



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Sensibilidad antimicrobiana y detección de genes
de virulencia *ipaH*, *ial*, *set1A*, *set1B* y *Stx* en aislados clínicos de *Shigella*
*spp.***

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en
Ciencias Biológicas**

IRINA MARIBEL VILLACRÉS GRANDA

Quito, 2011

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Irina Maribel Villacrés Granda ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Iliana Alcocer Negrete

Directora de la Disertación

Quito, 21 de septiembre de 2011

A mis padres y hermano

AGRADECIMIENTOS

Por la culminación de este trabajo agradezco primeramente a mis padres Ángel Villacrés y María Elena Granda quienes me han apoyado durante toda mi carrera y han sido mi guía durante toda mi vida. Gracias a ellos por toda la fuerza y el apoyo que me han brindado para alcanzar mis propósitos de vida. A mi hermano Boris Villacrés por haber sido mi compañía y brindarme su energía y alegría en todos los momentos.

A la Dra. Iliana Alcocer por trasmitirme su amplio bagaje de conocimientos, ayuda y confianza depositados en la realización de este trabajo; a la Mtr. Mercedes Rodríguez – Riglos por su respaldo y preocupación durante mi carrera; a la Dra. Jeannete Zurita por su inquebrantable voluntad, vastos conocimientos e invaluable ayuda brindada durante la realización de este trabajo; a la Dra. Laura Arcos Terán por su importante colaboración en la facilitación del laboratorio para las prácticas de rigor.

A mis compañeros de laboratorio David, Majito, Fer, Pedro, Sofi, Cris, Santy, Gato, Andre, Gaby, Anita y Dianita por sus enseñanzas, ayuda y grata compañía durante todo este tiempo, además por haber hecho del laboratorio un lugar apropiado para el trabajo y ameno, y, haberse convertido en personas muy importantes para mí, más que compañeros en grandes amigos.

A mis mejores amigos Anita F., Gaby H., Andre C., Diego C. y Ale P., por su compañía, solidaridad y apoyo en todos estos años. Gracias amigos por haber sido los mejores.

A mis primos y tíos que han mostrado su preocupación brindándome ánimo y fuerzas para culminar mis estudios y seguir adelante.

Y finalmente a todos los científicos, biólogos, microbiólogos, y todas las personas que han hecho investigación, por haber proporcionado el campo, los descubrimientos y las herramientas necesarias que han convertido en factible la elaboración de este trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
A	Adenina
A	Ausente
ADN	Ácido desoxido ribonucleico
AM	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
AZM	Azitromicina
BHI	Infusión cerebro corazón
C	Citosina
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standars Institute
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDA	Enfermedad Diarreica Aguda
F	Femenino
F/M	Nitroflurantoína
G	Guanina
GDAR	Glutamate Dependend Acid Resistance
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
HVZ	Hospital Vozandes

LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUACIÓN...)

Abreviatura	Significado
I	Intermedio
<i>ial</i>	“Invasion-associated locus”
<i>ipaH</i>	“Invasion plasmid antigen H”
LPS	Liposacárido de la membrana externa
LRG	Residuos de aminoácidos ricos en leucina
M	Masculino
MILI	Motilidad Indol Lisina
MIO	Motilidad Indol Ornitina
mL	Mililitro
NA	Ácido nalidíxico
ND	No identificado
P	Presente
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
R	Resistente
REDNARBEC	Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana - Ecuador.
RM/VP	Reacción de Rojo de Metilo y Voges-Proskauer
S	Sensible
SDS	Dodecil sulfato de sodio

LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUACIÓN)

Abreviatura	Significado
<i>set1A</i>	Enterotoxina 1- subunidad A
<i>set1B</i>	Enterotoxina 1- subunidad B
Sh	<i>Shigella</i> spp.
Sh bo	<i>Shigella boydii</i>
Sh fx	<i>Shigella flexneri</i>
Sh so	<i>Shigella sonnei</i>
SHU	Síndrome diurético hemolítico
SIM	H ₂ S Indol Motilidad
Stx	Toxina Shiga
SXT	Azitromicina
T	Timina
TBE	Tris- Borato-EDTA
Te	Tetraciclina
TE	Tris-EDTA
Tris-HCl	Hidroximetil aminometano y ácido clorhídrico
TSB	Caldo tripticasa de soya
TSI	Agar triple azúcar y hierro
μl	Microlitro
Z&Z	Zurita&Zurita Laboratorios

