

2ej, 43



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

PREPARACION DE ANTISUEROS POLI-
VALENTES Y CONJUGADOS FLUORESCENTES
PARA IDENTIFICACION DE SHIGELLA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A ;

ESTHER SALINAS CASTRO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.1 Antecedentes | 1 |
| 1.2 Generalidades del Género <u>Shigella</u> | 2 |
| 1.3 Enfermedad en el hombre. | 4 |
| 1.4 Infección en animales. | 4 |
| 1.5 Patogenía | 5 |
| 1.6 Epidemiología. | 6 |
| 1.7 Inmunidad. | 7 |
| 1.8 Estructura antigénica de <u>Shigella</u> | 9 |
| 1.9 Diagnóstico de Laboratorio | 11 |
| 1.10 Técnica de Inmunofluorescencia | 12 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. | 18 |
| 3. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA. | 19 |
| 4. OBJETIVOS | 20 |
| 5. HIPOTESIS | 21 |
| 6. MATERIAL Y METODOS. | 22 |
| 7. RESULTADOS. | 48 |
| 8. DISCUSION DE RESULTADOS | 65 |
| 9. CONCLUSIONES. | 68 |
| 10. ANEXOS. | 69 |
| 11. BIBLIOGRAFIA. | 74 |

INTRODUCCION

1.1. Antecedentes

Aunque se supone la existencia de infecciones diarreicas causadas por microorganismos del género Shigella desde hace mucho tiempo, no es sino hasta 1888 cuando Chantemesse y Widal reportaron el aislamiento de una bacteria, a partir de heces de soldados muertos o enfermos de disentería aguda. Estos investigadores estudiaron algunas de las características de cultivo de la bacteria y las lesiones ulcerativas que producía en el intestino de animales. (11)

De 1898 a 1901 Shiga en Japón, Kruse en Alemania y Flexner - en Filipinas demostraron durante epidemias de disentería bacilar, que ésta era causada por un bacilo similar en morfología y características tintoriales, al responsable de la tifoidea. (1, 6, 11).

De acuerdo con Shiga y Flexner, anteriormente Klebs (1886), ya había descrito una bacteria pequeña como causa de disentería, también Griegorieff en 1891 aisló y cultivó un microorganismo de 11 casos de disentería en Rusia, él consideró que dichos cultivos eran idénticos a la bacteria descrita por Chantemesse y Widal. (11)

Otros autores como Vaillard y Dopter realizaron estudios confirmatorios en 1903. Más tarde Strong y Musgrave reprodujeron la enfermedad, mediante la ingestión de la bacteria en un mono y en un criminal condenado.

En México es entre 1932 a 1936 cuando, por primera vez, Mooser y Varela aislan e identifican en forma correcta y sistemática estos microorganismos. En 1943, Zozaya y Villanueva-

aislaron 57 cepas de Shigella a partir de heces de niños y - adultos con diarrea. León encontró también en la Ciudad de México, S.dysenteriae en un caso de diarrea, S.flexneri en - otros cuatro casos y S.sonnei en dos casos. (39)

A partir de entonces son numerosos los reportes de aislamientos a partir de casos de gastroenteritis, Olarte reporta que el 30% de los casos de gastroenteritis en niños son causados por Shigella. (39)

1.2 Generalidades del género Shigella.

Según la definición de Ewing (1949), los microorganismos que pertenecen al género Shigella son bacterias gramnegativas, - aerobias, no esporuladas, inmóviles y con pocas excepciones - no producen gas de substancias fermentables, tales como: -- salicina, adonitol, citrato, no hidrolizan la urea, no licúan la gelatina, no forman acetilmetilcarbinol. S.sonnei, es la única especie que utiliza la lactosa, cuando se incuba por - un tiempo prolongado. (7, 11)

Las shigelas forman colonias redondas, convexas, transparentes, que alcanzan un diámetro aproximado de 2 mm. en 24 horas. (6)

Sus requerimientos nutritivos son simples y pueden crecer en los medios ordinarios de cultivo a una temperatura óptima de 37°C. (4, 6)

Las especies de shigelas pueden identificarse por medio de - reacciones bioquímicas y de aglutinación. La identificación del serotipo se lleva a cabo mediante el uso de antisueros. (6)

La clasificación de las shigelas está basada en algunas características bioquímicas y antigénicas. El género Shigella está constituido por 4 especies o subgrupos denominados ---

A, B, C y D, cada subgrupo está formado por serotipos individuales de acuerdo a su bioquímica y estructura antigénica. (6)

Los bacilos disentéricos se dividen en dos grupos, con base en la fermentación de manitol; entre los que no lo fermentan está el bacilo de Shiga (Shigella dysenteriae I). El grupo de los que fermentan el manitol se subdivide, con base en la fermentación del dulcitol y sorbitol. (6)

CLASIFICACION DE LAS SHIGELLAS.

| SUB-GRUPO | GLUCOSA | LACTOSA | MANITOL | INDOL | No. DE SEROTIPOS |
|----------------------|---------|---------|---------|-------|------------------|
| A | | | | | |
| <u>S.dysenteriae</u> | X | - | - | V | 10 |
| B | | | | | |
| <u>S.flexneri</u> | X | - | X | V | 6 |
| C | | | | | |
| <u>S.boydii</u> | X | - | X | V | 15 |
| D | | | | | |
| <u>S.sonnei</u> | X | (X) | X | V | 1 |

X .- Producción de ácido y no de gas.

() .- Reacción retardada.

V .- Variable en diferentes tipos.

1.3 Enfermedad en el hombre.

La shigelosis o disentería bacilar, es una infección aguda, que se caracteriza por dolor abdominal, diarrea, fiebre y heces con sangre y moco, aunque, son comunes las infecciones benignas con diarrea pasajera. (1, 6, 7, 33)

El poder invasivo de las shigelas se limita a la mucosa del intestino, principalmente del colon, y algunas veces de la porción terminal del ileon, sin embargo, en casos excepcionales estos gérmenes pueden pasar al torrente circulatorio y dar origen a una verdadera bacteremia. Durante la epidemia de América Central provocada por S.dysenteriae 01 (1969-1972), hubo aproximadamente de 1 a 3 casos de bacteremia. Se sugiere además que la bacteremia por Shigella puede ocurrir más frecuentemente en niños mal nutridos, aunque es poco común. (1, 31)

En México se aisló Shigella flexneri en 4 niñas con vulvo-vaginitis, a partir del exudado vulvo-vaginal. (1, 39)

Es probable que la infección por bacilos de disentería sea muy frecuente, pero que muchos casos cursen sin sintomatología. Las personas con tales infecciones son consideradas --portadores que expulsan bacilos por un tiempo medio de tres a cinco semanas. No se sabe si hay un estado crónico permanente de portador, análogo al portador crónico de bacilo de tifoidea, pero muchos portadores continúan eliminando bacilos por largo tiempo. De cualquier manera, es el portador casual y los otros grupos de portadores, los que tienen importancia primordial en el mantenimiento y diseminación de la enfermedad que persiste latente en forma endémica. (4)

1.4 Infección en animales.

La shigelosis es una infección exclusiva del hombre, sin embargo la aparición de disentería bacilar en chimpancés cuando se encuentran en cautiverio es común, generalmente con -- S.flexneri, lo más probable es que tales infecciones sean -- transmitidas por el hombre y no representen una infección natural en animales. Es estos casos la infección tiende a ser latente, con aparición ocasional de síntomas, sobre todo -- cuando los animales son sometidos a situaciones de tensión. (4, 39)

1.5 Patogenía.

Las shigelas son microorganismos altamente virulentos para el hombre, ya que con un inóculo extraordinariamente pequeño como 10 a 200 bacterias se produce la enfermedad. (7, 10)

Durante el período de incubación, el cual es usualmente de - 36 a 72 horas, los organismos atraviesan el intestino delgado y proliferan. Cuando se produce enterotoxina, como es el caso de Shigella dysenteriae 01, esta estimula una pequeña - secreción de fluidos y electrolitos en el intestino delgado, lo que explica la diarrea acuosa que ocurre tempranamente en la enfermedad. También algunas cepas de S.flexneri y S.sennei producen enterotoxinas similares a la anterior. (1, 3, 19).- En el colon la Shigella alcanza concentraciones de 10^6 10^{10} organismos/g de heces. El bacilo posee capacidad invasiva, - lo que permite la penetración hacia el epitelio del colon. - La bacteria se multiplica dentro de las células epiteliales, produciendo una respuesta inflamatoria aguda con resultante - ulceración mucosa, deformación de las vellosidades y forma-- ción de microabscesos. En ocasiones el colon presenta colitis difusa. La mucosa se sensibiliza y se cubre con exudado

que contiene gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares. Por consiguiente, a menudo se observan eritrocitos y leucocitos polimorfonucleares en las heces. (7, 25)

1.6 Epidemiología.

La shigelosis es una infección entérica causada por 4 especies de bacterias: S.dysenteriae, S.flexneri, S.boydii y -- S.sonnei. Tiene una amplia distribución mundial, aunque es más frecuente donde las normas sanitarias y los niveles de higiene personal son bajos. En los países en vías de desarrollo, la shigelosis persiste como causa de ataques violentos de diarrea. En los Estados Unidos es frecuente en comunidades, que involucran varias personas en estrecho contacto una con otra, en donde los hábitos higiénicos no son satisfactorios como: instituciones para niños retrasados mentales, prisioneros y grupos militares de campo. (3, 28, 35, 36 y 37)

El hombre es el único reservorio natural de la Shigella, y la infección es transmitida por vía fecal oral, aunque muchas veces se puede transmitir por otras vías como fomites y algunas ocasiones por el agua o alimentos contaminados. (1, 6, 7, 8)

En las regiones con condiciones sanitarias pobres, como es el caso de México, predomina el grupo Flexner, con los serotipos 2a, 6, 4 y 3, pero a medida que las condiciones mejoran va siendo reemplazado por S.sonnei, fenómeno epidemiológico que no tiene una explicación clara. S.boydii y -- S.dysenteriae son en general menos frecuentes. En general se encuentra Shigella entre el 5 y 20% aproximadamente de los enfermos con diarrea aguda. (10, 16, 39, 40, 41, 50)

La shigelosis es más frecuente en el verano y al principio del otoño, siendo el niño a partir de los 6 meses de edad y

el hombre adulto los más afectados. La infección por Shigella es rara en el niño recién nacido y es más seria en niños de 1 a 4 años de edad, que en adultos. En cuanto a la distribución por sexo, ambos son igualmente afectados, aunque algunos autores han encontrado que la mujer entre los 20 y 30 años tiene una incidencia dos veces mayor que la encontrada en hombres de edad comparable, debido probablemente a su contacto más estrecho con niños enfermos. (1, 28, 35, 36)

Un estudio que se efectuó en pacientes de todas las edades, del Hospital de Dacca, Bangladesh, de diciembre de 1979 a noviembre de 1980, donde se estudiaron un total de 3,550 muestras, se aislaron 412 shigelas, de las cuales 270 (66%) fueron S.flexneri, 66 (16%) fueron S.dysenteriae tipo 1, 31 (7%) fueron S.sonnei, 24 (6%) fueron S.dysenteriae tipo 2, y 21 (5%) fueron S.boydii. (28) En este mismo estudio Shigella fue aislada más frecuentemente en personas de edad mayor (60 años de edad), menos frecuente en niños menores de un año de edad y con frecuencia similar en todos los otros grupos de edad, con diferencias no mayores en la distribución de especies por edad. No hubo diferencia significativa en el sexo por distribución de pacientes infectados con Shigella en algún grupo de edad. (8)

