCCIÓN _____	1
• REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA _____	3
• HIPÓTESIS _____	8
• OBJETIVOS _____	8
Objetivo general _____	8
Objetivos específicos _____	8
• MATERIAL y MÉTODOS _____	9
1. Cepas _____	9
2. Subserotipos de <i>Shigella flexneri</i> _____	9
3. Detección de los genes <i>set1</i> y <i>sen</i> _____	10
4. RT – PCR _____	12
a. Obtención de ácidos nucleicos totales _____	12
b. Obtención de ácidos ribonucleico total _____	13
c. Síntesis del ADN complementario _____	13
d. Amplificación de los fragmentos de ADNc de los genes <i>set1</i> y <i>sen</i> _____	13
5. Análisis estadístico _____	14
• RESULTADOS _____	15
1. Detección de los genes de las enterotoxinas de <i>Shigella</i> _____	15
2. Detección del plasmidio de virulencia _____	19
3. Prevalencia de los subserotipos de <i>S. flexneri</i> _____	20
4. Asociación de las enterotoxinas con los subserotipos de <i>S. flexneri</i> _____	21
5. Extracción de Ácidos Nucleicos totales y Ácidos Ribonucleicos _____	23
6. Análisis de la expresión de las enterotoxinas <i>ShET1</i> y <i>ShET2</i> _____	23
• DISCUSIÓN _____	24
• CONCLUSIONES _____	27
• REVISIÓN BIBLIOGRÁFIA _____	28

## Abreviaturas

<b>ADN(DNA)</b>	<i>Ácido Desoxi Ribonucleico</i>
<b>ARN (RNA)</b>	<b>Ácido Ribonucleico</b>
<b>CTAB</b>	<i>Hexadeciltrimetilamonio</i>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido Etileno Diamino Tetra Acético</b>
<b>DEPC</b>	<b>Dietilpirocarbonato</b>
<b>dNTPs</b>	<b>Desoxinucleótido Trifosfato</b>
<b>IL-1</b>	<b>Interleukina 1</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilo Dalton</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolisacárido</b>
<i>mM</i>	<i>mili Molar</i>
<b>pb</b>	<b>pares de bases</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>
<b>pM</b>	<b>pico Molar</b>
<i>RNA 16S</i>	<i>RNA ribosomal 16S</i>
<i>rpm</i>	<i>revoluciones por minuto</i>
<i>RT-PCR</i>	<i>Reacción de Transcriptasa Reversa asociada a la reacción en cadena de la Polimerasa</i>
<b>ShET1</b>	<b>Enterotoxina de <i>Shigella</i> 1</b>
<b>ShET2</b>	<b>Enterotoxina de <i>Shigella</i> 2</b>
<b>TSB</b>	<b>Tripticase Soy Broth</b>
<b>TAE</b>	<i>Tris Acetato EDTA</i>
<b>UV</b>	<i>Ultravioleta</i>
<b>μL</b>	<b>micro Litro</b>

## Resumen

*Shigella* spp. es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, intracelular facultativa, responsable de la disentería bacilar en el ser humano.

Al año ocurren más de un millón de muertes producto de infecciones por *Shigella* spp., donde la mayoría de los afectados son niños de países subdesarrollados (Philpott *et al*, 2000). La patogénesis de *Shigella* radica en su capacidad de invadir el epitelio intestinal, gatillando una inflamación aguda con ulceración de la mucosa intestinal y la producción de abscesos (Goldberg *et al*, 1993). La fase inicial del cuadro, en muchos pacientes, puede presentarse con una diarrea acuosa que puede o no continuar con disentería. Se han descrito dos factores de virulencia que serían responsables de esta diarrea acuosa: enterotoxinas de *Shigella* 1 y 2 (ShET1 y ShET2) (Vargas *et al*, 1999). El objetivo del presente trabajo es determinar la distribución de ShET1 y ShET2 en dos especies de *Shigella*: *S. flexneri* y *S. sonnei* aisladas de niños con cuadro diarreico (en un período estival entre 1999-2002). Durante este período se recolectaron 170 muestras, de las cuales se analizaron 104 cepas (51 cepas de *S. flexneri* y 53 cepas de *S. sonnei*). Se determinó la presencia de los genes de las enterotoxinas mediante la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con partidores específicos. De las cepas estudiadas, 52 (50 %) presentaron 1 o ambos genes que codifican para dichas enterotoxinas, de las cuales 7 cepas (6,7 %) de *S. flexneri* poseían el gen de ShET1, 25 (23,9 %) el gen de ShET2, y 20 (19,2 %) presentaron ambos genes de las enterotoxinas. De las cepas de *S. sonnei* 16 (15,3 %) presentaron el gen de ShET2.

## Summary

*Shigella* spp. is a Gram negative bacteria that belong to the *Enterobacteriaceae* family, facultative anaerobic, cause bacillary dysentery in humans.

More than one million deaths occur each year by shigellosis infections, and children from developing countries are the most infected (Philpott *et al*, 2000). The pathogenesis is characterized by invading the colonic mucosa triggering an intense inflammatory response with ulceration and abscess formation (Goldberg *et al*, 1993). In an initial phase, numerous patients exhibit watery diarrhea that may or may not followed by dysentery. There are *Shigella* enterotoxins 1 and 2 (ShET1 and ShET2, respectively) (Vargas *et al*, 1999). The aim of the present study is to determine the distribution of ShET1 and ShET2 in two *Shigella* species: *S. flexneri* and *S. sonnei* isolated from children with diarrhea, on a warm period between 1999 and 2002. During this period 170 samples were collected, 104 samples were chosen (51 *S. flexneri* strains and 53 *S. sonnei* strains). The detection of ShET1 and ShET2 genes was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique with specific primers. Among strains studied 52 (50 %) presented one or both enterotoxins genes, 7 (6.7 %) *S. flexneri* strains presented ShET1, 25 (23.9 %) presented only ShET2, and 20 (19.2 %) presented both enterotoxins. 16 (15.4 %) *S. sonnei* strains presented ShET2 gene.

## INTRODUCCIÓN

La diarrea es, después de las enfermedades respiratorias, la causa más común de consulta pediátrica. Se entiende como diarrea un cambio en las características y número de evacuaciones.

Las infecciones por *Shigella* representan una de las principales causas de diarrea aguda junto con *Escherichia coli* enteropatógena clásica, *E. coli* enterotoxigénica, rotavirus y *Campylobacter* spp. Todas las especies de *Shigella* son consideradas patógenas, con distinto grado de virulencia, produciendo principalmente un cuadro diarreico. Se diseminan por vía fecal-oral, por la contaminación de las manos y manipulación de alimentos, relacionándose con condiciones inadecuadas de higiene; por ello es más frecuente en países subdesarrollados.

La infección por *Shigella* spp. es un problema serio de morbilidad y mortalidad especialmente en niños de países subdesarrollados. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que mueren de shigelosis 1,1 millones de niños al año. En Chile es responsable del 4-12 % de los casos de diarrea aguda y el 30 % de las diarreas con sangre en niños menores de 5 años.

La shigelosis se caracteriza por producir fiebre, dolor intestinal, y diarrea mucopurulenta o sanguinolenta. La habilidad de *Shigella* para invadir y colonizar el epitelio intestinal es una clave importante para el establecimiento de la enfermedad .

La toxigenicidad de *Shigella* spp. radica en la elaboración de endotoxinas correspondiente al lipopolisacárido (LPS), y de enterotoxinas de las cuales se conocen la toxina Shiga, ShET1 y ShET2. Las enterotoxinas ShET1 y ShET2 actuarían a nivel de intestino delgado produciendo alteración en el transporte de agua y electrolitos, sin dañar mayormente el intestino. Esto generaría una diarrea acuosa, responsable de la fase inicial del cuadro clínico, lo cual permitiría la movilización de la bacteria hacia el intestino grueso continuando de esta forma el curso de la enfermedad.