TABLA DE CONTENIDOS

1	RESUMEN.....	1
2	ABSTRACT.....	2
3	INTRODUCCIÓN.....	3
	OBJETIVO GENERAL.....	11
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4	METODOLOGÍA.....	13
4.1	POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	13
4.2	TRANSPORTE.....	13
4.3	IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	14
4.3.1	FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	14
4.3.2	PROCEDIMIENTO.....	18
4.4	IDENTIFICACIÓN SEEROLÓGICA DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Shigella</i>	20
4.4.1	FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	21
4.4.2	PROCEDIMIENTO.....	22
4.5	SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.....	23
4.5.1	FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	24
4.5.2	PROCEDIMIENTO.....	25
4.6	DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS GENES DE VIRULENCIA EN <i>Shigella spp</i>	25
4.6.1	EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL.....	25
4.6.2	CONFIRMACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN.....	27

4.6.3 OBTENCIÓN DE CEPAS CONTROL.....	28
4.6.3.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	28
4.6.3.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	28
4.6.4 ANÁLISIS DE PRESENCIA O AUSENCIA DE GENES DE VIRULENCIA.....	29
4.6.5 TINCIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LA CALIDAD DE LA EXTRACCIÓN DEL ADN Y PRODUCTOS DE PCR	30
4.7 MANTENIMIENTO DE BACTERIAS.....	30
4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
5 RESULTADOS.....	32
5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	32
5.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DEL GÉNERO <i>Shigella</i>	32
5.3 IDENTIFICACIÓN SEEROLÓGICA DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Shigella</i>	34
5.4 SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.....	34
5.4.1 PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA MOSTRADOS POR LOS AISLADOS DE <i>Shigella</i> spp.....	35
5.4.2 SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS REGISTRADA PARA CADA ESPECIE DE <i>Shigella</i> spp.....	36
5.5 DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS GENES DE VIRULENCIA EN <i>Shigella</i> spp.....	37
5.5.1 CONFIRMACIÓN DE LA EXTRACCIÓN E INTEGRIDAD DEL ADN.....	37
5.5.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS	37

5.5.3 ANÁLISIS DE PRESENCIA O AUSENCIA DE GENES DE VIRULENCIA.....	38
5.5.4 PATRONES DE VIRULENCIA MOSTRADOS POR LOS AISLADOS DE <i>Shigella</i> spp.....	38
5.5.5 ANÁLISIS DE PRESENCIA DE GENES DE VIRULENCIA REGISTRADA PARA CADA ESPECIE.....	39
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	40
6 DISCUSIÓN.....	41
7 CONCLUSIONES.....	48
8 RECOMENDACIONES.....	50
9 LITERATURA CITADA.....	51
10 FIGURAS.....	60
11 TABLAS.....	82
12 ANEXOS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Porcentaje de las principales fuentes de origen de los aislados clínicos de <i>Shigella</i> spp.....	61
Figura 2	Identificación bioquímica de <i>Shigella</i> spp. utilizando agar entérico Hecktoen.....	62
Figura 3	Pruebas de identificación bioquímica para <i>Shigella</i> spp.....	63
Figura 4	Prueba de aglutinación con antisuero en <i>Shigella</i> spp.....	64
Figura 5	Porcentaje de identificación de los diferentes especies en la población total de aislados de <i>Shigella</i> spp. N=79.....	65
Figura 6	Antibiograma realizado en la cepa ATCC <i>Shigella flexneri</i> (2b) 12022 ..	66
Figura 7	Difusión con disco realizada en muestras de <i>Shigella</i> spp.....	67
Figura 8	Resistencia a antibióticos en <i>Shigella</i> spp.....	68
Figura 9	Porcentaje de resistencia a antibióticos dentro de la población de <i>Shigella</i> spp. N=79.....	69
Figura 10	Porcentaje de los patrones de resistencia antimicrobiana presentes dentro de la población de <i>Shigella</i> spp. N=79.....	70
Figura 11	Porcentaje de resistencia a antibióticos dentro de la población de <i>Shigella flexneri</i> . N=50	71
Figura 12	Porcentaje de resistencia a antibióticos dentro de la población de <i>Shigella sonnei</i> . N=23.....	72
Figura 13	Porcentaje de resistencia a antibióticos dentro de la población de <i>Shigella boydii</i> . N=6.....	73
Figura 14	Gel representativo de la extracción de ADN de los aislados de <i>Shigella</i> spp.....	74