1.7 Inmunidad.

Los anticuerpos aparecen después de la segunda semana de infección, pero siempre en niveles bajos. A diferencia de la salmonelosis, la shigelosis es una infección localizada, los bacilos raramente penetran más allá de los ganglios linfáticos regionales, por lo tanto, la inmunidad eficaz es a nivel local por las células formadoras de anticuerpos. (6)

Las personas infectadas con S.flexneri o S.sonnei producen anticuerpos IgM, los cuales neutralizan la toxina de - - -

S.dysenteriae 01 in vitro. El desarrollo de cierta inmunidad se pone de manifiesto, en áreas endémicas, donde la resistencia de los residentes es mayor que la de los recién llegados que sufren la diarrea de aclimatación. Este fenómeno es bien conocido por los residentes de climas templados que visitan áreas tropicales y subtropicales. (1, 4)

En lo que se refiere a la producción de vacunas se han hecho numerosos intentos. Las vacunas administradas por vía parenteral, a base de suspensiones de bacilos muertos, son relativamente tóxicas y han dado, en conjunto, resultados negativos. El interés se ha dirigido a provocar inmunidad local en el intestino por administración de vacunas orales. Las vacunas muertas administradas por vía oral han dado resultados equívocos pero las vacunas vivas parecen más prometedoras. (4)

Las vacunas vivas son de tres tipos, una constituida por cepas mutantes dependientes de estreptomycinina (SmD), la otra, por mutantes avirulentas e híbridas. Se han llevado a cabo estudios experimentales con cepas SmD, administradas por vía oral y seguidas de infección por la misma vía con bacilos virulentos, tanto en monos como en voluntarios humanos. Además, otros ensayos con vacuna SmD efectuados en personal militar en Yugoslavia, han dado una protección específica de serotipo, pero no han modificado el estado de portador. También se ha comprobado la efectividad de esta vacuna en estudios realizados en niños, utilizando bicarbonato de sodio para neutralizar la acidez gástrica, permitiendo que las bacterias viables penetren en el intestino. (4, 23)

Las vacunas preparadas con bacilos modificados genéticamente han sido de dos tipos: una mutante avirulenta caracterizada por incapacidad de atravesar la barrera epitelial, y el otro, una cepa híbrida capaz de penetrar en las células epitelia-

les, pero incapaz de producir focos de infección en la lámina propia. Ensayadas en monos, ambos tipos de vacuna han resultado muy eficaces a la infección por vía oral con cepas similares virulentas. (4, 23)

La especificidad de tipo de la inmunidad producida por las vacunas parece ser un factor limitante para su empleo, dada la multiplicidad de los bacilos disintéricos. Sin embargo, casi invariablemente la disentería bacilar que ocurre en una región es producida por dos o tres tipos de shigela, generalmente de la especie S. flexneri o S. sonnei. Por lo tanto la inmunización contra dos o tres tipos de bacilos disintéricos debe bastar para dominar una proporción muy elevada de las infecciones adquiridas naturalmente. (4)

1.8 Estructura antigénica de Shigella.

La serotipificación de Shigella depende de la determinación de los antígenos O somáticos y antígenos capsulares K o de envoltura, cuando existen. (4, 11)

Antígenos O.- Los antígenos O, somáticos, están constituidos de: polisacárido (60%), lípido (20 a 30%), y hexosamina (3.5 a 4.5%). Están presentes en la membrana externa y son responsables de la actividad endotóxica relacionada con las bacterias gramnegativas. La antigenicidad específica de estos antígenos reside en las cadenas laterales específicas O del lipopolisacárido, y depende del tipo de residuos de azúcar, así como de su disposición en la cadena lateral. La reacción de los antígenos O de superficie con el anticuerpo homogéneo produce aglutinación de las células bacterianas, es decir, formación de conglomerados celulares estrechamente adheridos que se manifiestan en forma macroscópica como gránulos finos que se sedimentan rápidamente de la solución y que no se dispersan con facilidad con la agitación. Los an-

tfgenos 0 son resistentes al alcohol y también a ácidos diluidos. (4, 11).

Antfgenos K.- Muchas shigelas producen este tipo de antfge--nos, que son somáticos, que se manifiestan como cápsulas o -envolturas. Se sitúan por encima de los antfgenos 0 de superficie, por esta razón, los antfgenos K bloquean la aglutinación con anticuerpos específicos 0, son polisacáridos y se alteran con el calentamiento, originando cepas aglutinables con antisuero 0. (4, 11)

Antfgenos de las fimbrias.- Shigella como la mayoría de las enterobacterias produce fimbrias o apéndices filamentosos, - los cuales son pequeños y más numerosos que los flagelos. - Las fimbrias no tienen motilidad en un cultivo, tienen propiedades fuertemente adhesivas y su presencia puede demostrarse por su capacidad de producir aglutinación de los eritrocitos. Las bacterias que poseen estos apéndices de superficie también se aglutinan rápidamente en presencia de anticuerpo específico contra fimbrias; reacción parecida a la de aglutinación flagelar. Sin embargo, las células abundantemente fimbriadas no se aglutinan con facilidad por medio de antisueros somáticos, es decir interfieren con la aglutinación 0. La ebullición destruye las fimbrias y las células tratadas en esta forma se vuelven aglutinables con 0. (4, 11)

Variaciones Antigénicas.- La variación de la forma de la colonia lisa a rugosa (variación S-R), se acompaña de una pérdida progresiva del antfgeno 0, lo cual finalmente produce - una cepa bacteriana rugosa (R), cuyo lipopolisacárido carece de cadenas laterales específicas 0, reteniendo solamente la estructura del agregado central. Por tal razón las cepas rugosas no reaccionan con el anticuerpo específico para 0. (4)

1.9 Diagnóstico de laboratorio.

Se sospecha de una infección causada por Shigella, en pacientes con diarrea con o sin fiebre, sobre todo en niños, personas que viven en instituciones con bajas normas higiénicas y turistas que retornan de áreas con bajas normas sanitarias.- Para el diagnóstico de shigelosis es útil el examen de leucocitos que puede hacerse tomando una porción de líquido del excremento, preferentemente conteniendo sangre y moco. Se coloca una gota de excremento en un portaobjeto, se mezcla con dos gotas de una solución de azul de metileno, se coloca un cubreobjetos sobre la preparación y se observa al microscopio en seco fuerte. En la shigelosis los leucocitos polimorfonucleares son usualmente abundantes. El examen sigmoidoscópico del colon en esta infección revela eritema difuso y sensibilidad de la mucosa. Si se presentan úlceras son usualmente superficiales y de un diámetro de 3 a 7 mm. (7)

Para aislamiento de Shigella, como en el caso de cualquier otra enterobacteria, es necesario partir de una muestra de heces recientemente evacuadas o de un hisopo rectal que debe mantenerse en un medio de transporte antes de ser utilizado. Esta muestra puede ser cultivada directamente en medios no inhibitorios como base de agar sangre, agar infusión o agar nutritivo; en medios diferenciales no inhibitorios como agar lactosa azul de bromotimol y lactosa rojo de fenol; en medios diferenciales con poca selectividad como agar Mac Conkey, -- agar Eosina azul de metileno (EMB), agar desoxicolato (LD) y agar celobiosa lisina-arginina (CAL); en medios diferencialmente moderadamente selectivos tales como agar Shigella-Salmonella (SS), agar citrato desoxicolato (DC), agar Hektoen enteric (HE), agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y agar tergitol-7 (T-7). En los medios altamente selectivos como agar sulfito bismuto (BS) y agar verde brillante (BG) no crecen las shigelas. (Ver Diagrama 1). (11)

Las colonias que sugieran Shigella (lactosa negativas), se pueden inocular en agar TSI, LIA, MIO. (Tabla No. 1). Posteriormente las cepas con características bioquímicas de --- Shigella se aglutinan con antisueros polivalentes A, B, C. y D. (1, 7, 11)

Las bases para la tipificación aerológica de Shigella son similares a las de otras enterobacterias, es decir, cada grupo serológico contiene un antígeno principal somático o específico, el cual es característico del grupo. En el caso de -- Shigella la serotipificación completa depende de la identificación de los antígenos 0 y de los de grupo y de tipo. (11)

También es de gran ayuda en ocasiones la utilización de conjugados fluorescentes, para identificación presuntiva rápida de Shigella, tanto en heces, alimentos o cualquier tipo de muestra clínica.

1.10 Técnica de inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia también es conocida como técnica de anticuerpos fluorescentes. En esta técnica las moléculas de anticuerpo se conjugan químicamente a sustancias llamadas -- fluorocromos, sin que se destruya su especificidad inmunológica, y cuando se ponen en contacto con el antígeno homólogo se produce la reacción antígeno anticuerpo. A la observación en el microscopio de luz ultravioleta, el complejo emite un color que dependerá del fluorocromo empleado en la conjugación. (13, 34)

La técnica de anticuerpos fluorescentes (AF), proporciona un instrumento útil y poderoso para detección de antígenos o -- anticuerpos, ya sean fijos en los tejidos, en portaobjetos o libres en solución o suspensión. La fracción de inmunoglobulina que contiene al anticuerpo específico se separa de otras

proteínas del suero, por métodos convencionales de eliminación con sal o por cromatografía en columna. La fracción de inmunoglobulina se conjuga bajo condiciones apropiadas. (4)

La técnica de inmunofluorescencia fue desarrollada, por primera vez por Coons y colaboradores en 1942, quienes utilizaron fluorocromos tales como fluoresceína y rodamina. (13)

Se denomina luminiscencia a la emisión espontánea de luz que ocurre durante el tiempo en que las moléculas regresan a un nivel de energía menor después de un estado de excitación. Cuando esta reversión ocurre a una velocidad máxima de 10^{-8} segundos después de que las moléculas son excitadas por un rayo luminoso, entonces el proceso se llama fluorescencia. Si la reversión toma un tiempo mayor después de que la excitación lumínica ha sido retirada, entonces se llama fosforescencia. (34)

Los colorantes más empleados en la técnica de anticuerpos fluorescentes son:

- a) Los derivados de la fluoresceína.
- b) Los derivados de la rodamina.
- c) Cloruros de I-dimetilaminonaftaleno 5 sulfónico (DANSC)

a) Derivados de la fluoresceína: El isocianato de fluoresceína (ICF) y el isotiocianato de fluoresceína (ITCF) son los únicos derivados de la fluoresceína que han sido empleados con éxito como marcadores de proteínas. Otros derivados como la aminofluoresceína diazotizada y los cloruros ácidos de fluoresceína no producen conjugados óptimos. La fluoresceína tiene una fluorescencia verde amarillenta con un máximo a aproximadamente 550 nm. (13, 34)

La reacción de conjugación colorante a la proteína se da por medio de la sal con el grupo amino libre, principalmente en

el de las lisinas. (70)

b) Derivados de la rodamina: Isocianato e isotiocianato.- Ya que los radicales para unirse a la proteína son iguales - que los de la fluoresceína, se supone que los mismos sitios de unión de la proteína son válidos para la rodamina. La rodamina lisamina B200 o rodamina B tiene una fluorescencia -- anaranjado rojizo con un máximo de aproximadamente a 640 nm. (44, 70)

Esta rodaminalisamina B-200 reacciona con el pentacloruro de fósforo y produce el derivado cloruro de sulfonil.