Hasta el momento no existe información acerca de la distribución de las enterotoxinas ShET1 y ShET2 en cepas de *Shigella* spp. aisladas en pacientes

chilenos y nuestro propósito es aportar información que contribuya a caracterizar mejor las cepas de *Shigella* spp. que circulan en Chile. Esto permitirá entender mejor la epidemiología y presentación clínica de esta infección.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las diarreas son una importante causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, siendo la cuarta causa de muerte entre todas las enfermedades y la segunda en la pérdida de productividad debido a mortalidad temprana ( Kotlof *et al*, 1999). En los últimos años, *Shigella* ha tenido gran impacto como patógeno entérico y además existe preocupación por su capacidad de adquirir resistencia a los antimicrobianos.

Se ha estimado que cada año en el mundo los episodios de shigelosis corresponden a 164,7 millones, de los cuales 163,2 millones ocurren en países subdesarrollados y 1,5 millones en países industrializados. La mortalidad total asociada a *Shigella*, entre las personas que habitan en los países en desarrollo, se estima en 1,3 millones. Los niños menores de 5 años son los más afectados (69 %), con una mortalidad de 61 %. La muerte por shigelosis es rara en países desarrollados, pero sí pueden producirse brotes en centros institucionales y jardines infantiles, pudiendo afectar además a viajeros y soldados (Kotlof *et al*, 1999).

La shigelosis es producida por cuatro especies de *Shigella* llamadas: *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, y *S. sonnei*. Algunos serogrupos contienen múltiples serotipos basados en la estructura del antígeno O, componente del lipopolisacárido perteneciente a la membrana externa de la pared celular. En zonas donde la enfermedad es endémica *S. flexneri* es usualmente la especie más prevalente. De los 47 serotipos que se describen en *Shigella*, 15 pertenecen a *S. flexneri* subdivididos en subserotipos. Además existen subserotipos nuevos y provisionales en *S. flexneri*. No obstante, este esquema de clasificación para *S. flexneri* no es del todo comprensible, ya que se están aislando cepas atípicas o nuevos subserotipos en distintos lugares del mundo ( Talukder *et al*, 2003).

En países industrializados, la especie de *Shigella* aislada con mayor frecuencia es *S. sonnei*, la cual se presenta en jardines infantiles, centros de cuidados de

ancianos, hospitales psiquiátricos y también en homosexuales que padecen de colitis o proctocolitis (Pidal *et al*, 1999).

*Shigella dysenteriae* tipo 1 es el serotipo de mayor virulencia, de poca frecuencia en el continente americano. *S. boydii* ha quedado confinada a la región de la India, aislándose esporádicamente en otras áreas (Pidal *et al*, 1999).

En América Latina en cambio predominan *S. flexneri* y *S. sonnei*. En Chile, del total de las infecciones por *Shigella* spp alrededor del 25 % se asocia a síndrome disentérico, donde *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a y *S. flexneri* 6 constituyen más del 80 % de los serotipos aislados (Pidal *et al*, 1999).

La incidencia de diarrea muestra una estacionalidad marcada en todos los grupos etarios, alcanzando las mayores tasas en los meses cálidos: diciembre a febrero en nuestro hemisferio.

La duración del cuadro diarreico, en promedio, es alrededor de 7,3 días, con 24 % de los episodios de menos de 4 días y el 10,1 % de más de 14 días (Ferreccio *et al*, 1991).

*Shigella* representa entre un 3 a 8 % de los casos de diarrea aguda y un 22 a 30 % en casos de diarrea con sangre en niños menores de cinco años de edad; a nivel de vigilancia domiciliaria, corresponde a un 4-8 %. En un estudio de vigilancia en Santa Julia, comuna semi rural de la Región Metropolitana, se encontraron incidencias de *Shigella* spp. cercanas al 8 % de los episodios con visitas domiciliarias; 10 % en vigilancia pasiva a nivel de consultorios y 13 % en niños hospitalizados. En dicho estudio se comprobó que el 31,5 % de los casos de shigelosis correspondían a disentería manifiesta. (Ferreccio *et al*, 1991). En otra vigilancia realizada en los períodos de 1995 a 1998 en un consultorio de Colina y Esmeralda, del total de niños con diarrea, el 6,4 % correspondieron a *Shigella*; de estos el 3,4 % correspondieron a *S. flexneri*, 2,8 % a *S. sonnei* y un 0,1 % a *S. boydii*. Los más afectados fueron niños entre 12 y 47 meses de edad (Prado *et al*, 1999).

La infección por *Shigella* ocurre sólo en el ser humano y primates. Es transmitida por el contacto directo entre personas (vía oro-fecal), donde la higiene está comprometida, principalmente en jardines infantiles e instituciones psiquiátricas.

(Ferreccio *et al*, 1991), otra vía de contagio indirecta es por el alimento, aguas contaminadas y moscas (Prado *et al*, 1999).

La shigelosis es una de las pocas enfermedades entéricas donde el uso de antibióticos favorece la evolución del hospedero, porque disminuye la severidad y acorta el período de duración del cuadro; sin embargo la resistencia de la bacteria a los antimicrobianos es un fenómeno mundial. Estudios de susceptibilidad antimicrobiana desarrollados en Asia, África, Centro América, Europa y Norte América, han mostrado niveles elevados de resistencia de *Shigella* a diversos antibióticos, dentro de los que destaca ampicilina, cotrimoxazol y cloranfenicol, que alcanzan en algunas comunicaciones, cifras de hasta 100, 96 y 65 % respectivamente, mostrando además un importante número de cepas multirresistentes. (Prado *et al*, 1998).

En otro estudio realizado un año más tarde por Pidal *et al* (1999), a nivel nacional se detectó resistencia al cloranfenicol en el 81 % de cepas de *S. sonnei* y 52 % para *S. flexneri*; para ampicilina en *S. sonnei* fue de 91 % y 87 % para *S. flexneri*. A cotrimoxazol fue de 76 % para *S. flexneri* versus 21 % de *S. sonnei*. No se observó resistencia al ciprofloxacino y un nivel muy bajo para furazolidona, probablemente por su uso limitado en el tratamiento de la shigelosis.

*Shigella* invade la mucosa del intestino grueso del humano produciendo la disentería bacilar, es altamente infecciosa, ya que su dosis infectante es de 10-100 microorganismos (Fasano *et al*, 1997). El cuadro se caracteriza por producir fiebre, diarrea acuosa, dolor intestinal y deposiciones mucopurulentas y sanguinolentas (Philpott *et al*, 2000). Sin embargo, la mayoría de los pacientes desarrollan una fase inicial de diarrea acuosa, que en casos leves puede presentarse como signo clínico único. Además se han descrito convulsiones, megacolon, reacción leucemoide, síndrome hemolítico urémico, infección urinaria, perforación intestinal, peritonitis y septicemia (Sansonetti, 2001; Anatoliaki *et al*, 2003).

La patogénesis comienza en una etapa temprana, cruza la barrera intestinal a nivel del epitelio asociado a folículos de las células M, que cubre la mucosa asociado a folículos linfoides, estimulando la respuesta inmune. La propiedad de esta bacteria de invadir el epitelio y generar una respuesta inmune, permite la expresión de su

fenotipo ante los distintos tipos celulares, éstas son: células M, células epiteliales, macrófagos, polimorfonucleares, permitiendo la invasión, inflamación y destrucción de la barrera intestinal (Sansoneetti, 2001). Los macrófagos fagocitan la bacteria pero en vez de ser ésta destruida, el macrófago muere por apoptosis. Antes de la muerte del macrófago, éste libera IL-1, que recluta polimorfonucleares que desestabilizan el epitelio, perdiéndose así la integridad, permitiendo que más bacterias atraviesen al espacio subepitelial por medio de la vía basolateral. Luego *Shigella* puede invadir células del colon y diseminarse a lo largo del tejido. Las citoquinas liberadas permiten el aumento de más células inflamatorias al sitio afectado exacerbándose la respuesta inmune (Philipott *et al*, 2000).