Figura 15	Representación fotográfica de la amplificación del gen 16S ARNr de <i>Shigella</i> spp. en gel de agarosa.....	75
Figura 16	Representación fotográfica en gel de agarosa de la amplificación de los genes <i>ipaH</i> , <i>ial</i> , <i>set1A</i> y <i>set1B</i> en <i>Shigella</i> spp.....	76
Figura 17	Porcentaje de la presencia de los genes <i>set1A</i> , <i>set1B</i> , <i>ial</i> , <i>ipaH</i> y <i>Stx</i> en la población de aislados de <i>Shigella</i> spp. N=79	77
Figura 18	Porcentaje de los patrones de virulencia presentes dentro de la población de aislados de <i>Shigella</i> spp. N=79.....	78
Figura 19	Porcentaje de presencia de los genes <i>set1A</i> , <i>set1B</i> , <i>ial</i> , <i>ipaH</i> y <i>Stx</i> en la población de aislados de <i>Shigella flexneri</i> . N=50.....	79
Figura 20	Porcentaje de presencia de los genes <i>set1A</i> , <i>set1B</i> , <i>ial</i> , <i>ipaH</i> y <i>Stx</i> en la población de aislados de <i>Shigella sonnei</i> . N=23.....	80
Figura 21	Porcentaje de presencia de los genes <i>set1A</i> , <i>set1B</i> , <i>ial</i> , <i>ipaH</i> y <i>Stx</i> en la población de aislados de <i>Shigella boydii</i> . N=6.....	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Datos de origen de los aislados de <i>Shigella</i> spp. analizados en este estudio.....	83
Tabla 2	Iniciadores utilizados para la confirmación de la integridad del ADN para su uso en reacciones de PCR.....	86
Tabla 3	Iniciadores utilizados para la identificación de varios genes asociados a mecanismos de virulencia en <i>Shigella</i> spp.....	87
Tabla 4	Identificación de aislados por serotipificación siguiendo el método de aglutinación en lámina.....	88
Tabla 5	Patrones de resistencia antimicrobiana mostrados por los aislados de <i>Shigella</i> spp.....	91
Tabla 6	Sensibilidad a antimicrobianos y fenotipos de resistencia en <i>Shigella</i> spp.....	93
Tabla 7	Patrones de virulencia mostrados por los aislados de <i>Shigella</i> spp	99
Tabla 8	Presencia y ausencia de los genes <i>ipaH</i> , <i>set1A</i> , <i>setB</i> , <i>ial</i> y <i>Stx</i> y genotipos de virulencia en aislados de <i>Shigella</i> spp.....	100

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Alineamiento de las secuencia obtenida para el uso como control positivo del gen 16S ARNr en <i>Shigella</i> spp.....	107
Anexo 2	Alineamiento de las secuencia obtenida para el uso como control positivo del gen <i>ipaH</i> en <i>Shigella</i> spp.....	108
Anexo 3	Alineamiento de la secuencia obtenida para el uso como control positivo del gen <i>ial</i> en <i>Shigella</i> spp.....	110
Anexo 4	Alineamiento de la secuencia obtenida para el uso como control positivo del gen <i>setIA</i> en <i>Shigella</i> spp.....	112
Anexo 5	Alineamiento de la secuencia obtenida para el uso como control positivo del gen <i>setIB</i> en <i>Shigella</i> spp.....	114
Anexo 6	Detalle de los resultados del análisis de la comparación entre serogrupos de <i>Shigella</i> spp. y resistencia a antibióticos	116
Anexo 7	Detalle de los resultados del análisis de la comparación entre serogrupos de <i>Shigella</i> spp. y presencia de genes de virulencia.....	118

1 RESUMEN

El género *Shigella* comprende bacilos de las especies *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* y *S. dysenteriae*, productores de disentería bacilar o shigelosis. La virulencia y patogenicidad del género se caracteriza por la presencia de una alta multirresistencia a antibióticos y variedad de factores de virulencia que permiten la infección al hospedero. El objetivo de este estudio fue establecer la sensibilidad antimicrobiana y detectar los genes de virulencia “Invasion plasmid antigen H”, *ipaH*; “Invasion-associated locus”, *ial*; “*Shigella* toxin” *Stx*; “*Shigella* enterotoxin 1A”, *set1A*; y “*Shigella* enterotoxin 1B”, *set1B* en aislados clínicos de *Shigella* spp.; para el efecto se analizaron 79 aislados obtenidos de Zurita & Zurita laboratorios y del Hospital Vozandes Quito. Mediante serotipaje, se obtuvieron 3 especies: *S. flexneri* (63,29%), *S. sonnei* (29,11%), y *S. boydii* (7,59%). La sensibilidad antimicrobiana se analizó siguiendo el método de Kirby- Bauer y las recomendaciones del “Clinical and Laboratory Standards Institute”, CLSI. La resistencia obtenida fue a tetraciclina (96,20%), ampicilina (91,14%), trimetoprim/sulfametoxazol (86,08%) y cloranfenicol (84,81%). El análisis de presencia de genes de virulencia se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores previamente descritos. Se determinó una alta prevalencia de los genes *ipaH* (91,14%) e *ial* (82,28%), los genes codificantes de enterotoxina 1 (*set1A* y *set1B*) se encontraron en un 34,18%. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de una multirresistencia a antibióticos y cepas altamente virulentas.