Las condiciones de unión con la proteína son las mismas que para los isotiocianatos con requerimientos especiales para -- compensar la acidez del cloruro de fósforo empleado en la -- preparación de cloruro. (34)

c) Cloruro de I-dimetilaminonaftaleno 5 sulfónico (DANSC): La reacción toma lugar con el grupo tiol de la cisteína y -- con el grupo fenol de la tirosina. Las condiciones de reacción son similares a las empleadas con los compuestos fluoresceína y rodamina, manteniendo la concentración bajo cierto nivel máximo. (34)

Generalmente se utilizan dos métodos de coloración inmuno-- fluorescente:

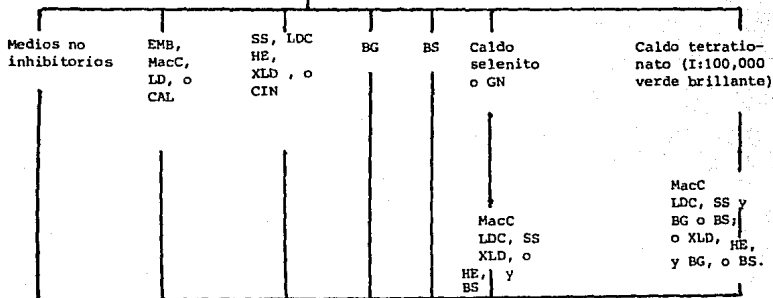
1.- Inmunofluorescencia directa: En este método se emplea - un anticuerpo fluorescente que reacciona directamente con el antígeno que se está estudiando: habitualmente se usa en el laboratorio de diagnóstico para identificar bacterias en cortes de tejido, sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, heces u otras muestras clínicas. (20)

2.- Inmunofluorescencia indirecta: Este es un método que ha

bitualmente se emplea para determinación de los anticuerpos en el suero. En este método, los anticuerpos que van a reaccionar con un antígeno específico son por sí mismos antígenos que reaccionarían con un conjugado específico contra las inmunoglobulinas. Si un antisuero contra globulinas de conejo que ha sido preparado en cabras se marca con fluoresceína, será capaz de reaccionar con las inmunoglobulinas de conejo, aun si estas últimas están unidas a un antígeno. Por este mecanismo, el antígeno se detectará como fluorescente aunque el primer anticuerpo no esté conjugado. (34)

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION PRELIMINAR DE ENTEROBACTERIAS. (11)

Materia Fecal



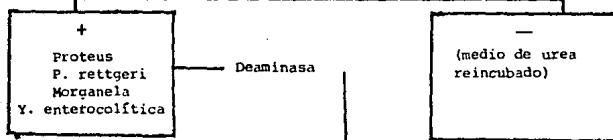
Agar Triple Azúcar Hierro

LIA

MIO

Medio Urea de Christensen

De 2 a 4 horas leer el medio de urea



H₂S +

Antisuero polivalente:
Salmonella

Ident. serológica y
bioquímica confirmada.

Hacer prue-
bas bioquí-
micas.

H₂S -

Antisuero polivalente:
Shicella
Salmonella

Ident. sero-
lógica y bio-
química con-
firmada.

Hacer prue-
bas bioquí-
micas.

Si no se identifica pasar a reaccio-
nes bioquímicas.

TABLA No. 1
REACCIONES BIOQUIMICAS DE LAS SHIGELAS

| PRUEBA O SUBSTRATO | SIGNO | PRUEBA O SUBSTRATO | SIGNO |
|-------------------------|-------|------------------------|-------|
| H ₂ S | - | Rhamnosa | v |
| Ureasa | - | Malonato | - |
| Indol | v | Mucato | - |
| Rojo de metilo | + | Citrato de Christensen | - |
| Voges-Proskauer | - | Tartrato de Jordan | v |
| Citrato de Simmons | - | Pectato de sodio | - |
| KCN | - | Acetato de sodio | - |
| Movilidad | - | Alginato de sodio | - |
| Gelatinasa | - | Lipasas | - |
| Descarboxilación de Lis | - | Aceite de cereal | - |
| Arginina dihidrolasa | v | Tricetina | - |
| Ornitina descarboxilasa | v | Tributirina | - |
| Fenilalamina deaminasa | - | Maltosa | v |
| Acido de la glucosa | + | Xilosa | v |
| Gas de glucosa | - | Trehalosa | v |
| Lactosa | v | Celobiosa | - |
| Sucrosa | v | Glicerol | v |
| Manitol | v | Alfa metil glucosido | - |
| Dulcitol | v | Eritritol | - |
| Salicina | - | Esculina | - |
| Adonitol | - | Beta galactosidasa | v |
| Inositol | - | Nitrato a nitrito | + |
| Sorbitol | v | Oxicación-fermentación | + |
| Arabinosa | v | Oxidasa | - |
| Rafinosa | v | | |

V: variable.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo de técnicas de producción de antisueros y conjugados en el país es necesario, ya que cada vez es más difícil y costosa su importación de otros países.

La preparación de antisueros y conjugados fluorescentes específicos nos ayuda en la identificación de Shigella, ya que dicha bacteria es una de las principales causantes de diarrea en niños, sobre todo de 6 meses a 4 años de edad, siendo por lo tanto una de las principales causas de mortalidad infantil en México.

3. FUNDAMENTACIÓN DE LA ELECCIÓN DEL TEMA

El desarrollo de técnicas de producción de antisueros polivalentes y conjugados fluorescentes para identificación de --- Shigella, es importante, ya que dichas técnicas nos ayudan en el diagnóstico de este microorganismo. Ambas técnicas se deben usar en combinación, para sí dar un diagnóstico más -- acertado.

La identificación rápida, aunque no sea de carácter confirmatorio es una ayuda muy valiosa, tanto a nivel clínico como - epidemiológico ya que con base en estos resultados se pueden tomar medidas de control o de tratamiento antes de tener los resultados definitivos que en la gran mayoría de los casos - serán confirmados.

4. OBJETIVOS

- 1.- Obtención de antisueros para identificación de especie.
- 2.- Preparación de los conjugados fluorescentes a partir de los antisueros.
- 3.- Evaluar los antisueros y conjugados fluorescentes por pruebas de aglutinación e inmunofluorescencia respectivamente.

5. HIPÓTESIS

Es posible la preparación de conjugados fluorescentes a partir de antisueros polivalentes de Shigella, para identificación de dicha bacteria. Con las técnicas convencionales y con los medios disponibles en el país se prepararán conjugados fluorescentes de antisueros polivalentes de Shigella, para identificar dicha bacteria.

6. MATERIAL Y METODOS

I.- Preparación de antisueros polivalentes de Shigella.

- a) Método general para la obtención de cada antígeno.
- b) Inmunización y obtención de los antisueros.
- c) Evaluación de los antisueros.
- d) Acondicionamiento de los antisueros.

II.- Preparación de los conjugados fluorescentes de Shigella.

- a) Precipitación de gamma globulinas con sulfato de amonio.
- b) Conjugación de los antisueros con isotiocianato de - fluoresceína.
- c) Purificación de los conjugados fluorescentes.
- d) Acondicionamiento de los conjugados fluorescentes.
- e) Evaluación de los conjuntos fluorescentes.

I.- PREPARACION DE ANTISUEROS POLIVALENTES DE SHIGELLA.**a) Método general para la obtención de cada antígeno.****Material:**

Algodón

Gasa

Asa y porta asa

Mechero

Cajas de petri

Tubos de 13 x 100

Tubos para centrifuga de 50 ml.

Jeringas estériles de diferentes medidas.

Pipetas de diferentes capacidades.

Matraces erlenmeyer de diferentes capacidades.

Placas de vidrio para aglutinación.

Frascos de 60 ml. tipo antibiótico con tapones de hule estériles y gargolas.

Material biológico:

39 cepas liofilizadas de los diferentes serotipos de Shigella pertenecientes a las 4 especies, (cepas de referencia del CDC de Atlanta).

Equipo:

Balanza granataria

Autoclave

Lámpara

Centrifuga

Refrigerador

Microscopio estereoscópico.

Reactivos:

Solución salina al 0.85% estéril

Benzal

Caldo de soya tripticasa (TSB)

Medio base de agar sangre (BAB)

4 sueros homólogos de referencia de Shigella

Suero normal de conejo

Solución salina formalinizada al 0.3%.

Método:

- 1.- Hidratar la cepa liofilizada de Shigella con 1 ml. de solución salina estéril.
- 2.- Inocular unas gotas en una placa de base de agar sangre, aislar por estría cruzada e incubar a 37°C durante 24 - horas.
- 3.- Observar la placa por medio del microscopio estereoscópico, seleccionar 10 colonias de aspecto liso, las cuales son circulares y presentan bordes enteros, inocular cada una masivamente en placas de base de agar sangre, e incubar a 37°C durante 24 horas.
- 4.- Hacer suspensiones celulares en tubos con 0.25 ml. de solución salina al 0.85% a partir de cada una de las - 10 cepas, guardando una cantidad de crecimiento en la - placa.
- 5.- Poner los tubos de las suspensiones celulares a vapor - fluente durante 2 horas a 100°C y enfriar.
- 6.- Probar las suspensiones celulares por medio de la prueba de aglutinación en placa, con el suero homólogo de - referencia, con solución salina y con suero normal de - conejo. (Ver método de aglutinación en placa, en el --- anexo 1).
- 7.- Seleccionar las cepas que aglutinen mejor con el suero-

homólogo (4+), y no aglutinen con solución salina, ni con suero normal de conejo.

- 8.- Inocular la cepa seleccionada en tubos con 25 ml. de --caldo TSB. Se inoculan 2 tubos por cada cepa. Incubar a 37°C durante 5 a 6 horas.
- 9.- Calentar a vapor fluente los tubos de caldo TSB durante 2 horas a 100°C.
- 10.- Colocar los tubos en refrigeración durante 24 horas.
- 11.- Centrifugar a 3500 r.p.m. durante media hora, descartar el sobrenadante y resuspender las células con solución salina formalinizada al 0.3%.

Para preparar la vacuna de Shigella dysenteriae se hacen dos mezclas; una mezcla está formada por volúmenes iguales de solución de los serotipos 1, 2, y 3, y la otra mezcla se forma por volúmenes iguales de solución de serotipos 4, 5, 6, y 7 de dicha Shigella (A).

Para preparar la vacuna de Shigella flexneri se hacen 3 mezclas: la primera mezcla se forma de volúmenes iguales de solución de los serotipos 1a, 1b, 2a y 2b, la segunda se forma por volúmenes iguales de los serotipos 3a, 3b, 3c, y la tercera se forma por volúmenes iguales a los serotipos 4a, 4b, 5 y 6 de dicha Shigella (B).

Para preparar la vacuna de Shigella boydii se hacen 2 mezclas: una mezcla se forma por volúmenes iguales de los serotipos 1, 2 y 3, y la otra mezcla se forma por volúmenes iguales de -- los serotipos 4, 5, 6 y 7 de dicha Shigella (C).

Para preparar la vacuna de Shigella sonnei se hace una mezcla de volúmenes iguales de la forma I y II de la Shigella (D).

- 13) Mantener la vacuna en refrigeración durante todo el período de inmunización.

b) Inmunización y obtención de los antisueros.

Material:

Algodón.
Tubos de centrifuga de 50 ml.
Gradillas.
Jeringas estériles de diferentes medidas.
Caja para inoculación.
Tabla de sangrar.
Placa de vidrio para aglutinación.
Cajas de petri.
Asa y porta asa.
Mechero.
Frasco de 250 ml. con tapón de rosca.
Equipo millipore para filtración.

Material biológico:

Antígenos polivalentes A, B, C y D de Shigella
40 conejos de 2-3 Kg.

Equipo:

Balanza granataria.
Centrifuga.
Incubadora.
Refrigerador.

Reactivos:

Solución salina al 0.85%.
Benzal.
Alcohol.
Medio de base de agar sangre.
Cloroformo.

Esquema de Inmunización:

- 1.- Inmunizar 5 conejos por cada una de las mezclas de antígenos.
- 2.- Efectuar las inoculaciones con intervalos de 4 a 5 días, usando las dosis siguientes:
 - 1a.- 0.25 ml.
 - 2a.- 0.5 ml.
 - 3a.- 1.0 ml.
 - 4a.- 2.0 ml.
 - 5a.- 4.0 ml.
 - 6a.- 4.0 ml.