En la mayoría de las especies de *Shigella* existe un plasmidio de virulencia de 214 kDa, que contiene los genes necesarios para la expresión del fenotipo de propagación e invasividad ( Sansoneetti, 2001)

*Shigella* spp. elabora endo y enterotoxinas; la endotoxina está contenida en su pared celular y corresponde al LPS, cuyo componente activo es el lípido A, éste está codificado en varios *loci* del cromosoma de *Shigella*, es responsable de múltiples acciones como inducir fiebre, activar el complemento, actuar en la coagulación sanguínea, activar linfocitos B, causar daño vascular *in vivo*, etc. (Bopp *et al*, 1999; Allison y Verma; 2000; Koshi *et al*, 2003). Hasta la fecha se han descrito tres enterotoxinas en el género *Shigella*, que corresponden a la toxina Shiga, ShET1 y ShET2. La toxina Shiga está descrita sólo en *S. dysenteriae* y está codificada en el cromosoma bacteriano, posee propiedades de citotoxina, enterotoxina y neurotoxina, como la toxina Shiga-like de *Escherichia coli*; su efecto enterotoxigénico se traduce en la acumulación de fluidos e inflamación de la mucosa intestinal, además en ensayos *in vivo* se describe que daña las células del endotelio vascular. Consta de una subunidad A (32,225 kDa) y cinco subunidades B (7,621 kDa) (Hale, 1991). Esta toxina, a través de la subunidad B, se une al receptor glicolipídico Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$  (galabiosa) (Hale, 1991; Koshi *et al*, 2003). La subunidad A inhibe la síntesis proteica inactivando la subunidad ribosomal 60S, deteniendo así la elongación de la cadena polipeptídica. Esta toxina se describe como neurotoxina, ya que produce parálisis y muerte en

animales de laboratorio; además, se han descrito casos esporádicos de convulsiones, jaquecas, rigidez muscular y delirio (Levine *et al*, 1973).

*Shigella flexneri* 2a, en el ensayo de asa ligada de intestino delgado de conejo elabora las enterotoxinas ShET1 y ShET2, reponsables de la diarrea acuosa producida en ese segmento, la que permitiría el transporte de la bacteria hacia la mucosa del colon. La toxina ShET1 es una proteína simple de 55 kDa, codificada en el cromosoma. El análisis genético de esta toxina ha revelado la presencia de dos marcos de lectura (*orf*) de 534 pb para *set IA* y, 186 pb para *set IB*, dirigidos por el mismo promotor y separados por sólo tres pares de bases. Esta enterotoxina presenta una subunidad A (codificada por el gen *set IA*) de 20 kDa y cinco subunidades B (codificada por el gen *set IB*) de 7 kDa. La subunidad A de ShET1 sería responsable de la actividad secretora, mientras que la subunidad B estaría relacionada a la unión irreversible del receptor del enterocito. La toxina ShET2, proteína de 62,8 kDa, descubierta antes en *Escherichia coli* enteroinvasiva, es codificada por el gen *sen* en el plasmidio de virulencia de 214 kDa (Fasano *et al*, 1995; Fasano *et al*, 1997; Noriega *et al*, 1995; Behrens *et al*, 2002).

Existen muy pocos estudios acerca de las enterotoxinas de *Shigella* spp. Un estudio realizado en España sobre prevalencia de estas enterotoxinas, por Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), revela para *S. flexneri* una proporción de 9 % para ShET1 , 13,6 % ShET2, y 36,3 % para ambas ; *S. sonnei* presenta en un 57,6 % el gen *sen* que codifica para ShET2 (Vargas *et al*, 1999). En otro estudio se describe la presencia de ShET1 sólo en cepas de *Shigella flexneri* 2a recolectadas en Asia, Norte América y Sur América. (Noriega *et al*, 1995).

El interés de la presente memoria es conocer la presencia y distribución de las toxinas ShET1 y ShET2 en cepas de *Shigella* spp aisladas de niños chilenos con cuadro diarreico, para así poder contribuir a otros estudios en la caracterización de cepas de *Shigella* spp. que circulan en nuestro país.

## **HIPÓTESIS**

La distribución de las enterotoxinas ShET1 y ShET2 en *S. flexneri* es diferente respecto a *S. sonnei* en cepas aisladas de niños chilenos; ShET1 se presenta sólo en cepas de *S. flexneri*, en tanto que ShET2 está en ambas especies.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Determinar la presencia de los genes de las enterotoxinas ShET1 y ShET2 en cepas de *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*, asociadas a infecciones gastrointestinales en niños chilenos.

### **Objetivos específicos:**

- Determinar la distribución de los genes de las enterotoxinas ShET1 y ShET2 en cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei* aisladas de niños chilenos con proceso diarreico.
- Determinar la expresión de los genes de las enterotoxinas ShET1 y ShET2
- Relacionar la presencia de los genes de las enterotoxinas con subserotipos de *Shigella flexneri*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Cepas:

Se estudiaron 51 cepas de *Shigella flexneri* y 53 de *Shigella sonnei*, obtenidas al azar de 170 cepas de *Shigella* aisladas en tres períodos sucesivos de verano:

- Período I: 1° de noviembre de 1999 hasta 30 de abril del 2000
- Período II: 1° de noviembre del 2000 hasta 30 de abril del 2001
- Período III: 1° de noviembre del 2001 hasta 30 de abril del 2002

Estas cepas fueron recolectadas desde episodios diarreicos en niños menores de cuatro años de edad (una cepa por paciente), en un consultorio y servicio de atención primaria de urgencia de la comuna de Colina, área semi rural ubicada al norte de Santiago.

El cepario se conserva a -80° C en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Para reactivarlas se sembraron en agar SS (*Salmonella-Shigella*), incubándose 18-24 hrs a 37° C, posteriormente se corroboró su pureza por métodos bioquímicos convencionales y se mantuvieron en T.B.S. con glicerol a -20° C.

2. Subserotipos de *Shigella flexneri*: en el laboratorio de Microbiología se realizó la serotipificación según patrón de aglutinación. Se usaron anticuerpos monoclonales para *Shigella flexneri* elaborados por Reagensia A.B. para posteriormente comprobar la distribución de los genes de las enterotoxinas en los distintos serotipos.

3. Detección de los genes *set1* y *sen*: se cultivaron las cepas bacterianas en caldo Luria hasta fase logarítmica a 37° C durante 18-24 hrs.; se cultivó además como control positivo una cepa de *S. flexneri* obtenida en el año 1997 que presenta los genes de ambas enterotoxinas. Como control negativo se usó una cepa de *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ). Posteriormente se tomó un inóculo de 50  $\mu$ L para cada cepa y se transfirió a un tubo eppendorf con 100  $\mu$ L de agua estéril. Dichos tubos fueron hervidos a 100° C durante diez minutos. Para la detección de genes que codifican para las enterotoxinas ShET1 y ShET2 se realizó la técnica de P.C.R. Se utilizaron partidores diseñados para los genes *set1* y *sen*, de acuerdo a las secuencias reportadas por Fasano *et al* (1995) y Nataro *et al* (1995) (número de acceso: Z47381 y Z54211, respectivamente) (Tabla 1). Los partidores fueron elaborados por Biosonda S.A. El volumen final de cada reacción fue de 30  $\mu$ L (tampón 10X 3  $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> 25 mM 1,8  $\mu$ L; dNTPs 10 mM 0,3  $\mu$ L; 0,6  $\mu$ L de cada partidador 10 pM), *Taq* ADN polimerasa 0,6 unidades, 1,8  $\mu$ L de cada templado y agua bidestilada filtrada estéril. El programa de amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler®, comprendió 30 ciclos: 1) 92° C durante dos minutos con diez segundos; 2) 92° C un minuto diez segundos; 3) 48° C, temperatura de alineamiento, treinta segundos; 4) 72° C durante dos minutos con diez segundos; 5) volver al paso 2 y repetir treinta veces; 6) paso de extensión final a 72° C durante 10 minutos. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % en tampón TAE 0.5X (Tris-acetato 50 mM pH 8; EDTA 1 mM), se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con un transiluminador UV.