Palabras clave: enterotoxinas, genes de virulencia, invasión celular, resistencia antimicrobiana serogrupos, *Shigella* spp.

2 ABSTRACT

The genus *Shigella* includes bacilli of the species *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* and *S. dysenteriae*, which are producers of bacillary dysentery or shigelosis. The virulence and pathogenicity of the genus is characterized due to multidrug resistance to antibiotics and a variety of virulence factors that allow the infection to host. The objective of the study was to establish the antibiotic susceptibility and detection of virulence genes: invasion plasmid antigen H (*ipaH*), invasion-associated locus (*ial*), *Shigella* toxin (*Stx*), *Shigella* enterotoxin 1A (*set1A*), and *Shigella* enterotoxin 1B (*set1B*); in clinical isolates of *Shigella* spp.; to the effect were analyzed 79 isolates from “Zurita & Zurita laboratorios” and “Hospital Vozandes” in Quito. By serotyping, 3 species: *S. flexneri* (63,29%), *S. sonnei* (29,11%), and *S. boydii* (7,59%). The antimicrobial susceptibility was performed by following the Kirby- Bauer method following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). High resistance was observed to the antimicrobials tetracycline (96,20%), ampicillin (91,14%), trimethoprim/sulfamethoxazole (86,08%), and chloramphenicol (84,81%). The analysis of the presence of virulence genes was performed using the Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers previously described. A high prevalence of genes *ipaH* (91,14%) and *ial* (82,28%) was determined, the encoding genes of enterotoxin 1 (*set1* and *set1B*) were found in 34,18% of the isolates. The results demonstrate the existence of multidrug resistances to antibiotics and highly virulent strains of the genus *Shigella*.

Keywords: antimicrobial resistance, cell invasion, enterotoxins, virulence genes, serogroups, *Shigella* spp.

3 INTRODUCCIÓN

El género *Shigella* (Shiga, 1989) comprende bacilos Gram negativos de 0,3 a 1 μm diámetro y de 1 a 6 μm de longitud, no móviles, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Terragno *et al.*, 2007).

Su identificación se fundamenta en características bioquímicas y antigénicas, en base a ellas se describen cuatro especies: *Shigella dysenteriae* (Shiga, 1898), perteneciente al serogrupo A; *Shigella flexneri* (Flexner, 1900), concerniente al serogrupo B; *Shigella boydii* (Boyd, 1938), perteneciente al serogrupo C; y, *Shigella sonnei* (Sonne, 1915), perteneciente al serogrupo D; Los grupos A, B y C se subdividen en serotipos (número arábigo) y subtipo (letra minúscula) que son 12, 14 y 18, respectivamente. El grupo D tiene un solo serotipo (Gonzales y Cecchini, 2003). Todas ellas pueden causar disentería bacilar, aunque con diferente gravedad (Dworkin *et al.*, 2007).

Bioquímicamente, el género *Shigella* se identifica por fermentar glucosa y otros azúcares sin producción de gas, además de ser oxidasa negativo y no producir H_2S . Estos organismos no utilizan citrato de Simmons y son arginina dehidrolasa, lisina descarboxilasa y ureasa negativos. La temperatura de crecimiento óptima para el género es de 37 °C (Terragno *et al.*, 2007).

El genoma bacteriano del género *Shigella* consiste en una molécula de ácido desoxirribonucleico, ADN circular de alrededor de 4×10^6 pares de bases incluyéndose además plásmidos asociados con la invasión de células del hospedero (Baron, 1996).