Las inoculaciones se hacen en la vena marginal de la -- oreja del conejo. (Siguiendo el método que se describe en el Anexo 2.).

- 3.- Hacer sangría de prueba de 5 a 7 días después de la última inoculación para checar el título de anticuerpos -- con cada uno de los serotipos de los cuales está formada la vacuna, de la siguiente manera:
 - a) Centrifugar la sangre a 3500 r.p.m. durante 5 min. y -- separar el suero.
 - b) Hacer diluciones dobles del antisuero y titularlo por -- medio de la prueba de aglutinación en placa, para lo -- cual previamente se han inoculado las cepas de Shigella en medio base de agar sangre.
 - c) Si el título no es satisfactorio deben hacerse dos inoculaciones adicionales de 4 ml. cada una.
- 4.- Sangrar a los conejos por vía intracardiaca, de 5 a 7 -- días después de la última inmunización.

- 5.- Centrifugar la sangre a 3500 r.p.m. durante 20 min. y - separar el suero por medio de una pipeta pasteur.
- 6.- Filtrar y guardar los sueros en botellas estériles, dentro del refrigerador, hasta el momento de la evaluación.

c) Evaluación de los antisueros.

Material:

Algodón.
Gasa.
Asa y porta asa.
Mechero.
Cajas de petri.
Tubos de ensayo.
Pipetas de diferentes capacidades.
Placas de vidrio para aglutinación.
Gradillas.

Material biológico:

Colección de cepas de todos los serotipos de -
Shigella.

Equipo:

Incubadora.
Balanza granataria.
Autoclave.
Lámpara.
Refrigerador.

Reactivos:

Solución salina al 0.85%.
Benzal.
Medio base de agar sangre.
Antisueros polivalentes de cada especie de --
Shigella.

Método:

- 1.- Sembrar masivamente cada una de las cepas lisas de ---
Shigella en una placa de base de agar sangre, e incubar
a 37°C durante 24 horas.

- 2.- Hacer suspensiones gruesas de cada una de las cepas, en 0.25 ml. de solución salina al 0.85%.
- 3.- Hacer diluciones dobles de antisuero a partir de 1:2 -- hasta que ya no haya aglutinación, para determinar el título del antisuero con cada uno de los serotipos de Shigella, seguir el método de aglutinación en placa descrita posteriormente.
- 4.- Usar el antisuero a la solución a la cual da una aglutinación de 3+ a 4+ en 1 min.

d) Acondicionamiento de los antisueros.

Material:

Filtros.
Membranas millipore.
Equipo para filtración al vacío.
Frascos tipo antibiótico de 3 ml. estériles.
Tapones de hule estériles.
Gargolas.
Probetas.
Jeringas de 20 ml. estériles.
Algodón.
Mechero.
Etiquetas.

Reactivos:

Benzal.
Alcohol.
Glicerina estéril.

Método:

- 1.- Clarificar el suero pasándolo a través de membrana millipore de 0.8 micras.
- 2.- Medir el volumen del suero y agregar el mismo volumen de glicerina estéril, agitar esta mezcla hasta homogenizarla.
- 3.- Esterilizar el suero pasándolo por membrana de 0.45 y posteriormente por 0.22 micras.
- 4.- Envasar en condiciones de esterilidad en viales de 3 ml. colocando 2 ml. en cada uno.
- 5.- Engargolarlos y etiquetarlos perfectamente de la siguiente forma:

Antisuero Shigella dysenteriae

Lote.- 1-86

Usar: 1:8

Conservador: glicerol 50%

6.- Mantener las viales en refrigeración de 4 a 6°C.

II.- PREPARACION DE CONJUGADOS FLUORESCENTES DE SHIGELLA.

a) Precipitación de gamma globulinas con sulfato de amonio.

Material:

Barras magnéticas.
Probetas de diferentes medidas.
Pipetas de diferentes medidas.
Vasos de precipitado de diferentes tamaños.
Membrana para diálisis.
Matraces erlenmeyer de diferentes capacidades.
Matraces aforados de diferentes capacidades.

Equipo:

Balanza granataria.
Balanza analítica.
Refrigerador.
Centrífuga.
Potenciometro.
Placa de agitación.

Reactivos:

Antisueños de Shigella (A, B, C y D).
Solución saturada de sulfato de amonio (pH 7.6)
Agua destilada.
Solución buffer de referencia pH 7.0
Solución de cloruro de bario al 5%.
Solución buffer de acetatos (pH 4.5)
Solución de NaOH IN
Hidróxido de amonio concentrado.
Solución buffer de fosfatos salino (PBS pH 7.6)
Solución de merthiolate 1:100.

Método:

- 1.- Medir el volumen de antisuero polivalente, determinar el pH y ajustar a 7.6 con solución buffer de acetatos (pH 4.5), ajustar el pH de la solución saturada de sulfato de amonio a 7.6 con solución de hidróxido de amonio y el pH de la solución salina 0.85% a pH 7.6 con NaOH IN.
- 2.- Mantener el antisuero en agitación constante mediante una placa de agitación magnética, agregar el sulfato de amonio gota a gota hasta completar un volumen igual a la mitad del volumen inicial del suero.
- 3.- Ajustar el pH a 7.6 con solución de NaOH IN.
- 4.- Agitar durante 15 min.
- 5.- Centrifugar a 3500 r.p.m. durante media hora.
- 6.- Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento con solución salina al 0.85%, agregando un volumen igual al volumen inicial de suero.
- 7.- Agregar un volumen igual de sulfato de amonio pH 7.6
- 8.- Ajustar el pH a 7.6 con solución de NaOH IN.
- 9.- Agitar durante 15 min.
- 10.- Repetir el mismo procedimiento 3 veces.
- 11.- La última vez se resuspende el precipitado en un pequeño volumen de solución salina al 0.85% pH 7.6.
- 12.- Colocar la suspensión en una bolsa de diálisis, dializar contra PBS pH 7.6 a 4°C.

- 13.- Hacer dos cambios de PBS durante el día, hasta que se hayan eliminado todos los iones, verificando mediante la reacción con BaCl_2 (a 1 ml. de PBS se le agrega 1 ml. de BaCl_2 al 5%), cuando ya no se forme precipitado blanco, la diálisis ha terminado.
- 14.- Medir el volumen de gamma globulinas y agregar merthiolate a una concentración 1:10,000.
- 15.- Sellar el frasco y mantener en refrigeración hasta el momento de la conjugación.

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY
(FOLIN CIOCALTEAU)

Material:

Tubos de 13 x 100.
Pipetas.
Probetas.
Gradilla.
Matraces erlenmeyer.
Agitador vortex.

Equipo:

Balanza analítica.
Espectrofotómetro.

Reactivos:

Standar de protefna (0.5 mg/ml.)
Solución salina al 0.85%
Suero polivalente.
Gamma globulinas.
Reactivo de folin (B)

Reactivo A₁.- Tartrato de sodio ($\text{NaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)..... 2.0 g.
Agua destilada para 100 ml.

Reactivo A₂.- Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)..... 1.0 g.
Agua destilada para 100 ml.

Reactivo A₃.- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)..... 20 g.
Hidróxido de sodio 0.1 N1000 ml.

Reactivo A, mezclar: A₁.- 0.5 ml.
A₂.- 0.5 ml.
A₃.- 50 ml.

METODO PARA REALIZAR LA CURVA PARA DETERMINACION DE PROTEINAS
POR LOWRY

| TUBOS | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|
| ml. STD | - | - | 0.02 | 0.04 | 0.06 | 0.10 | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.5 | 1.0 | - |
| ml. salina | 0.4 | 0.4 | 0.38 | 0.36 | 0.34 | 0.30 | 0.20 | 0.10 | - | - | - | - |
| ml. muestra | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.4 |
| Reactivo A | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Mezclar y agitar, dejar reposando 10 min. a temperatura ambiente. | | | | | | | | | | | | |
| ml. Reac. B | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Agitar en el vortex y dejar reposar a temperatura ambiente 30 min. Leer a 500 nm. | | | | | | | | | | | | |

- b) Conjugación del antisuero con isotiocianato de fluoresceína.

Material:

Vasos de precipitado.
 Probetas.
 Pipetas.
 Agitador magnético.
 Papel aluminio.

Equipo:

Refrigerador.
 Potenciometro.
 Placa de agitación.
 Balanza analítica.

Reactivos:

Gamma globulinas de las 4 especies de Shigella.
 Buffer de carbonatos pH 9.5 0.5 M.
 Isotiocianato de fluoresceína isomero 1 (sigma).
 Solución salina al 0.85%

Método:

- 1.- Pesar el isotiocianato en la balanza analítica (0.01 mg. de isotiocianato por cada mg. de proteína).
- 2.- Diluir la solución de globulinas con solución salina -- hasta obtener una concentración final de proteínas de 2 a 3%.
- 3.- Ajustar el pH de la solución de globulinas de 9.0 a 9.5 con una mezcla de partes iguales de soluciones de carbo nato y bicarbonato de sodio 0.5 M.
- 4.- Colocar la solución de globulinas en un vaso de precipitado, sobre una placa de agitación, con un agitador mag

nético, agregar el isotiocianato de fluoresceína y cubrir el vaso con papel aluminio, en el cuarto frío y dejar agitando lentamente durante toda la noche.

c) Purificación de los conjugados fluorescentes.

Material:

Columna cromatográfica de 100 cm. de altura --
x 2 cm. de diámetro.
Soporte para la columna.
Pinzas de bureta.
Matraces erlenmeyer.
Pipetas.
Vasos de precipitado.

Equipo:

Potenciometro.
Placa de agitación.
Balanza granataria.

Reactivos:

Conjugados fluorescentes de las 4 especies de Shigella.
Buffer salino de fosfatos pH 7.0 a 7.6 (PBS).
Agua destilada.
Gel de Sephadex G-50 fino.
Acido clorhídrico IN.
Hidróxido de sodio 0.2 N.

Método:

- 1.- Hidratar el Sephadex G-50 fino con agua destilada, hacer varios lavados con PBS pH 7.6, hasta eliminar partículas finas. Posteriormente hacer varios lavados con solución de PBS hasta ajustar el pH del sobrenadante a un pH de 7.0 a 7.6.
- 2.- Llenar la columna por las paredes, procurando que no se formen burbujas de aire, dejar sedimentar y no dejar -- que se seque el gel.

- 3.- Pasar PBS a través de la columna, ajustar al mismo tiempo el flujo de la columna el cual no debe exceder de 2 ml. por cada 5 min.
- 4.- Pasar a través de esta columna no más de 30 ml. de conjugado fluorescente.
- 5.- Adicionar cuidadosamente el conjugado con el fin de evitar que rebote el gel. Cuando todo el material ha penetrado en el Sephadex empezar a agregar PBS. El material que pasa por la columna se separa en 2 bandas de color amarillo, presentándose una banda intermedia del color del gel o amarillo muy pálido, la banda que llega primero a la salida de la columna, es el conjugado.
- 6.- Tirar las primeras gotas, las cuales salen diluidas, y recoger la fracción más colorida. Dializar contra PBS durante una noche.
- 7.- La segunda banda es fluoresceína no conjugada que puede eliminarse de la columna lavando con PBS.
- 8.- Desmontar la columna. Este Sephadex puede limpiarse -- lavándolo varias veces con agua, después con ácido clorhídrico IN hasta que casi se elimina todo el color amarillo, por último lavarlo con hidróxido de sodio 0.2 N, enjuagar con agua varias veces, y así se puede volver a usar.
- 9.- Guardar el conjugado, agregándole como conservador merthiolate, una concentración 1:10,000.

d) Acondicionamiento de los conjugados fluorescentes.