**Tabla 1: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este estudio.**

	Gen	Secuencia de los oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño de los fragmentos amplificados (pb)
ShET1	<i>set1</i>	GGTTCACGCTAATATTCCTTCATACT CAGGAACAAATGTCAGTGAACCG	705
ShET2	<i>sen</i>	ATGTGCCTGCTATTATTTAT CATAATAATAAGCGGTCAGC	798
RNA16S	16S	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500
Plasmidio de virulencia	<i>ipa</i>	AATCGCAGGCGCTCTTGTC TTTTTGGTCGCTAATCCCTGAATG	1097
Toxina Shiga	<i>stx1</i>	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	348

Cada PCR fue corroborada realizándose mínimo dos veces cada experimento.

Para determinar la presencia del plasmidio de virulencia se realizó mediante PCR la búsqueda del gen *ipa*, codificado en el plasmidio de virulencia, en el cual está también presente el gen *sen*, responsable de la expresión de ShET2. Además como control interno de cada reacción para verificar la calidad de la muestra se realizó en forma conjunta con el gen *sen* la búsqueda del gen del RNA ribosomal 16S. También, de forma paralela, se realizó la búsqueda del gen que codifica para la Shiga Toxina 1( *stx1*) descrita sólo para *S. dysenteriae*, con su respectivo control positivo, una cepa de *E.coli* enterohemorrágica.

#### 4.RT-PCR

a.Obtención de Ácidos nucleicos totales: los ácidos nucleicos se extrajeron usando el protocolo modificado de Ausubel *et al* (1992). Se cultivaron 6 mL de bacterias en caldo Luria, con agitación vigorosa a 37° C durante 18-24 hrs. El cultivo se centrifugó 5 min a 13000 rpm ( centrífuga Eppendorf® 5417R rotor: FA-45-30-11), se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 570 µL de tampón TE ( Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8). Se agregó 30 µL de SDS al 10 %, 3 µL de Proteinasa K (10 mg/mL). La mezcla se agitó vigorosamente en Vortex y se incubó 1 hora a 37° C. Luego se agregó 100 µL de NaCl 5 M y se mezcló con Vortex, se agregaron 80 µL de solución al 10 % de hexadeciltrimetilamonio (CTAB ) en NaCl 0,7 M. Se mezcló con Vortex y se incubó 10 min a 65° C. Se agregó 1 volumen de cloroformo alcohol isoamílico (25:1), se mezcló y centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se agregó un volumen de la mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó suavemente en Vortex y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. Se rescató la fase acuosa en un tubo limpio y se agregó 0,6 volúmenes de la mezcla de isopropanol, se agitó suavemente por inversión y se dejó precipitando por 10 minutos hasta una hora. Luego se centrifugó el tubo a 13000 rpm durante 20 min y se eliminó el sobrenadante por aspiración, luego se lavó con 200 µL etanol frío al 70 % para eliminar el CTAB residual; se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante por aspiración y se secó al aire. El sedimento se resuspendió en 100 µL de agua bidestilada estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y fue mantenido a -20° C. Se preparó un gel para visualizar la extracción por medio de electroforesis. Todos los reactivos fueron preparados con DEPC para inhibir las enzimas ribonucleasas.

b. Obtención del Ácido Ribonucleico total: el Ácido Ribonucleico (ARN) se extrajo usando la enzima RQ1 DNasa libre de RNasa de Promega®. Se tomaron 16 µL de extracto de ácidos nucleicos de cada muestra obtenidas en el paso anterior, se agregó 2 µL de Buffer RQ1 10X (400 mM Tris-Hcl pH 8; 100 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM CaCl<sub>2</sub>), 2 µL de DNasa RQ1, se agitó suavemente y se incubó a 37° C durante una hora. Luego se agregó 2 µL de solución inactivadora de DNasa, se incubó a 65° C por 10 min y se llevó a -20° C hasta el momento de su uso. Además se realizó un gel de agarosa al 1 % para visualizar la extracción del ARN.

Para confirmar ausencia de ADN contaminante el extracto fue sometido a una P.C.R de control con los partidores conocidos tal cual como se describe en el paso 3.

c. Síntesis del ADN complementario: una vez obtenido el ARN, se sintetizó el ADN complementario con la técnica RT-PCR usando la enzima AMV Transcriptasa Reversa (RT-AMV) de Promega®. Se incubaron a 70° C durante 5 min 8 µL de ARN, 1 µL de partidores al azar ( 0,25 µg/µL) y 1 µL de agua bidestilada estéril tratada con DEPC. Luego las muestras fueron enfriadas en hielo por 5 min y se centrifugaron por unos segundos para llevar el contenido al fondo de los tubos. Posteriormente a la solución se le agregaron 5 µL de Buffer RT 5X, 1 µL de inhibidor de ribonucleasa (RNasin®), 1 µL de DNTPs 10 mM, 1,2 µL de RT-AMV y 6,8 µL agua bidestilada estéril tratada con DEPC; se agitaron en Vortex obteniéndose un volumen final de 25 µL. Se incubaron a 37° C durante 1 hora, luego a 70° C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Los controles negativos para todas las reacciones incluyeron muestras sin transcriptasa reversa.

d. Amplificación de los fragmentos de ADNc de los genes set1 y sen: obtenido el extracto del ADN complementario se realizó la PCR con los partidores según se describe en el paso 3.

5. Análisis estadístico: los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba de Chi cuadrado para comparar ambas especies de *Shigella* estudiadas: *S. sonnei* y *S. flexneri*, además se compararon las distribuciones en los subserotipos de *S. flexneri*, y el gen *ipa* ( *SigmaStat* 2.0).

## RESULTADOS

1. Detección de los genes de las enterotoxinas de Shigella: para determinar la distribución de los genes de las enterotoxinas ShET1 y ShET2, probables responsables de la diarrea acuosa en el cuadro de shigelosis, se estudiaron 104 cepas de *Shigella* aisladas de niños con cuadro diarreico, mediante la técnica de PCR, donde los genes de las enterotoxinas se visualizaron como bandas de 705 y 798 pares de bases para ShET1 y ShET2 respectivamente (Figura 1). Además se visualizaron, como control de cada PCR, los fragmentos de la amplificación del gen ribosomal 16S.

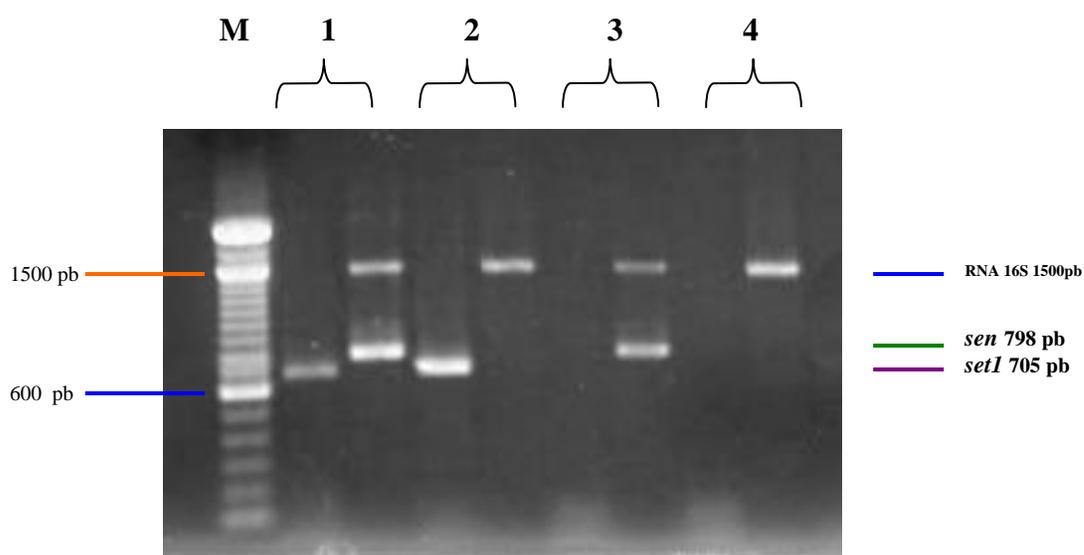


Figura 1: electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a los genes para ShET1 y ShET2. La fila M representa el marcador de peso molecular (ladder 100 bp). Cada número representa una bacteria de *S. flexneri* como patrón 1 una cepa que posee el gen *set1*, RNA 16S y *sen*; 2 corresponde a otra cepa que posee el gen *set1* y RNA 16S; 3 posee el gen RNA 16S y *sen* y; 4 sólo amplifica el gen RNA 16S.