Los organismos integrantes del género *Shigella* se presentan como los causantes primordiales de la enfermedad conocida como disentería bacilar o shigelosis. Esta enfermedad es una infección bacteriana aguda que afecta el intestino grueso y la porción distal del intestino delgado caracterizándose por una diarrea acompañada de fiebre, vómito, cólicos y tenesmo. En casos típicos, las heces contienen sangre y moco siendo esto el resultado de la confluencia de microabscesos causados por los microorganismos invasores. La enfermedad suele ser de curso limitado y tener una duración de cuatro a siete días en promedio. La gravedad de la infección y la tasa de letalidad dependen del huésped y del serovar de la bacteria (León- Ramírez, 2002).

La Organización Mundial de la Salud (2010) estima la ocurrencia de 165 millones de casos y 1.1 millón de muertes por año. La prevalencia de las cepas varía por área: *S. flexneri* en los países en desarrollo, *S. boydii* en los industrializados. *S. sonnei* y *S. dysenteriae* tienen menor frecuencia. Son microorganismos de reservorio humano aunque se han comunicado brotes en colonias de primates. El hombre es huésped natural (Beneson, 1997).

En el Ecuador se han registrado 516 567 casos de enfermedades diarreicas hasta el 2007 y un total de 32 675 casos en el 2009 (INEC, 2009).

La infección surge posteriormente a la ingestión de 10 a 100 microorganismos y los síntomas se presentan de 12 a 96 horas relativas al período de incubación de la bacteria. (Mandell *et al.*, 2009).

La transmisión de estas bacterias se produce principalmente por ruta fecal-oral directa o indirecta en lugares que se caracterizan por una higiene deficiente, como niños en guarderías o personas en centros carcelarios (Kotloff *et al.*, 1999). Las moscas son importantes vectores debido a que pueden transportar, en sus patas, un inóculo pequeño (10^2). Además se han observado infecciones en hombres de tendencia homosexual con colitis o proctocolitis (Dougherty *et al.*, 1996) y un alto índice de contagio con *Shigella* en personas que realizan viajes a países en vías de desarrollo, produciéndose el síndrome diarreico de los viajeros (Kotloff *et al.*, 1999).

El tratamiento específico de la shigelosis con antibiótico es tema de controversia por cuanto la forma común es autolimitada. Está indicado en las formas graves y la selección se realizará de acuerdo al patrón de sensibilidad-resistencia en el área, la disponibilidad y los costos.

El tratamiento antibiótico podría disminuir la severidad y duración de la enfermedad, reducir la transmisión al lograr la eliminación del microorganismo del intestino.

En el caso de requerirse la administración de antibióticos para el control de la enfermedad, se recomienda una terapia con trimetoprim/sulfametoxazol, ampicilina, ciprofloxacina o azitromicina (Gonzales y Cecchini, 2003).

Según la Organización Mundial de la Salud (2011) la resistencia a antibióticos de las especies del género *Shigella* junto con otros géneros de bacterias causantes de enfermedades diarreicas ha ido aumentando notablemente debido a la baja calidad de las

medicinas, el uso de antibióticos en la crianza de animales, el bajo control y prevención de infección y la debilidad de los sistemas de vigilancia junto con la rápida dispersión de determinantes génicos como plásmidos e integrones. Este fenómeno se ve reflejado en el aumento del número de casos de shigelosis ocasionados por cepas resistentes (Sack *et al.*, 1997).

El género *Shigella* presenta una variedad de factores de virulencia que le permiten el ingreso a la mucosa gástrica, evadiendo las defensas del hospedero. Una vez que la bacteria ingresa al tracto digestivo, se da una resistencia a la acidez gástrica debido a mecanismos como la resistencia al ácido 1, inducido por acidez y reprimido por glucosa y el mecanismo 2, conocido “Glutamate Dependend Acid Resistance”, GDAR, dependiente de descarboxilasa de aminoácidos y sistemas antiporter (Jennison y Verman, 2007).

Superada la mucosa gástrica, *Shigella* coloniza el epitelio intestinal a nivel del colon y transita a través de las células M, que recubren los nódulos linfoides, mediante la fagocitación por los macrófagos residentes, siendo este proceso facilitado por la secreción de proteínas efectoras, conocidas como “Invasion Plasmid Antigen”, Ipa (Suzuki y Sasakawa, 2001). Posteriormente la bacteria es liberada del macrófago apoptótico en una ubicación que favorece el contacto e invasión de su célula blanco, el enterocito, por la superficie basolateral. La otra ruta de invasión basolateral del enterocito es vía neutrófilos polimorfonucleares, que migran por las uniones epiteliales en respuesta a la presencia de *Shigella* invasora y a la liberación de citoquinas como la IL- 1 (Barrantes y Achí, 2009). El proceso de trans migración de estas células hacia el lumen intestinal contribuye a desestabilizar la integridad de la barrera epitelial, facilitando así la exposición de la

superficie basolateral del enterocito y el ingreso de *Shigella* a su célula blanco (Schroeder y Hilbi, 2007).