Material:

Viales estériles de 3 ml.
Pipetas.
Tapones de hule estériles.
Pinzas.
Retapas de aluminio.
Etiquetas.
Tubos para centrífuga.

Equipo:

Liofilizadora.
Engargoladora.
Refrigerador.
Centrífuga refrigerada.

Método:

- 1.- Verificar que el conjugado no tenga sedimento y si lo tiene centrifugar a 5,000 r.p.m. durante 20 min. a 4°C.
- 2.- Desechar el sedimento y separar el sobrenadante y colocar 0.5 ml. de conjugado fluorescente en cada vial, taparlos y etiquetarlos.
- 3.- Liofilizarlos y engargolarlos.
- 4.- Colocarlos dentro del cuarto frío o en el refrigerador a 4°C.

- e) Evaluación de los conjugados fluorescentes - técnica directa.

Material:

Algodón.
Asa y porta asa.
Mechero.
Cajas de petri.
Tubos de 13 x 100.
Jeringas estériles.
Pipetas automáticas.
Portaobjetos.
Papel adhesivo.

Equipo:

Autoclave.
Lámpara.
Refrigerador.
Microscopio estereoscópico.
Microscopio de fluorescencia.

Reactivos:

Solución salina al 0.85% estéril.
Benzal.
Caldo de soya tripticasa (TSB)
Medio base de agar sangre (BAB)
Sueros homólogos de referencia (A, B, C y D)
Suero normal de conejo.
Solución salina formalinizada al 0.3%
Metanol
Glicerina tamponada.
Solución buffer de fosfatos pH 7.5.

Material biológico:

Colección de cepas de todos los serotipos de -
Shingella.

- Método de preparación de antígenos.

Para llevar a cabo la técnica es necesario contar con antígenos y anticuerpos marcados. Los antígenos se fijan en un portaobjetos y posteriormente se agrega el anticuerpo marcado.

- 1.- Aislar por estría cruzada cada uno de los serotipos de Shigella, que formaron inicialmente la vacuna de inmunización, en una placa de BAB, incubar a 37°C durante 24 horas.
- 2.- Observar la placa por medio de microscopio estereoscópico, seleccionar 10 colonias de aspecto liso, las cuales son circulares y presentan bordes enteros, inocular cada una masivamente en placas de BAB, e incubar a 37°C durante 24 horas.
- 3.- Hacer suspensiones celulares en tubos con 0.25 ml. de solución salina al 0.85%, a partir de cada una de las 10 cepas, guardando una cantidad de crecimiento en la placa.
- 4.- Poner a vapor fluente los tubos de las suspensiones celulares durante 2 horas a 100°C y enfriar.
- 5.- Probar las suspensiones celulares por medio de la prueba de aglutinación en placa, con el suero homólogo, -- con solución salina y con suero normal de conejo. (Ver método de aglutinación en placa en el anexo 1.).
- 6.- Seleccionar las cepas que aglutinen mejor con el suero homólogo (4+), y no aglutinen ni con solución salina, ni con suero normal de conejo.
- 7.- Inocular la cepa seleccionada en tubos con 5 ml. de -- caldo TSB, e incubar a 37°C durante 5 a 6 horas, inac-

tivar el crecimiento con 0.01 ml. de solución salina -- formalinizada.

8.- Preparar 4 mezclas de antígenos de la siguiente manera:

- a) Mezclar los 7 serotipos de Shigella dysenteriae (A)
- b) Mezclar los 6 serotipos de Shigella flexneri (B)
- c) Mezclar los 7 serotipos de Shigella boydii (C)
- d) Mezclar las 2 formas de Shigella sonnei (D)

- Método para hacer los frotis.

- 1.- Colocar papel adhesivo con 10 oradaciones sobre portaobjetos.
- 2.- Colocar 10 microlitros de cada antígeno en cada pozo.
- 3.- Dejar secar a temperatura ambiente.
- 4.- Fijar en metanol a 4°C durante 10 min.

- Titulación de los conjugados.

Para determinar la dilución a la cual deben utilizarse los - conjugados se sigue este procedimiento:

- 1.- Hacer diluciones del conjugado fluorescente en solución salina (1:2, 1:4, 1:6 y 1:8).
- 2.- Colocar una gota de cada dilución de conjugado hasta cubrir cada uno de los pozos, donde se encuentra el antígeno que se desea evaluar. (Ver el siguiente esquema):

| Sindil. | 1:2 | 1:4 | 1:6 | 1:8 |
|---------|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Sol.sal. 1:2 1:4 1:6 1:8

Frotis de S.dysenteriae

(1 - 7)

| Sindil. | 1:2 | 1:4 | 1:6 | 1:8 |
|---------|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Sol.sal. 1:2 1:4 1:6 1:8

Frotis de S.flexneri

(1 - 6)

| Sindil. | 1:2 | 1:4 | 1:6 | 1:8 |
|---------|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Sol.sal. 1:2 1:4 1:6 1:8

Frotis de S.boydii (1 - 7)

| Sindil. | 1:2 | 1:4 | 1:6 | 1:8 |
|---------|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Sol.sal. 1:2 1:4 1:6 1:8

Frotis de S.sonnei (I y II)

- 3.- Incubar en una cámara húmeda durante una hora a 37°C, - evitando que se sequen los frotis.
- 4.- Lavar durante 10 min. con solución buffer de fosfatos - pH 7.5 con agitación.
- 5.- Enjuagar los frotis en agua destilada durante 5 min. -- con agitación.
- 6.- Dejar secar a temperatura ambiente.
- 7.- Montar las preparaciones con glicerina tamponada y colocar encima un cubreobjetos.
- 8.- Observar al microscopio de fluorescencia.
- 9.- Reportar por medio de cruces la intensidad de fluorescencia para saber el título del conjugado.
- 10.- Usar el conjugado a la dilución más alta en la cual --- todavía se observa una intensidad de fluorescencia de 3 a 4+.

Nota: Si el conjugado ya se ha liofilizado, para evaluarlo - es necesario hidratarlo a su volumen original con solu-
ción salina al 0.85%.

7. RESULTADOS

Obtención de antisueros polivalentes para identificación de grupo.

- Antisuero Grupo A.

Se inmunizaron 5 conejos con una mezcla de antígeno de S. dysenteriae 1, 2 y 3, y otros 5 conejos con una mezcla de antígeno de S. dysenteriae 4, 5, 6 y 7, de los cuales se obtuvieron 430 ml. de antisuero total. Para la obtención del antisuero polivalente se mezclaron 210 ml. de antisuero de S. dysenteriae 1, 2, 3 con 210 ml. del antisuero de S. dysenteriae 4, 5, 6 y 7, obteniéndose en total 420 ml. de antisuero polivalente, el volumen restante fue almacenado a 4°C. Después de la evaluación la cual se describe en las tablas 1 y 2, se determinó como dilución de uso 1:2, agregando glicerol al 50% las reacciones cruzadas que son muy discretas se enmascaran por lo que se recomienda utilizarlo en esta forma.

- Antisuero Grupo B.

Se inmunizaron 5 conejos con una mezcla de antígeno de S. flexneri 1a, 1b, 2a y 2b, 5 conejos con una mezcla de antígeno de S. flexneri 4a, 4b, 5 y 6, se obtuvieron 570 ml. de antisuero. Para la obtención del antisuero polivalente se mezclaron 190 ml. de cada uno de los 3 antisueros, obteniéndose en total 570 ml de antisuero polivalente B. La evaluación de este antisuero se puede observar en las tablas 3 y 4, la dilución recomendada para su uso es de 1:8. Se agregó glicerol al 50% y no se observó alteración en el título con los antígenos homólogos, y las reacciones cruzadas se enmascararon, por lo cual se utilizó este como conservador.

- Antisuero Grupo C.

Se inmunizaron 5 conejos con una mezcla de antígeno de S. boydii 1, 2 y 3, otros 5 conejos con una mezcla de antígeno de S. boydii 4, 5, 6 y 7, de los cuales se obtuvieron 420 ml. de antisuero total. Para la obtención del antisuero polivalente se mezclaron 160 ml. de cada uno de los 2 antisueños, obteniéndose en total 320 ml. de antisuero polivalente-C, el volumen restante fue almacenado a 4°C. La evaluación de este antisuero se puede observar en las tablas 6 y 7, la dilución de uso recomendada es 1:2, agregando glicerol al -- 50% las reacciones cruzadas no se observan, por lo que se recomienda conservarlo en esta forma.

- Antisuero Grupo D.

Se inmunizaron 5 conejos con una mezcla de antígeno de S. sonnei I y II y se obtuvieron 220 ml. de antisuero. La evaluación de este antisuero se puede observar en las tablas 8 y 9, el antisuero debe utilizarse a una dilución 1:8, agregando glicerol al 50% las reacciones cruzadas no se observan, por lo que puede conservarse en esta forma.

Obtención de los Conjugados Fluorescentes.

- Conjugado anti Shigella dysenteriae.

Utilizando el método ya descrito para fraccionamiento del suero, a partir de 100 ml. de antisuero del grupo A, se obtuvieron los siguientes resultados: 44 ml. de gamma globulina, cuya concentración protéica fue 1.02%. (Ver tabla No. 10). - En esta misma tabla se observa que al conjugar los 44 ml. de gamma globulinas con isotiocianato de fluoresceína se obtuvieron 70 ml. de conjugado fluorescente, el cual al titularse por la técnica de inmunofluorescencia, presentó una intensidad de fluorescencia de 3+, a una dilución 1:4 (ver tabla-11).

- Conjugado anti Shigella flexneri.

Se fraccionaron 200 ml. de antisuero S. flexneri, se obtuvieron 60 ml. de gamma globulinas cuya concentración protéica fue 2.28% (ver la tabla No. 10), las cuales al titularse por la prueba de aglutinación en placa presentaron 4+ a un título de 1:8, que se mantuvo igual que el del antisuero antes de la precipitación como se puede apreciar en las tablas 4 y 5.

Al conjugar los 60 ml. de gamma globulinas con isotiocianato de fluoresceína, se obtuvieron 85 ml. de conjugado fluorescente, el cual al titularse por la técnica de inmunofluorescencia presentó una intensidad de fluorescencia de 4+ a un título de 1:2 (ver la tabla No. 12).

- Conjugado anti Shigella boydii.

Se fraccionaron 100 ml. de antisuero S. boydii, de los cuales se obtuvieron 56 ml. de gamma globulinas cuya concentración protéica fue 2.5% (ver la tabla No. 10).

Al conjugar los 56 ml. de gamma globulinas con isotiocianato de fluoresceína se obtuvieron 200 ml. de conjugado fluorescente, el cual al titularse por la técnica de inmunofluorescencia presentó una intensidad de fluorescencia de 3+ a un título de 1:4 (ver la tabla No. 13).

- Conjugado anti Shigella sonnei.

Se fraccionaron 100 ml. de antisuero de S. sonnei, del proceso se obtuvieron 30 ml. de gamma globulinas, cuya concentración protéica fue 2.15% (ver la tabla No. 10), las cuales al titularse por la prueba de aglutinación en placa presentaron 3+ a un título de 1:8, que se mantuvo igual al del antisuero antes de la precipitación (ver las tablas 9 y 14).

Al conjugar los 30 ml. de gamma globulinas con isotiocianato de fluoresceína se obtuvieron 30 ml. de conjugado fluorescente, el cual al titularse por la técnica de inmunofluorescencia presentó una intensidad de fluorescencia de 4+ a un título de 1:4 (ver la tabla No. 15).