Del total de las cepas estudiadas, se obtuvo que el 50 % presentaron genes para las enterotoxinas ShET1, ShET2 o ambos; el resto de las cepas en estudio no presentaron dichos genes. De las cepas de *S. flexneri* 36 resultaron ser positivas a

uno o ambos genes de las enterotoxinas, y tan sólo 16 de las 53 cepas de *S. sonnei* presentaron la misma característica (Tabla 2).

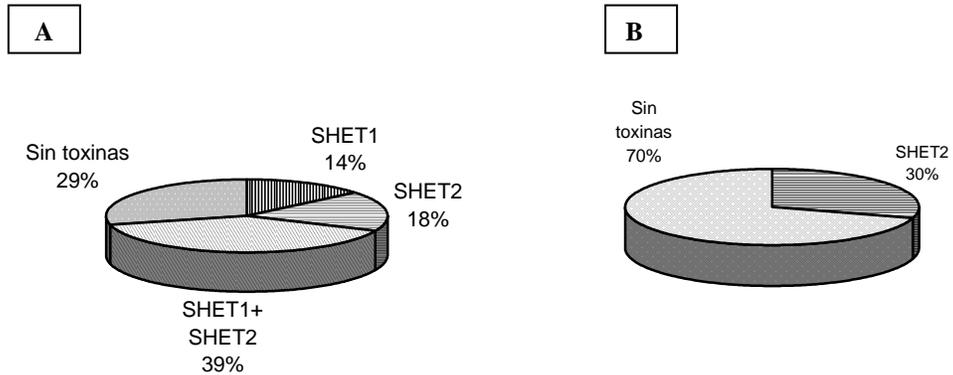
**Tabla 2: Prevalencia de los genes de las enterotoxinas de *Shigella* aisladas en niños con cuadro diarreico entre los años 1999 al 2002. El término cualquier toxina representa la presencia de los genes ShET1 y/o ShET2.**

( ): %

	Cualquier toxina	Sin toxinas
<i>S. flexneri</i>	36 (34.6)	15 (14)
<i>S. sonnei</i>	16 (15.4)	37 (36)
<b>Total</b>	<b>52 (50)</b>	<b>52 (50)</b>

Sólo *S. flexneri* presentó el gen *set1*, el cual codifica para la enterotoxina ShET1, en una proporción de 6,7 % del total. De las 104 cepas estudiadas, 25 (23,9 %) presentaron sólo el gen para ShET2, de las cuales 9 (8,6 %) fueron *S. flexneri* y 16 (15,4 %) *S. sonnei*.

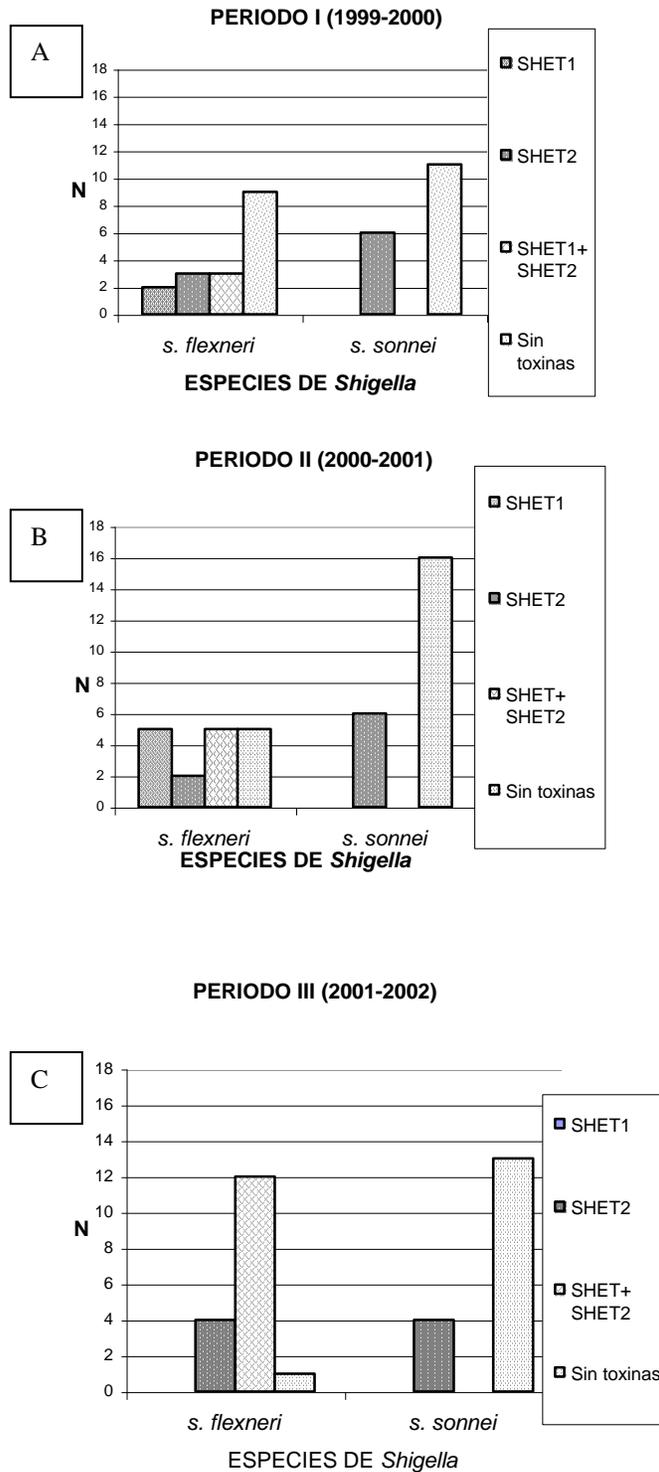
Las figuras 2 y 3 muestran los porcentajes de las distribuciones de las enterotoxinas ShET1 y ShET2 en las cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei* por separado.



**Figura 2: Distribución de las enterotoxinas ShET1 y ShET2 en cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei* mediante la técnica de PCR. Se muestran los porcentajes obtenidos en la distribución de las enterotoxinas ShET1 y ShET2 en cepas de *S. flexneri* ( gráfico A), y los porcentajes de la enterotoxina ShET2 en cepas de *S. sonnei* ( gráfico B), además se muestra la ausencia de enterotoxinas, véase también que no se encontró el gen de la enterotoxina ShET1 en *S. sonnei* . Alrededor del 70% de las cepas de *S. sonnei* no presentaron los genes para las enterotoxinas.**

La diferencia en la distribución de las toxinas entre *S. flexneri* y *S. sonnei* es estadísticamente significativa (Prueba de homogeneidad de chi cuadrado:  $\chi^2$ ).

En la figura 3 se muestra la distribución de los genes de las enterotoxinas en los distintos períodos de aislamiento. En los tres períodos *S. sonnei* no presentó el gen que codifica para ShET1. En cambio *S. flexneri* presentó los genes de las enterotoxinas a excepción en el último período (C).



**Figura 3: Distribución de los genes de las enterotoxinas ShET1 y ShET2 en cepas de *S.flexneri* y *S. sonnei*. Estas cepas fueron aisladas en tres periodos: 1999-2002 (A, B y C), los genes de las enterotoxinas se detectaron mediante PCR. Estos resultados se realizaron mínimo 2 veces por cepa.**

**N:** número de cepas estudiadas.

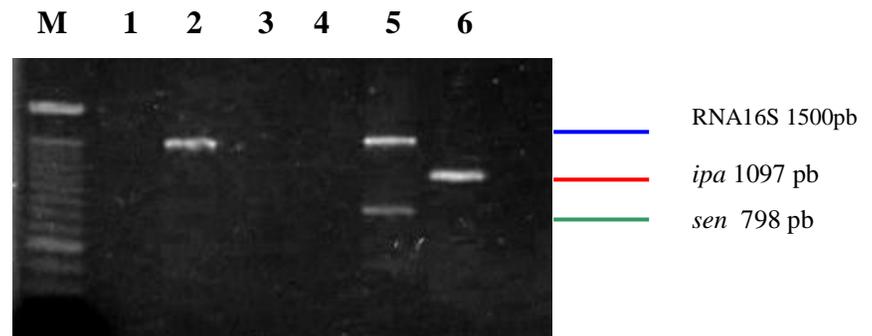
2.Detección del plasmidio de virulencia : En el plasmidio de virulencia se codifican diversos factores de virulencia , destacándose entre ellos la enterotoxina ShET2. Por ello como control interno se estudió la presencia de este plasmidio por medio del gen *ipa* (Figura 4). En la tabla 3 se muestra la prevalencia de este gen en las cepas aisladas de *S. flexneri* y *S. sonnei*.