El ingreso de *Shigella* al citoplasma del enterocito es un proceso complejo, que involucra una serie de pasos o mecanismos de interacción entre las distintas proteínas efectoras bacterianas y la célula hospedera (Sansonettil, 2006).

La primera etapa es de preinteracción, donde las proteínas efectoras se acumulan en el citoplasma bacteriano y se asocian con chaperonas para evitar su degradación por proteólisis (Barrantes y Achí, 2009). En una segunda etapa, conocida como interacción, se desarrolla una plataforma para la transducción de señales activándose un proceso de secreción proteica (Cossart y Sansonettil, 2004). En la tercera etapa, ocurre la macropinocitosis de la bacteria, ocasionando rearrreglos del citoesqueleto de actina del enterocito, lo que permite la formación de un “foco de entrada” (Cossart y Sansonettil, 2004). En la cuarta y última etapa se produce la depolimerización de actina y cierre del macropinocitoma (Barrantes y Achí, 2009).

Una vez dentro del enterocito, la bacteria se multiplica en el citoplasma, nicho que la protege de los componentes del sistema inmunológico del espacio extracelular (Barrantes y Achí, 2009).

Para la movilización de la bacteria hacia otras células, se realizan rearrreglos localizados y masivos de la superficie celular del enterocito, caracterizados por la formación de las estructuras conocidas como filopodios y lamepodios, estos rearrreglos del citoesqueleto de actina permiten la formación de un foco de entrada. Este proceso permite

que la bacteria encuentre la membrana plasmática eucariota, en donde forma protusiones que son endocitadas por las células adyacentes, permitiendo la formación de vacuolas o endosomas de doble membrana, y la diseminación intercelular (Cossart y Sansonetti, 2004). Luego de la lisis de la doble membrana, la bacteria se libera en el citoplasma de la célula adyacente e inicia un nuevo ciclo de replicación y diseminación intra e intercelular (Suzuki y Sasakawa, 2001).

El proceso de invasión intracelular genera una fuerte respuesta inflamatoria que destruye la integridad de la barrera epitelial intestinal, exponiendo la submucosa al espacio luminal (Suzuki y Sasakawa, 2001). Conjuntamente hay debilitamiento de las uniones intercelulares por la alteración de la composición proteica entre las uniones por efecto de la propia bacteria. Estas estrategias permiten a la bacteria acceder a su célula blanco obviando la transitis mediada por células M (Schroeder y Hilbi, 2008).

Varios factores de virulencia han sido asociados al género *Shigella* siendo los más relevantes en este estudio los que intervienen en la invasión y colonización del epitelio intestinal como los genes *ipaH* e *ial*; así como los genes que permiten la producción de la enterotoxina 1 y la exotoxina Shiga.

El gen *ipaH* conocido como “invasión plasmid antigen H” ha sido observado en el 99% de aislados de *Shigella*, determinándose como el gen más estable de detectar debido a que se encuentra tanto en el cromosoma como en ADN plasmidial en múltiples copias (Lin Thong *et al.*, 2005).

El gen consta de 423 pares de bases y codifica una proteína de 65,3 kDa. Este producto presenta una estructura hidrofílica y una superficie hidrofóbica en un lado, conformada por residuos espaciados de leucina (Hale, 1991). Los residuos espaciados de leucina, tienen un papel en la virulencia ya que estas repeticiones son similares a los residuos de aminoácidos ricos en leucina (LRG) de la glucoproteína plaquetaria GPIIb que se une al factor Von Willebrand, lo que provoca la conversión de la protrombina, en el proceso de formación de coágulo de fibrina, e interviene en la iniciación de los procesos inflamatorios lo cual modifica la respuesta del hospedero sobre todo en las primeras etapas de la inflamación (Hale, 1991). Estas características permiten la diseminación facilitada de *Shigella* a través de la mucosa y la inhibición de la coagulación inducida por trombina, provoca la eliminación de sangre en las heces (Hale, 1991).