El volumen restante de cada antisuero polivalente fue almacenado a 4°C con glicerol al 50%, el cual podrá utilizarse en la identificación de cada grupo específico de shigella por la técnica de aglutinación en placa.

Aunque los antisueros se evaluaron con cepas de referencia se planteó el siguiente estudio para confirmar su utilidad, en el cual 39 cepas de Shigella previamente identificadas en el Laboratorio de Enterobacterias del ISET, se identificaron serológicamente con los antisueros producidos, esta identificación se llevó a cabo en forma ciega, es decir con una clave sin tener conocimiento de la forma en que se habían clasificado. Los resultados se muestran en la tabla No. 16, donde se puede observar que de las 39 cepas, en 38 ocasiones -- los resultados coincidieron con los previamente obtenidos --

por el Laboratorio de Enterobacterias, donde utilizaron --- otros sueros para su identificación.

En la tabla No. 10 se muestra un resumen de los resultados - obtenidos durante todo el proceso efectuado en la preparación de antisueros polivalentes y conjugados fluorescentes para - la identificación de Shigella.

Es importante mencionar que siempre se checaron las cepas -- con solución salina y suero normal de conejo, para comprobar que se encontraran en la forma lisa.

TABLA No. 1

EVALUACION DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE SHIGELLA DYSENTERIAE
(1 A 7)

| ANTIGENOS | ANTISUERO | | | | | |
|------------------------------------|------------|-----|-----|-----|------|------|
| | sin diluir | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 |
| <u>S.dysenteriae</u> 1. | 4+ | 4+ | 3+ | 1+ | tr | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 2. | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 3. | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 4. | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 5. | 4+ | 4+ | 3+ | 1+ | - | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 6. | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 7. | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.dysenteriae</u> (8ab - 10) | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> (1a - 6) | 1+ | tr | - | - | - | - |
| <u>S.boydii</u> (1 - 15) | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> I. | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> II. | tr | tr | tr | tr | tr | tr |

Título recomendado 1:2

(4+).- 100% de aglutinación.

(3+).- 75% de aglutinación.

(2+).- 50% de aglutinación.

(1+).- 25% de aglutinación.

(tr).- trazas de aglutinación.

(-).- aglutinación negativa.

TABLA No. 2

EVALUACION DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE SHIGELLA DYSENTERIAE
(1 A 7) - UTILIZANDO SUERO CON GLICEROL AL 50%

| ANTIGENOS | ANTISUERO | | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|------|
| | Suero con glicerol al 50% (1:2) | 1:3 | 1:4 | 1:8 | 1:16 |
| <u>S.dysenteriae</u> 1. | 4+ | 3+ | 3+ | tr | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 2. | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 3. | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 4. | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 5. | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 6. | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.dysenteriae</u> 7. | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.dysenteriae</u> (8ab - 10) | - | - | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> (1 - 6) | - | - | - | - | - |
| <u>S. boydii</u> (1 - 15) | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> I. | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> II. | tr | tr | tr | tr | tr |

Título recomendable: 1:2

Se recomienda un título 1:2 debido a que con algunas cepas como Shigella dysenteriae 4 y 6, al diluirlo 1:3 se observa una reacción de 2+ que en ocasiones puede causar confusión.

TABLA No. 3

EVALUACION DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE SHIGELLA FLEXNERI

(1 - 6)

| ANTIGENOS | ANTISUEROS | | | | | | | | |
|----------------------------------|------------|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
| | Sin diluir | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 |
| <u>S.dysenteriae</u> (1 - 10) | tr | tr | - | | | | | | |
| <u>S.flexneri</u> 1a | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 1b | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | 1+ | tr | - |
| <u>S.flexneri</u> 2a | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 2b | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 3a | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.flexneri</u> 3b | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | 1+ | tr | - |
| <u>S.flexneri</u> 3c | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 3+ | 2+ | 1+ | - |
| <u>S.flexneri</u> 4a | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 4b | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 3+ | 1+ | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 5 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | 1+ | tr | - |
| <u>S.flexneri</u> 6 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.boydii</u> (1 - 15) | tr | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> I. | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.Sonnei</u> II. | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr |

Titulo recomendable: 1:8

TABLA No. 4

EVALUACION DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE SHIGELLA FLEXNERI (1-6)
UTILIZANDO SUERO CON GLICEROL AL 50%

| ANTIGENOS | ANTISUERO | | | | | | | |
|----------------------------------|---------------------------|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
| | Suero c/glic.50% (1:2) | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 |
| <u>S.dysenteriae</u> (1 - 10) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 1a | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | 1+ | tr | - |
| <u>S.flexneri</u> 1b | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | 1+ | tr | - |
| <u>S.flexneri</u> 2a | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | 1+ | tr | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 2b | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | tr | - |
| <u>S.Flexneri</u> 3a | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.Flexneri</u> 3b | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.Flexneri</u> 3c | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 3+ | tr | - |
| <u>S.Flexneri</u> 4a | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - | - |
| <u>S.Flexneri</u> 4b | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | 1+ | - | - |
| <u>S.Flexneri</u> 5 | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | 1+ | - | - |
| <u>S.Flexneri</u> 6 | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.Boydii</u> (1 - 15) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> I. | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> II. | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr |

Título recomendado: 1:8

TABLA No. 5

EVALUACION DE LAS GAMMA-GLOBULINAS DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE
S.FLEXNERI

| ANTIGENO | Gamma globulina sin diluir | DILUCIONES | | | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|------------|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
| | | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 |
| <u>S.dysenteriae</u> (1 - 10) | tr | tr | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 1a | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 1b | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.flexneri</u> 2a | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | tr | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 2b | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 3a | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 3b | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 3c | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.flexneri</u> 4a | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | tr | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 4b | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 5 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 1+ | tr | - | - |
| <u>S.flexneri</u> 6 | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.boydii</u> (1 - 15) | tr | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> I. | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> II. | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr | tr |

Título recomendado: 1:8

TABLA No. 6

EVALUACION DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE SHIGELLA BOYDII (1-7)

| ANTIGENO | ANTISUERO | | | | | |
|----------------------------------|------------|-----|-----|-----|------|------|
| | Sin diluir | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 |
| <u>S.dysenteriae</u> (1 - 10) | tr | - | - | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> (1 - 6) | tr | tr | - | | | |
| <u>S.boydii</u> 1. | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.boydii</u> 2. | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.boydii</u> 3. | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.boydii</u> 4. | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | tr | - |
| <u>S.boydii</u> 5. | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - | - |
| <u>S.boydii</u> 6. | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 1+ | - |
| <u>S.Boydii</u> 7. | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | 1+ | - |
| <u>S.Boydii</u> (8 - 15) | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> I. | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> II. | tr | tr | tr | tr | tr | tr |

Título recomendado 1:2

TABLA No. 7

EVALUACION DEL ANTISUERO POLIVALENTE DE SHIGELLA BOYDII

(1 - 7) - UTILIZANDO SUERO CON GLICEROL AL 50%

| ANTIGENOS | ANTISUERO | | | | |
|----------------------------------|---------------------------|-----|-----|-----|------|
| | Suero c/glic.50% (1:2) | 1:3 | 1:4 | 1:8 | 1:16 |
| <u>S.dysenteriae</u> (1 - 10) | - | - | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> (1 - 6) | tr | - | - | - | - |
| <u>S.boydii</u> 1. | 4+ | 2+ | 2+ | - | - |
| <u>S.boydii</u> 2. | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.boydii</u> 3. | 4+ | 3+ | 2+ | - | - |
| <u>S.boydii</u> 4. | 4+ | 4+ | 3+ | tr | - |
| <u>S.boydii</u> 5. | 4+ | 4+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.boydii</u> 6. | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 1+ |
| <u>S.boydii</u> 7. | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | tr |
| <u>S.boydii</u> (8 - 15) | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> I. | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> II. | tr | tr | tr | tr | tr |

Título recomendado 1:2

TABLA No. 8

EVALUACION DEL ANTISUERO DE SHIGELLA SONNEI I Y II

| ANTIGENOS | ANTISUERO | | | | | | |
|-------------------------------|------------|-----|-----|-----|------|------|------|
| | Sin diluir | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| <u>S.dysenteriae</u> (1 - 10) | tr | tr | - | - | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> (1 - 6) | tr | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.boydii</u> (1 - 15) | tr | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> I. | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.sonnei</u> II. | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 1+ | tr | tr |

Título recomendado: 1:8

TABLA No. 9

EVALUACION DEL ANTISUERO DE SHIGELLA SONNEI I Y II
UTILIZANDO SUERO CON GLICEROL AL 50%

| ANTIGENOS | ANTISUERO | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|-----|-----|------|------|------|
| | Suero con glic. 50% (1:2) | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| <u>S.dysenteriae</u> (1-10) | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.flexneri</u> (1-6) | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.boydii</u> (1-15) | - | - | - | - | - | - |
| <u>S.sonnei</u> I. | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | tr | - |
| <u>S.sonnei</u> II. | 4+ | 4+ | 3+ | 1+ | tr | tr |

Título recomendado: 1:8

TABLA No. 10

RESUMEN DE RESULTADOS

| GRUPO | A | B | C | D |
|--------------------------------------|------|------|------|------|
| Vol. de antisuero (ml.) | 420 | 570 | 320 | 220 |
| Título de antisuero. | 1:2 | 1:8 | 1:2 | 1:8 |
| Vol. de suero precipitado (ml.) | 100 | 200 | 100 | 100 |
| Conc. de prot. del suero (%) | 6.95 | 5.25 | 7.14 | 5.92 |
| Conc. de prot. frac. gamma (%) | 1.02 | 2.28 | 2.5 | 2.15 |
| Vol. de gamma globulinas (ml.) | 44 | 60 | 56 | 30 |
| Título de las gamma -- globulinas. | - | 1:8 | - | 1:8 |
| Vol. de conjugado fluorescente (ml.) | 70 | 85 | 200 | 30 |
| Título de conjugado -- fluorescente. | 1:4 | 1:2 | 1:4 | 1:4 |
| Intensidad de fluorescencia. | 3+ | 4+ | 3+ | 4+ |

TABLA No. 11

TITULACION DEL CONJUGADO FLUORESCENTE DE S.DYSENTERIAE

| MEZCLA DE ANTIGENOS | CONJUGADO F. SIN DILUIR | DILUCIONES | | | |
|----------------------------|----------------------------|------------|-----|-----|-----|
| | | 1:2 | 1:4 | 1:6 | 1:8 |
| <u>S.dysenteriae</u> (1-7) | 4+ | 4+ | 3+ | 2+ | 1+ |

Título recomendado: 1:4

TABLA No. 12

TITULACION DEL CONJUGADO FLUORESCENTE DE S.FLEXNERI

| MEZCLA DE ANTIGENOS | CONJUGADO F SIN DILUIR | DILUCIONES | |
|-------------------------|---------------------------|------------|-----|
| | | 1:2 | 1:4 |
| <u>S.flexneri</u> (1-6) | 4+ | 4+ | 2+ |

Título recomendado: 1:2

TABLA No. 13

TITULACION DEL CONJUGADO FLUORESCENTE DE S.BOYDII

| MEZCLA DE ANTIGENOS | CONJUGADO F SIN DILUIR | DILUCIONES | | | |
|-------------------------|---------------------------|------------|-----|-----|-----|
| | | 1:2 | 1:4 | 1:6 | 1:8 |
| <u>S.boydii</u> (1 - 7) | 4+ | 4+ | 3+ | 3+ | 2+ |