**Tabla 3: Prevalencia del gen *ipa* asociado al Plasmidio de virulencia de cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei* aisladas en los períodos de 1999-2002.**

*ipa+*: presencia del gen *ipa*; *ipa-*: ausencia del gen *ipa*.

( ): número de cepas

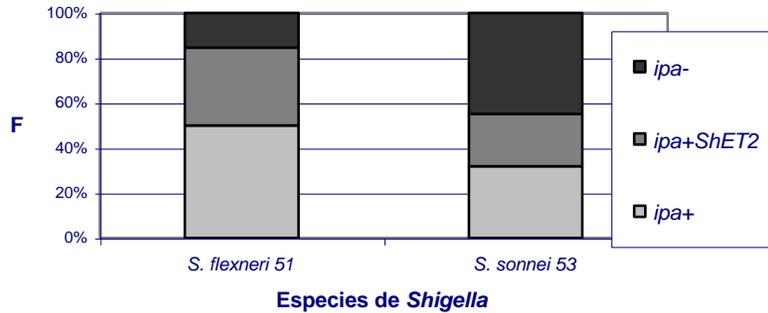
	<i>ipa+</i>	<i>ipa -</i>
<i>S. flexneri</i> (51)	39	12
<i>S. sonnei</i> (53)	22	31
Total (104)	61	43



**Figura 4: electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a los genes RNA 16S, *sen* e *ipa*. La fila M corresponde al estándar de peso molecular (ladder 100 pb). Las filas 1-3 corresponden a una cepa de *S. sonnei* del año 2000; las filas 4-6 representan otra cepa de *S. sonnei* del año 2002.. Las filas 1 y 4 representan el gen *set1*; las filas 2 y 5 el gen RNA 16S y *sen* y; las filas 3 y 6 el gen *ipa*.**

En la figura 5 se aprecian las distribuciones del gen *ipa* y ShET2 en *S. flexneri* y *S. sonnei*. En *S. flexneri* se encontraron 39 cepas positivas al gen asociado al plasmidio de virulencia, de las cuales 27 poseían el gen para ShET2 presente en este plasmidio, sin embargo se encontraron dos cepas que no poseían el

plasmidio, pero sí poseían el gen *sen*. En el caso de *S. sonnei*, 22 poseían el gen del plasmidio de las cuales 16 presentaron el gen para ShET2.

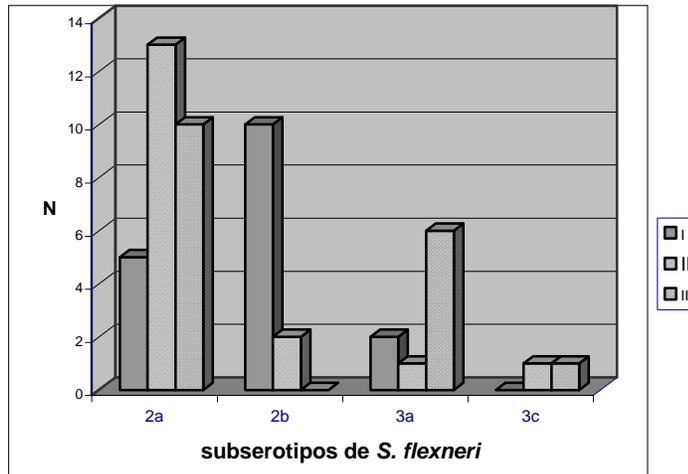


**Figura 5: Comparación de los genes de la enterotoxina ShET2 e ipa en cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei*. Este estudio se realizó por medio del ensayo de PCR, mínimo dos veces por muestra.**

**F: Frecuencia en porcentaje.**

La toxina Shiga 1 descrita sólo para *S. dysenteriae*, no se detectó en las 104 cepas estudiadas.

3.Prevalencia de los subserotipos de *S. flexneri*: *S. flexneri* se subdivide en subserotipos, donde los más frecuentes en nuestro país son dos: *S. flexneri* 2a y *S. flexneri* 6 ( Pidal *et al*, 1999). En la figura 6 se muestra que *S. flexneri* 2a fue la cepa más aislada en los tres períodos (con un total de 28 cepas), en segundo lugar encontramos el subserotipo 2b (representando 12 cepas). Los subserotipos 3a y 3c suman tan sólo 11 cepas aisladas ( 7 y 4 respectivamente).

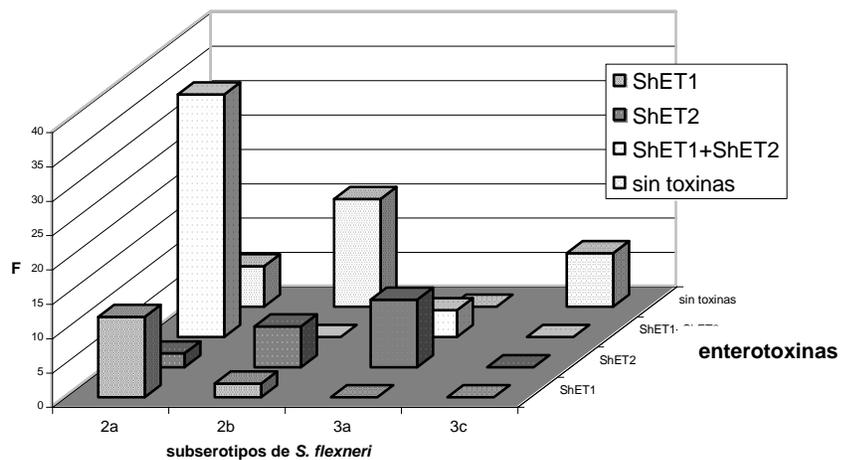


**Figura 6: Subserotipos de *S. flexneri* aislados entre 1999 a 2002. Se muestra los subserotipos de *S. flexneri* aislados en los tres períodos. El subserotipo más frecuente fue 2a, y en segundo lugar 2b.**

**N: número de subserotipos aislados.**

4 Asociación de las enterotoxinas con los subserotipos de *S. flexneri*: en la figura 7 se muestra la distribución de las enterotoxinas en los distintos subserotipos de *Shigella flexneri*. Se puede observar que la mayor prevalencia de los genes de las enterotoxinas ShET1 y ShET2 representan las cepas de *S. flexneri* 2a con un 49% del total de cepas estudiadas. En segundo lugar se encontró *S. flexneri* 3a representando un 13,8 % en la prevalencia de estos genes, *S. flexneri* 2b presentó un 7,8 %, y en *S. flexneri* 3c no se encontraron dichos genes. La enterotoxina ShET1 se presentó en un 11,7 % en *S. flexneri* 2a y en 2 % en *S. flexneri* 2b, para ShET2 se presentó en un 2 % en *S. flexneri* 2a, 5,9 % en el subserotipo 2b y en un 9,8 % en 3a. Ambas enterotoxinas se presentaron en un 35,3 % en el subserotipo 2a , y en un 3,9 % en 3a. Finalmente no se encontraron los genes de las enterotoxinas en las siguientes proporciones: 15,7 % para el subserotipo 2b, 7,8 % para 3c, 5,9 % para 2a y 0 % para 3a.

El subserotipo 2a fue la cepa que presentó la mayor cantidad de genes de las enterotoxinas. En cambio, el subserotipo 3c no presentó los genes estudiados.