El gen *ial* (invasión-associated locus) se encuentra ubicado en un plásmido de 120 a 140 MDa conocido como plásmido de invasión *inv*. Consta de 320 pb y secuencia una proteína de 60 KDa (Vargas *et al.*, 1999). Éste plásmido promueve la internalización e invasión del tejido “blanco” gracias a la producción de adhesinas e invasinas; además permite la diseminación intercelular de la bacteria y el traslado y secreción de diversos factores de virulencia (Noriega *et al.*, 1999).

La enterotoxina 1 (ShET-1), es una proteína codificada en el cromosoma bacteriano por los genes *setIA* (subunidad A de la proteína) de 309 pb y *setIB* (subunidad B de la proteína) de 147 pb. Esta enterotoxina altera el transporte de agua y electrolitos en el intestino (Vargas *et al.*, 1999).

La importancia de la enterotoxina 1 en la virulencia de *Shigella* se ha descrito más recientemente. Esta toxina parece relacionarse con la fase temprana de la diarrea acuosa en la shigelosis, expresándose con mayor frecuencia en *S. flexneri* 2a. Sin embargo el mecanismo por el cual inicia la diarrea durante la shigelosis aún no está claramente definido (Vargas *et al.*, 1999).

La exotoxina Shiga es una enterotoxina que se asocia con el serotipo A1 de *S. dysenteriae*. Esta exotoxina es codificada por el gen *Stx* de 895 pb y es liberada únicamente durante la lisis celular. Su efecto es bloquear la síntesis proteica en la célula eucariota (Henhly *et al.*, 1996). Esta toxina se une a los receptores glicolipídicos Galot1-4Galp, los cuales se expresan de forma variable en células del endotelio vascular, encontrándose en mayor cantidad en el endotelio intestinal y renal (Fasano, 2002), e inhibe la síntesis de la proteína galabiosa uniéndose al enlace N-glycosídico en el 28S rRNA (Hale, 1991).

La principal complicación de la liberación de la toxina Shiga es el desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico o SUH. La toxina pasa desde el intestino al endotelio renal por vía vascular, produciendo daño celular como necrosis cortical renal en algunos casos con trombosis y destrucción de los capilares glomerulares (Tzipori *et al.*, 2004). Otro órgano que se puede ver afectado en el SUH es el cerebro, con serias complicaciones como convulsiones, ceguera cortical y accidente cerebro vascular por trombosis (Tzipori *et al.*, 2004). Se han descrito además, problemas cardiopulmonares como síndrome de distress respiratorio, fallo cardíaco congestivo y miocarditis (Tzipori *et al.*, 2004).

La diarrea por *Shigella* puede debutar como una diarrea acuosa y luego transformarse a inflamatoria con las clásicas características de moco y sangre. Esto se ha convertido en un problema a nivel mundial. Su tratamiento se ha visto limitado por la adquisición de resistencia al tratamiento con antimicrobianos y el surgimiento de serogrupos con factores de virulencia que le facilitan a la bacteria el ingreso e invasión de células de la mucosa gástrica. Se han realizado muchos estudios a nivel de Europa y Norte América (Gonzales y Cecchino, 2003) sin embargo, éstos se han visto reducidos en Latinoamérica. Es por esto que este estudio trata de generar datos recientes que permitan el conocimiento y difusión de estas variables.

Siendo así, los objetivos de este estudio fueron:

OBJETIVO GENERAL

Establecer la sensibilidad antimicrobiana y detectar genes de virulencia *ipaH*, *ial*, *Stx*, *set1A* y *set1B* en aislados clínicos de *Shigella* spp. por medio de pruebas fenotípicas y genotípicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las especies de los aislados de *Shigella* spp. mediante el uso de sueros polivalentes.

2. Establecer la sensibilidad de los aislados de *Shigella* spp. para cada uno de los antibióticos por medio del método de difusión con disco utilizando los parámetros establecidos por el “Clinical and Laboratory Standards Institute”.
3. Caracterizar la virulencia de los aislados clínicos de *Shigella* spp. determinando la presencia o ausencia de los genes *ipaH*, *ial*, *set1A*, *set1B* y *Stx* por medio de pruebas moleculares.

4 METODOLOGÍA

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio incluyó un total de 82 aislados clínicos de *Shigella* spp., obtenidos en Zurita & Zurita Laboratorios (Quito, Ecuador) y del Hospital Vozandes en Quito desde el año 2008 hasta el año 2010.

Los aislados se mantienen en la Colección Bacteriana Quito Católica, CB-QCA del Laboratorio de Microbiología en la Escuela de Ciencias Biológicas. Los códigos hospitalarios y de congelación, fechas de aislamiento, origen de los aislados, y sexo de los pacientes se encuentran detallados en la Tabla 1.