Título recomendado: 1:4

TABLA No. 14

EVALUACION DE LAS GAMMA-GLOBULINAS DEL SUERO DE SHIGELLA SONNEI

| ANTIGENOS | Gamma-glob. conc. | DILUCIONES | | | | | | |
|-----------------------------|----------------------|------------|-----|-----|------|------|------|-------|
| | | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 |
| <u>S.dysenteriae</u> (1-10) | - | | | | | | | |
| <u>S.flexneri</u> (1-4a) | - | | | | | | | |
| <u>S.flexneri</u> (4b-6) | tr | - | | | | | | |
| <u>S.boydii</u> (1 - 15) | - | | | | | | | |
| <u>S.sonnei</u> I. | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 1+ | - | | |
| <u>S.sonnei</u> II. | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 1+ | tr | tr | tr |

Título recomendado: 1:8

TABLA No. 15

TITULACION DEL CONJUGADO FLUORESCENTE DE SHIGELLA SONNEI

| MEZCLA DE ANTIGENOS | CONJUGADO F SIN DILUIR | DILUCIONES | | | |
|---------------------|---------------------------|------------|-----|-----|-----|
| | | 1:2 | 1:4 | 1:6 | 1:8 |
| S.sonnei I y II | 4+ | 4+ | 4+ | 2+ | 1+ |

Título recomendado: 1:4

TABLA No. 16

EVALUACION DE ANTISUEROS POLIVALENTES DE SHIGELLA

| ESPECIE DE SHIGELLA (Lab. Enterobacterias) | ANTISUEROS A LA DILUCION RECOMENDADA | | | |
|---|--------------------------------------|---------|---------|---------|
| | A (1:2) | B (1:8) | C (1:2) | D (1:8) |
| 2 <u>dysenteriae</u> | 2+ | | | |
| 2 <u>dysenteriae</u> | 3+ | | | |
| 12 <u>flexneri</u> | | 4+ | | |
| 3 <u>boydii</u> | | | 4+ | |
| 19 <u>sonnei</u> | | | | 4+ |
| 1 <u>dysenteriae</u> | | | 4+ | |
| TOTAL: 39. | | | | |

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la tabla No. 1 se observa que el título recomendado para uso del antisuero de S. dysenteriae es 1:2, ya que en dicha dilución se presenta una aglutinación del 100%. El antisuero crudo presenta ligeras reacciones cruzadas con otras especies pero estas son eliminadas al utilizar glicerol al 50%. (Tabla No. 2).

En la tabla No. 3 se observa que el antisuero de S. flexneri presenta aglutinación hasta 1:128 pero el título recomendado es 1:8, ya que en esta dilución se presenta aglutinación del 75 - 100%. Al agregar glicerol al 50% se observa una aglutinación total del 100% en el título de 1:8, por lo que se recomienda utilizarlo de esta forma. (Tabla No. 4.).

En las tablas 6 y 7 se observa que el título recomendado para uso del antisuero de S. boydii es 1:2 ya que en esta dilución se produce una aglutinación del 100%.

En la tabla 8 se observa que el antisuero de S. sonnei presenta ligeras reacciones cruzadas con las otras 3 especies - pero estas desaparecen al agregar glicerol al 50% y el título recomendado es 1:8, ya que a esta dilución se produce una aglutinación del 75%. (Tabla No. 9.).

Al observar las tablas de evaluación de los antisueros se pone de manifiesto que todos los antisueros cruzan ligeramente con S. sonnei II, ya que esta es la forma rugosa de S. sonnei.

En la tabla No. 10 se observan todos los resultados obtenidos en este trabajo. Al evaluar los antisueros obtenidos - estos presentaron resultados aceptables, se obtuvieron diferentes volúmenes de antisueros de cada grupo debido al número de conejos inmunizados, las diferencias en cuanto a los -

títulos de anticuerpos se pueden deber a varios factores tales como: antigenicidad de la bacteria, factores genéticos, estado nutricional y fisiológico de los conejos, dosis y concentración de los antígenos, ya que todos estos factores modifican la respuesta inmune en cualquier ser vivo vertebrado.

La concentración de proteínas del suero antes de la precipitación es mayor debido a que el suero total contiene todas las proteínas, y después de la precipitación con sulfato de amonio, la concentración de proteínas de las gamma globulinas es menor, debido a que únicamente se tienen las gamma globulinas puras y las otras proteínas constituyentes del suero se eliminan.

Los diferentes volúmenes de los conjugados fluorescentes se deben a las diferencias en cuanto a la concentración proteica, ya que dependiendo de dicha concentración proteica es la cantidad de conjugado fluorescente obtenido. El conjugado del cual se obtuvo mayor cantidad fue debido también a que se obtuvo más diluido, pero esto ayudó a que en los frotis se observaran mejor sin interferencia de cristales de fluoresceína inespecífica; es decir que la técnica de conjugación se fue mejorando.

En cuanto a los títulos de los conjugados fluorescentes, estos fueron menores que los obtenidos en los antisueros polivalentes, pero se observaron perfectamente a la dilución mencionada en la tabla No. 10, presentando una intensidad de fluorescencia de 3 a 4+, aceptable para usarse en la identificación presuntiva de Shigella.

En la tabla No. 11 se observa que el título recomendado del conjugado fluorescente de S. dysenteriae es 1:4 ya que se presenta una intensidad de fluorescencia de 3+.

En la tabla No. 12 se observa que el título recomendado del

conjugado fluorescente de S. flexneri es 1:2 ya que se presenta una intensidad de fluorescencia de 4+.

En la tabla No. 13 se observa que el título recomendado del conjugado fluorescente de S. boydii es 1:4 ya que se presenta una intensidad de fluorescencia de 3+.

En la tabla No. 15 se observa que el título recomendado del conjugado fluorescente de S. sonnei es 1:4 ya que se presenta una intensidad de fluorescencia de 4+.

En las tablas Nos. 5 y 14 se observa que al precipitar las γ globulinas con sulfato de amonio estas no presentaron aumento del título, pero se mantuvieron igual que antes de la precipitación.

En la tabla No. 16 se observa que de las 39 cepas probadas con los antisueros preparados, únicamente una no se identificó serológicamente, por lo que se considera que dichos antisueros pueden utilizarse para identificación en casos de epidemiología por Shigella. En cuanto a la cepa que no se identificó serológicamente puede ser debido a que dicha cepa no se encontraba completamente lisa y por lo tanto aglutinó con otro antisuero, ya que estas cepas no son las cepas de referencia utilizadas para la producción del antisuero.

9. CONCLUSIONES

En el diagnóstico para la identificación de Shigella, no se puede hablar únicamente de un método, se debe mencionar que para identificar dicha bacteria es necesario unir todos los métodos conocidos para su identificación tales como: cultivo, pruebas bioquímicas, identificación serológica con los antisueros A, B, C y D y tinción inmunofluorescente con los conjugados fluorescentes. En cuanto a la recuperación de --- Shigella a partir de alimentos contaminados, dicha recuperación es difícil, ya que esta bacteria es inhibida en los diferentes medios sólidos comerciales como EMB, XLD, SS, --- Hectoen enteric, Mac Conkey y Tergitol 7, por otra parte también interfiere en su recuperación la flora asociada al alimento, impidiendo así un cultivo adecuado, y por lo tanto dificultando su identificación. Es por esto que la técnica de anticuerpos fluorescentes es muy útil para el diagnóstico -- presuntivo de Shigella.

Además esta técnica nos proporciona información tanto de preparaciones de materia fecal de un cultivo, de alimentos contaminados, como de tejidos infectados.

Por otra parte la tinción inmunofluorescente es muy sencilla y rápida, ya que sólo basta con hacer preparaciones, teñir-- las con el conjugado fluorescente y observarlas al microscopio de fluorescencia, para identificar presuntivamente al microorganismo.

En el presente trabajo tanto los antisueros polivalentes como los conjugados fluorescentes presentaron resultados aceptables, por lo cual ambos reactivos se pueden utilizar en el diagnóstico para la identificación de Shigella, en casos clínicos o en brotes epidemiológicos, para dar un diagnóstico -- más acertado y por lo tanto proveer un tratamiento oportuno.

ANEXO No. 1

METODO DE AGLUTINACIÓN EN PLACA

- 1.- Hacer suspensiones celulares de antígenos en tubos que contengan 0.25 ml. de solución salina al 0.85%, las cuales al hacer una dilución 1:30 correspondan al tubo No. 3 de MacFarland.
- 2.- En una placa de vidrio colocar en un extremo una gota -- del Ac (antisuero) y en el extremo contrario colocar -- una gota del antígeno.
- 3.- Mezclar por medio de una asa, agitar manualmente un minuto y leer a simple vista o con ayuda de una lámpara.
- 4.- Aglutinación positiva: se observa un conglomerado o red de partículas dentro de un sobrenadante transparente.

Aglutinación negativa: no se observa red de partículas, por lo que se presenta un sobrenadante turbio.
- 5.- Este método se utiliza para titular los antisueros y para comprobar que una cepa sea lisa. Para titular un -- antisuero se hacen diluciones dobles y el título es el recíproco de la última dilución a la cual todavía se -- presenta aglutinación.

ANEXO No. 2

INMUNIZACIÓN DE LOS CONEJOS

- 1.- Colocar el conejo en el interior de una caja de madera, la cual lo inmoviliza parcialmente, la cabeza debe quedar al exterior por un orificio en uno de los extremos de la misma.
- 2.- Colocar la caja en posición vertical en relación a su eje mayor, quedando la cabeza del conejo en la parte inferior para mejorar la visibilidad de las venas, se utilizan las venas laterales de las orejas.
- 3.- Localizar la vena a utilizar.
- 4.- Efectuar asepsia en la región, retirar el pelo que esté sobre la vena, con una aguja canalizar la vena e introducir el antígeno.

ANEXO No. 3

SANGRADO DE LOS CONEJOS

1° Por punción cardíaca:

1. Se anestesia al animal con éter o cloroformo y se sujeta sobre una tabla, la parte central del animal quedará hacia la persona que va a realizar la punción.
2. Realizar asepsia del área cardíaca con una torunda con alcohol.
3. Localizar el corazón tomando como referencia los latidos cardíacos.
4. Introducir la aguja de arriba hacia abajo, no introducirla a los lados del tórax porque podría lesionar pulmones y causar la muerte del animal, cuando se ha introducido lo suficiente aspirar, si se extrae sangre continuar la aspiración, de lo contrario volver a localizar el corazón.

2° De la vena central de la oreja:

1. Colocar el conejo dentro de una caja de madera, quedando en el exterior solamente la cabeza.
2. Colocar la caja en posición vertical, quedando la cabeza del conejo en la parte inferior de la misma.
3. Limpiar con una torunda con alcohol la oreja que se vaya a utilizar, retirar el pelo que se encuentra sobre la vena central, una vez localizada la vena con una aguja No. 19 se canaliza y se extrae la sangre.

ANEXO No. 4

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- 1.- Solución salina al 0.85%.
Disolver 8.5 g. de NaCl en un litro de agua destilada.
- 2.- Solución salina formalinizada al 0.3%.
0.3 ml. de formaldehído llevarlos a 100 ml. con solución salina al 0.85%.
- 3.- Solución saturada de sulfato de amonio pH 7.0. (SAS al-100%).
(NH₄)₂SO₄ 760 g.
Agua destilada..... 1000 ml.

Al sulfato de amonio se le agregan 500 ml. de agua destilada, calentar hasta disolución del sulfato de amonio y filtrar. Una vez frío aforar hasta 1000 ml. y ajustar el pH de 7.0 con hidróxido de amonio concentrado. - Guardarlo en refrigeración.
- 4.- Solución de cloruro de bario al 5%.
Disolver 5 g. de cloruro de bario en 100 ml. de agua -- destilada.
- 5.- Solución buffer de acetatos pH 4.5.
CH₃COOH glacial 10 g.
CH₃COONa 10 g.
Agua destilada150 ml.
- 6.- Solución de hidróxido de sodio IN.
Disolver 40 g. de NaOH en 1000 ml. de agua destilada.
- 7.- Solución buffer de fosfatos salino pH 7.6 (PBS)
Fosfato disódico (Na₂HPO₄·2H₂O) 11.87 g/l.