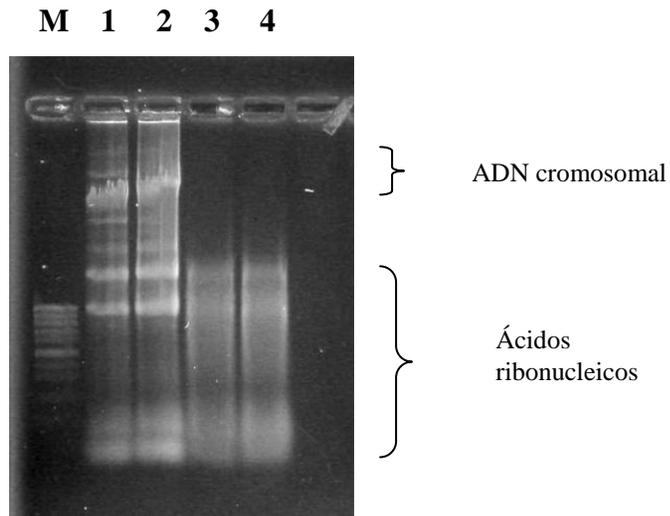


**Figura 7: Prevalencia de los genes que codifican para las enterotoxinas ShET1 y ShET2 en subserotipos de *Shigella flexneri*.**

**F: Frecuencia en porcentaje**

Para comprobar diferencias de distribución entre los subserotipos de *S. flexneri* se realizó la prueba estadística de Hipótesis de Independencia, donde  $\chi^2$  resultó significativo, pero por los supuestos de la prueba no se puede afirmar si hay asociación.

5.Extracción de Ácidos Nucleicos totales y Ácidos Ribonucleicos: el análisis de ambas extracciones se realizó en un gel de electroforesis en agarosa al 1 %.



**Figura 8:** gel de agarosa de la extracción de Ácidos nucleicos totales sin tratamiento con DNasa ( filas 1 y 2) y de Ácidos ribonucleicos después del tratamiento con DNasa ( filas 3 y 4) de una cepa de *S. flexneri* 2457T. M corresponde al marcador de peso molecular ( ladder 100pb)

6.Análisis de la expresión de las enterotoxinas *ShET1* y *ShET2*: la técnica RT-PCR no está desarrollada para estas toxinas y durante el proceso de estandarización no se logró amplificar los productos a partir de RNA. El método que se usó se fue modificando a medida que los resultados no se lograban, como fue el caso de variar la cantidad de producto de ADNc para la reacción de PCR, también se usó otra enzima transcriptasa reversa: Improm II ( Promega ® ). A pesar de ello no se logró obtener el resultado esperado.

## DISCUSIÓN

La disentería aguda es una enfermedad común en muchos países subdesarrollados, y es causante de altas tasas de morbilidad y mortalidad especialmente en niños menores de cinco años. La organización Mundial de la Salud hizo una estimación de 1,1 millones de muertes al año producto de la shigelosis (Philipott *et al*, 2000). A nivel de salud pública esta enfermedad se representa de tres características principales: 1) es la enfermedad pediátrica de mayor frecuencia, más del 60 % de los casos ocurren en niños entre 1 y cinco años de edad; 2) es una enfermedad tercer mundista con alrededor de 150 millones de casos cada año, comparados con 1,5 millones de casos en países desarrollados; y 3) también es una enfermedad mortal, con alrededor de 1 millón de muertes, donde los más afectados son niños ( Sansonetti, 2001).

Además, la pobreza es un factor de riesgo muy importante en la shigelosis, sobretodo cuando ocurren brotes. Existen cuatro aspectos que se deben considerar al momento de estudiar esta enfermedad: 1) aumento en la resistencia a los antibióticos, sobretodo en zonas donde la enfermedad es endémica; 2) baja tasa de infectividad con 10-100 microorganismos consumidos de forma oral; 3) de carácter severo en complicaciones agudas, especialmente en niños mal nutridos; y 4) de cuidado en los casos donde la enfermedad se prolonga por el estado de desnutrición que es capaz de generar (Sansonetti, 2001).

En la gran mayoría de los pacientes se observa una diarrea acuosa al comienzo de la enfermedad, ello se explicaría por la síntesis de dos enterotoxinas, ShET1 y ShET2. Noriega *et al* en el año 1995 describieron la enterotoxina ShET1 en la mayoría de las cepas de *S. flexneri* 2a, en este estudio sólo se encontraron 7 cepas que producían de manera exclusiva la enterotoxina, de las cuales 6 fueron *S. flexneri* 2a, además ShET1 no se encontró en cepas de *S. sonnei*, lo que estaría confirmando los estudios previos y la hipótesis de este trabajo.

Nataro *et al* (1995) describieron el gen *sen* (codifica para ShET2) en una proporción del 83 % de las cepas de *S. flexneri* estudiadas, en este estudio se

encontró en una proporción del 23,9 % como única toxina, y aunque sumen considerando las cepas de *S. flexneri* que fueron positivas para ambas enterotoxinas el valor sólo asciende a un 43,1 %. Estos resultados muestran diferencias, que se podrían explicar considerando que estas cepas al ser almacenadas desde 1999, pueden perder el plasmidio de 214 kDa, ya que en publicaciones anteriores se describe la pérdida del plasmidio de virulencia con el almacenamiento prolongado y las transferencias a placas de cultivo (Vargas *et al*, 1999). Esto se demuestra al analizar las cepas que conservaron el plasmidio de virulencia, de las cuales 42 (40,4 %) de 104 cepas fueron positivas al gen *sen* e *ipa* de manera simultánea. Sin embargo, se encontraron de las 53 cepas de *S. sonnei* 31 no poseían el gen *ipa*, un número importante si consideramos que sólo 15 de estas cepas fueron positivas para la enterotoxina ShET2. De 51 cepas de *S. flexneri*, 12 fueron negativas al gen del plasmidio de virulencia y 27 fueron positivas al gen *ipa* y *sen*. Al encontrar 43 cepas negativas al gen *ipa* sugiere que las cepas que no poseían este plasmidio lo perdieron en algún momento. Por lo tanto al comparar la distribución de las enterotoxinas se debería realizar en relación a las cepas que sí poseen el plasmidio de virulencia, de esta manera se tendría que describir que de 61 cepas de *Shigella* (positivas al gen *ipa*), 42 poseen el gen de la enterotoxina ShET2, y 7 la enterotoxina ShET1. El trabajo publicado por Vargas *et al* en el año 1999 describe la prevalencia de los genes de las enterotoxinas y además del gen *ipa* que fue encontrado en todas las cepas estudiadas. En este trabajo se encontraron 2 cepas de *S. flexneri* negativas al gen *ipa*, pero positivas al gen *sen*, esto se explicaría si el gen de ShET2 se codificara en otro lugar distinto al plasmidio de virulencia o que la porción que codifican los partidores del gen *ipa* se pierda, o el plasmidio presentase una mutación que interfiera con la amplificación.

Los métodos que se describen para medir la expresión de las toxinas de *Shigella* spp. son el asa ligada en modelo de conejo y ensayos *in vitro* con asas intestinales (Fasano *et al*, 1997). Hasta el momento no se describen publicaciones que estandaricen la técnica RT-PCR para estas toxinas. Esta técnica presenta distintos puntos críticos en la manipulación del material genético, como son temperatura,

contaminación con DNA, contaminación con enzimas ribonucleasas, todos ellos fueron medidos durante todo el proceso. Sin embargo existe la limitante de las transcriptasas reversas que se usaron ya que sus propiedades no son adecuadas al generar fragmentos mayores a 500 pb, y los productos esperados poseían un tamaño mayor a 700 pb. Por lo tanto para mejorar este ensayo se podría generar fragmentos más pequeños que permitan una mejor amplificación, otra alternativa es usar partidores específicos del gen que se desea amplificar, con ello aumenta la probabilidad de que estos hibriden en el sitio adecuado. Otra alternativa es usar una transcriptasa reversa capaz de hibridar fragmentos de mayor tamaño.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran una prevalencia moderada de los genes de las enterotoxinas ShET1 y ShET2, sería interesante correlacionar la presencia de estas toxinas con el cuadro clínico.