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 9.08 g/l.

A 9 ml. de la solución de fosfato disódico añadir un -
mililitro de solución de fosfato monopotásico, ajustar
a pH 7.6

Nota: Esta es la solución Buffer de fosfatos y para --
preparar PBS, de esta solución se toman 50 ml. y se --
agregan 8.5 de NaCl y se afora a un litro con agua des-
tilada.

8.- Solución de merthiolate 1:100.

Disolver 1 g. de timerozal en 100 ml. de agua destila-
da.

9.- Buffer de carbonatos pH 9.5, 0.5 M.

Na_2CO_3 anhidro 5.3 g/100 ml. agua destilada.

NaHCO_3 4.2 g/100 ml. agua destilada.

Ajustar a pH de 9.0 a 9.5.

10.- Solución de ácido clorhídrico IN. (500 ml.).

A 15.4 ml. de ácido clorhídrico aforar a 500 ml. con -
agua destilada.

11.- Solución de hidróxido de sodio 0.2 N.

Disolver 8 gramos de NaOH en 1000 ml. de agua destila-
da.

12.- Glicerina tamponada.

A un mililitro de PBS agregar 9 ml. de glicerina.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albert B. William, J. Hausler Jr. Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections. 6th -- Edition. American Public Health Association. Washington D.C., 1981.
- 2.- Albert H. Coons, Hgh J. Creech and R. Norman Jones. -- Immunological Properties of Anti ody Containing a Fluorescent Group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 194i: 97, -- 200-202.
- 3.- A.D. O'Brien, M.R. Thompson, P.Gomski, B.P. Doctor, and S.B. Formal. Biological Properties of Shigella flexneri 2A Toxin and Its Serological Relationship to Shigella - dysenteriae I Toxin. Infection and Immunity, Mar. 1977. p. 796-798.
- 4.- Bob A. Freeman. Tratado de Microbiología de Burrows. -- 21a. Edición. Nueva Editorial Interamericana. México, - 1984.
- 5.- Boger M. McKinney, Janet T. Spillane and George W. --- Pearce. Factors Affecting the rate of Reaction of Fluorescein Isothiocyanate with Serum Proteins. The Journal Immunology. 93: 232-242, 1964.
- 6.- Bojalil J. L. Felipe, Santoscoy G. Guillermo, Rodríguez Manuel y Sosa M. José. Microbiología Médica. Tomo I. -- Asociación Mexicana de Profesores de Microbiología y Pa rasitología en Escuelas de Medicina, A.C. México, 1981.
- 7.- Butler T., A. A. F. Mahmoud, and K. S. Warren. Algorithms in the Diagnosis and Management Of Exotic Diseases. -- XXVII. Shigellosis. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 136, (3). September, 1977.

- 8.- B. J. Stell, R.I. Glass, M.I.Huq., M.U.Khan, H.Banu, and J.Helt. Epidemiologic and Clinical Features of Patients - Infected with Shigella Who Attended a Diarrheal Disease Hospital in Bangladesh. The Journal of Infectious - - - Diseases. Vol. 146, (2). August 1982.
- 9.- Deborah L. Martin, Tracy L. Gustafson, Jan W. Pelosi, -- Lucina Suárez, and Gloria V. Pierce. Contaminated Produce-A Common Source for Two Outbreaks of Shigella Gastroenteritis. American Journal of Epidemiology. Vol. 124, - No. 2, 1986.
- 10.- Editores Médicos. Enfermedades Diarréicas en el niño. - Tomo I. Septima Edición. Hospital Infantil de México, -- 1981.
- 11.- Edwards P.R. y W.A. Ewing. Identification of Enterobac-
teriaceae. 4a. Ed. Burgess Pub. Co. USA. 1985.
- 12.- Edwing F. Ullman, Moshe Schwarzberg, and Kenneth E. ---
Rubenstein. Fluorescent Excitation Transfer Immunossay.
The Journal of Biological Chemistry. Vol. 251, (14), --
1976 P. 4172-4178.
- 13.- Ernest H. Beutner. Immunofluorescent Steining: The Fluor-
escent Antibody Method. Bacteriological Reviews. 25, --
1961. p. 49-62.
- 14.- E.H.Beutner, E.J.Holborow and G.D.Johnson. Quantitative-
Studies of Immunofluorescent Staining. Immunology, 12,--
1967 p.327-337.
- 15.- Felix Borek and Arthur M. Silverstein. A New Fluorescent
Label for Antibody Proteins. Archives of Biochemistry --
and Biophysics 87, 1960. p.293-297.
- 16.- From the Center for Disease Control The Journal of ---

Infectious Diseases. Vol.136, (3). September, 199

- 17.- G. Ann Heebert, Bertis Pittman and William B. Cherry. - Factors Affecting the Degree of Nonspecific Staining -- Given by Fluorescein Isothiocyanate Labeled Globulins.- The Journal of Immunology. Vol. 98, 1967. p.1204-1212.
- 18.- G.D.Johnson, E.J.Holborow and J.Dorling. Handbook of -- Experimental Immunology. Edited by D.M.Weir. Third Ed.- Blackwell Scientific Publications. 1978.
- 19.- Gerald T. Keusch and Mary Jacewicz. The Pathogenesis of Shigella Diarrhea. VI. Toxin and Antitoxin in Shigella flexneri and Shigella sonnei Infectious in Humans. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 135 (4), April -- 1975.
- 20.- Gordon L.B. Lo Esencial de la Inmunología. Segunda Edición. Editorial El Manual Moderno. México, 1975.
- 21.- Gel Filtration Theory and Practics. Pharmacia Laboratory Separation Division.
- 22.- Henry Cannon. Química Clínica. Tomo I. Segunda Edición. Editorial JIMS. Barcelona, España, 1980.
- 23.- Herbert L. DuPont, Richard B. Hornick, Merrill J.Snyder, Joseph P. Libonati, Samuel B. Formal, and Eugene J. Gangarosa. Immunity in Shigellosis. I. Response of Man to Attenuated Strains of Shigella. The Journal Infectious-Diseases. Vol. 125, No. 1, January 1972.
- 24.- J.G. Elliot, J.A. Carpenter, and M.K.Hamdy. Technique - for Preparing High-Quality Microphotographs by Fluorescence Microscopy. Applied Microbiology. Dec. 1974, p. - 1063-1065.

- 25.- Jeklyy and Mr. Hyde. Shigella Vaccines, Shigella Pathogens. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 136, (4) October 1977.
- 26.- John D. Marshall, Warren C, Eveland and Chauncey W. Smith Superiority of Fluorescein Isethiocyanate (Riggs) for -- Fluorescent-Antibody Technic with a Modification of its- Application. (24222). Proc. Soc. Exp. Biol. Mod. 98, -- 1958. p. 898-900.
- 27.- JAMA. Shigellosis United States, Nov. 23/30, Vol. 252 -- (20), 1983. p.2811.
- 28.- JAMA. Shigellosis Among Tourists Union of Sovietic Socialist Republics, 1983.
- 29.- Leo Kaufman and William B. Cherry. Technical Factors --- Affecting the Preparation of Fluorescent Antibody Reagents. J. Immunology. 87: 72-79, 1961.
- 30.- Labrec H. Eugene, Samuel B. Formal, and Herman Schneider. Serological Identification of Shigella flexneri by Means of Fluorescent Antibody. The Journal Bacteriology 78: -- 384-91. Sep. 59.
- 31.- Marc J. Strulens, Didier Patte, Iqbal Kabir, Abdus Salam Samir K. Nath, and Thomas Butler. Shigella Septicemics - Prevalance. Presentation, Risk Factors, and Outcome. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 152, (4). October - 1985.
- 32.- Martin J. Blasser, Robert A. Pollard, and Roger A. Feldman. Shigella Infections in the United States, 1974-1980 The Journal of Infectious Diseases. Vol. 147, (4). April 1983.
- 33.- Michael T. Kelly, Don J. Brenner, and J.J. Farmer III. --

Enterobacteriaceae. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. From Manual of Clinical Microbiology. 4th ed., 1985, p.263-277.

- 34.- Morilla G. Antonio y Bautista Carlos R.G. Manual de Inmunología. Editorial Diana. México, 1986.
- 35.- MMWR. Shigellosis United States, 1981. Dec. 24: 31 (50): 681-2, 1982.
- 36.- MMWR. Shigellosis United States, 1983. Nov. 2: 33 (43): 616-618, 1984.
- 37.- MMWR. Shigellosis United States, 1984. Oct. 4: 34 (39): 600-602, 1985.
- 38.- Morgni, Ricardo Anibal. Inmunología e Inmunología Fundamentos. 3a. Edición. Editorial Médica Panamericana, - Argentina, 1982.
- 39.- Olarte J. Las Infecciones por Shigella en la Ciudad de México. Gaceta del Hospital Infantil de México: 17, 17-25 (Feb. 60).
- 40.- Olarte J. Galindo E. y Formal S.B. Serotypes of - - - Shigella flexneri, found in Mexico City. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 47: 507-508. Dec. 59.
- 41.- Olarte J. y Varela G. Clasificación de 626 Cultivos de Shigella aislados de niños con diarrea en la Ciudad de México. Rev. del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. Tomo XIII. No. 1. Marzo, 1983. México, D.F.
- 42.- Robert C. Seid, Jr., Dennis J. Kopecko, Jerald C. Sadoff, Herman Schneider, Louis S. Baron, and Samuel B. Formal. Unusual Lipopolysaccharide Antigens of Salmonella typhi Ural Vaccine Strain Expressing the Shigella sonnei Form

I Antigen. The Journal of Biological Chemistry. Vol. --
259, (14), p. 9028-9034, 1984.

- 43.- Robert V. Tauxe, MD, MPH, Kathleen E. Johnson, RN, MPH,
Janice C. Boase, RN, MS, Steven D. Helgerson, MD, MPH,-
and Paul A. Blake, MD, MPH, Control of Day Care Shige--
llosis: A Trial of Convalescent Day Care in Isolation.-
American Journal of Public Health 1986, 76 (6): 627-630.
- 44.- R.C. Nairn Fluorescent Protein Tracing, Edinburgh and -
London 1962.
- 45.- Roger M. McKinney and William B. Cherry. Immunofluores-
cence Microscopy. Manual of Clinical Microbiology. ---
Fourth Edition. American Society For Microbiology. ---
Washington D.C. 1985.
- 46.- Shigellosis Control - A Rosy Future?. The Journal of --
Infetious Diseases. Vol. 136, (3). September 1977.
- 47.- Simplified Procedure for removing Non-specific Staining
Components from Fluorescein-labelled Conjugates. Nature.
July 1, 1961. Vol. 191.
- 48.- Specifications and Evaluation Methods for Immunological
and Microbiological Reagentes. Departament of Health. -
Education and Welfare. Public Health Service Center for
Disease Control. Washington D.C. 1981.
- 49.- W.B.Cherry and M.D.Moody. Fluorescent-Antibody Techni--
ques in Diagnostic Bacteriology. Bacteriological Reviews,
June, 1965.
- 50.- Walter R. Dowdle and P. Arne Hansen. Labeling of Anti--
bodies with Fluorescent azo Dyes. Journal Bact. 77, 669-
670, 1959.

- 51.- William B. Cherry, Ph.D., and Berenice M. Thomason, B.S.
Fluorescent Antibody Techniques for Salmonella and Other
Enteric Pathogens. Pub. Health Rep. 84: 887-898. 1969.