## CONCLUSIONES

El presente trabajo describe la distribución de dos enterotoxinas: ShET1 y ShET2 en cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei* aisladas de niños chilenos con cuadro diarreico en tres períodos consecutivos de temporada estival. Dichas enterotoxinas serían responsables de la diarrea acuosa al comienzo del cuadro de shigelosis de acuerdo a estos resultados en ensayos con modelo animal *in vivo* e *in vitro*.

En este trabajo se corroboró la hipótesis propuesta: el gen que codifica para ShET1 se presentó sólo en cepas de *S. flexneri*, y ShET2 en ambas especies. Los subserotipos de *S. flexneri* encontrados fueron 2a, 2b, 3a y 3c; de estos los más aislados fueron 2a y 2b. De las cepas aisladas del subserotipo 2a, 25 presentaron los genes para las enterotoxinas; del subserotipo 2b, cuatro presentaron genes para las enterotoxinas; del subserotipo 3a, siete presentaron dichos genes; 3c no presentó estos genes.

Además se determinó la presencia del gen *ipa*, que revela la presencia del plasmidio de virulencia, donde está presente el gen que codifica para ShET2. Se encontró sólo en el 58,6 % del total de las cepas estudiadas, por lo tanto no se puede aseverar si el plasmidio estuvo presente o si se perdió durante el almacenamiento.

Otro de los objetivos fue determinar la expresión de las enterotoxinas ShET1 y ShET2 mediante la técnica de RT-PCR, pero no se obtuvieron resultados, ya que no se logró estandarizar este método para las enterotoxinas, ya que la enzima Transcriptasa Reversa utilizada no amplifica fragmentos mayores a 700 pb.

## BIBLIOGRAFÍA

**ALLISON G. AND VERMA N.** 2000. Serotypes converting- bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. Trends Microbiol. 8(1): 17-23.

**ANATOLIAKI M.; GALANAKIS E.; TSEKOURA T.; SCHINAKI A.; STEFANAKI S.; TSILIMIGAKI A.** 2003. Urinary Tract Infection caused by *Shigella sonnei*. Scand. J. Infect. Dis. 35(6-7): 431-3.

**AUSUBEL F.; BRENT R.; KINGSTON R.; MOORE D.; SEIDMAN J.; SMITH J.; STRUHL K.** 1992. *In: Short protocols in molecular biology 2º ed.* Jofn Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.

**BEHRENS M.; SHEIKH J.; NATARO J.** 2002. Regulation of the Overlapping *pic/set* Locus in *Shigella flexneri* and Enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect.Immun.70(6): 2912-2925.

**BEHRMAN R.; KLIEGMAN R.; NELSON W.; VAUGHAN V.** 1992. *In: Tratado de Pediatría 14ª Edición.* Interamericana M<sup>c</sup> Graw Hill, México.

**BOPP C.; BRENNER F.; WELLS J.; STROCKBINE N.** 1999 *Escherichia, Shigella* and *Salmonella*. *In: Manual of Clinical Microbiology 7ª Edición.* Murray P., Baron E., Pfaller M., Tenover F., Yolken F. pp 465-467.

**CARRASCO S.; SOLARI V.; PRADO V.; SUAZO L.; ARELLANO C.; HERNÁNDEZ M.; ESPINOZA C.** 2000. Brote de shigelosis en una escuela de educación básica; Rev Chil. Infect. 17:122-8.

**FASANO A.; NORIEGA F.; MANEVAL D.; CHANASONGCRAM S.; RUSSEL R.; GUANDALINI C.; LEVINE M.** 1995. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2 a active in small intestine *in vivo* an *in vitro*. Journal Clin. Invest. 95: 2853-2861.

**FASANO A.; NORIEGA F.R.; LIAO F.M.; WANG W.; LEVINE M.M.** 1997. Effect of *Shigella* enterotoxin 1 (ShET 1) on rabbit intestine *in vitro* and *in vivo*. Gut. 40:505-511.

**FERRECCIO C.; PRADO V.; OJEDA A.; CAYYAZO M.; ABREGO P.; GUERS L.; LEVINE M.** 1991. Epidemiologic Patterns of Acute Diarrhea and Endemic *Shigella* Infections in Children in a Poor Periurban Setting in Santiago, Chile. Am. J. Epidemiol. 134(6): 614-626.

**HALE T.L.** 1991. Genetic Basis of virulence in *Shigella* species. Microbiol. Rev.; 55(2): 206-224.

**KOSHI R.; CHANDY G.; MATHAN M.; MATHAN V.** 2003. Vascular Changes in Duodenal Mucosa in Shigellosis and Cholera. Clin. Anatomy. 16: 317-327.

**KOTLOFF K.L.; WINICKOFF J.P.; IVANOFF B.; CLEMENS J.D.; SWERLOW D.L.; SANSONETTI P.J.; ADAK G.K.; LEVINE M.M.** 1999. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World health Organ. 77 (8):651-66

**LEVINE M.; DUPONT H.; FORMAL S.; HORNICK R.; TAKEUCHI A.; GANGAROSA E.; SNYDER M.; LIBONATI J.** 1973. Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* 1(Shiga) Dysentery. J. Infect. Dis. 127(3):261-269.

**NATARO J.; SERIWATANA J.; FASANO A.; MANEVAL D.; GUERS L.; NORIEGA F.; DUBOVSKY F.; LEVINE M.; MORRIS J.** 1995. Identification and Cloning a Novel Plasmad-Encoded Enterotoxin of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* Strains. Infect. Immun. 63(12): 4721-4728.

**NORIEGA F.; MING LIAO F.; FORMAL S.; FASANO A.; LEVINE M.** 1995. Prevalence of *Shigella* Enterotoxin 1 among *Shigella* Clinical Isolates of Diverse Serotypes. J. Infect. Dis. 172:1408-10.

**PEDRÓN T.; THIBAUT C.; SANSONETTI P.** 2003. The invasive Phenotype of *Shigella flexneri* Directs a Distinct Gene Expression Pattern in Human Intestinal Epithelial Cell. J. of Biol Chemistry. 278(36): 3378-3386.

**PHILIPOTT D.; EDGEWORTH J.; SANSONETTI P.** 2000. The pathogenesis of *Shigella flexneri* infection: lessons from *in vitro* and *in vivo* studies; Phil Trans R. Lond. B. 355: 575-586.

**PIDAL P.; PRADO V.; TRUCCO O.; VALDIVIESO F.; DÍAZ M.; OJEDA A.; GRUPO PRONARES.** 1999. Panorama de la resistencia antimicrobiana de *Shigella sp.* en 10 hospitales chilenos Proyecto Pronares. Rev. Panam. Infectol. Suppl 1: S18-S24.

**PRADO V.; PIDAL P.; ARELLANO C.; LAGOS R.; SAN MARTIN O.; LEVINE M.M.** 1998. Multirresistencia antimicrobiana en cepas de *Shigella sp* en una comuna semirural del área norte de Santiago. Rev. Med. Chile. 126:1464-1471.

**PRADO V.; LAGOS R.; NATARO J.P.; SAN MARTIN O.; ARELLANO C.; WANG J.Y.; BORCZYK A.; LEVINE M.M.** 1999. Population-based study of the incidence of *Shigella* diarrhea and causative serotypes in Santiago, Chile. Pediatr. Infect. Dis. J. 18:500-5.

**SANSONETTI P.** 2001. Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. Am J. Physiol. Gastrointest liver Physiol. 280:G319-G323.

**TALUKDER K.; ISLAM Z.; ISLAM M.; DUTTA D.; SAFA A.; ANSARUZZAMAN M.; FARUQUE A.; SHAHED S.; NAIR G.; SACK D.** 2003. Phenotypic and Genotypic Characterization of Provisional Serotype *Shigella flexneri* 1c and Clonal Relationships with 1 a and 1b strains Isolated in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 41(1): 110-117.

**VARGAS M.; GASCON J.; JIMÉNEZ DE ANTA M.; VILA J.** 1999. Prevalence of *Shigella* Enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. J. Clin. Microbiol. 37(11):3608-3611.