4.2 TRANSPORTE

Los aislados fueron transportados desde Zurita & Zurita Laboratorios en placas Petri con agar entérico Hecktoen (Difco™) hacia el Laboratorio de Microbiología, en donde fueron incubados a 37 °C por 18 horas.

Los aislados procedentes del hospital Vozandes se trasladaron en 5 ml de caldo “Brain Heart Infusion”, BHI (Difco™) hacia el Laboratorio de Microbiología donde se incubaron a 37 °C por 18 horas, posteriormente se sembró las muestras en placas de agar entérico Hecktoen (Difco™) y se las incubó a 37 °C por 18 horas.

4.3 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DEL GÉNERO *Shigella*

La confirmación fenotípica fue realizada mediante la selección de colonias aisladas en agar entérico Hecktoen (DifcoTM). Para la identificación de las colonias y la confirmación del género *Shigella* se efectuó la respectiva identificación bioquímica en base a ensayos de fermentación de carbohidratos y utilización de aminoácidos (Terragno *et al.*, 2007).

4.3.1 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Hecktoen: Este medio es un agar utilizado en laboratorios clínicos para el aislamiento de bacterias entéricas (King *et al.*, 1968); contiene sales biliares que inhiben el desarrollo de la flora acompañante y 2 sistemas indicadores de la fermentación de carbohidratos: azul de bromotimol y fucsina ácida, y el citrato de hierro como un indicador de la formación de H₂S a partir del tiosulfato (NEOGEN, 2008).

Agar Triple Azúcar y Hierro, TSI: este agar es utilizado como medio diferencial para las pruebas de fermentación de carbohidratos, producción de gas y producción de H₂S. La fermentación de los azúcares genera la producción de ácidos, la cual es detectada por el indicador rojo fenol. El cambio de color del medio de originalmente rojo a amarillo indica la producción de ácido, mientras que la alcalinización de las peptonas no produce cambios en el pH del medio por lo tanto el color rojo original se mantiene. La producción de sulfuro de hierro se da por la reducción del tiosulfato sódico a sulfuro de hidrógeno y la reacción de éste último con la sal de hierro del medio. Esta reacción produce una coloración negra en el medio (Difco, 1984). Se pueden identificar tres modelos de

fermentación: apenas la fermentación de la glucosa (K/A); fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa (A/A); y, no fermentación de estos azúcares (K/K) o (K/CN) (Alcocer, 2008).

Citrato de Simmons, CIT: este medio es utilizado para diferenciar enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía (Mikoleit, 2009). Los microorganismos capaces de utilizar estos compuestos crecen en el medio y producen una reacción alcalina, detectada por el cambio de color del indicador azul de bromotimol de color verde (neutro) a azul (alcalino). El metabolismo del citrato se realiza en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarbóxico. El desdoblamiento del citrato proporciona progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, origina ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos (Simmons, 1926).

Sulfuro Indol Motilidad, SIM: este medio es utilizado para la detección de la producción de H_2S , movilidad de la bacteria y degradación metabólica del aminoácido triptófano en indol, ácido pirúvico y amoníaco por acción de la enzima triptofanasa. El medio está compuesto por peptona caseína la cual es rica en aminoácido triptófano que es degradado por ciertas bacterias convirtiéndolo en indol escatol (metil indol) u ácido indol-acético, las enzimas intracelulares involucradas en este proceso fisiológico son colectivamente llamadas “triptofanasas”. Los productos intermediarios formados en mayor cantidad en la degradación del triptófano son el ácido pirúvico que produce indol por desaminación- deaminación y el escatol formado por la descarboxilación del ácido acético. La presencia de indol en el medio de cultivo es revelada por la adición del reactivo de

Ehrlich produciéndose la reacción química donde el p-dimetil-amino-benzaldehído se une a la molécula de indol produciendo un compuesto quinoidal de coloración roja, evidenciado por la formación de un anillo en la capa alcohólica superficial del medio. La detección de la motilidad es posible debido a la contextura semisólida del medio de cultivo, cuyo crecimiento radial desde la línea central del inóculo indicará una motilidad positiva del organismo (Difco, 1984).

Fenilalanina, FA: Este medio de cultivo evidencia la habilidad de un microorganismo en desaminar la fenilalanina con modificación del medio de cultivo por la formación de ácido fenilpirúvico. La fenilalanina es un aminoácido que se transforma en cetoácido fenilpirúvico por desaminación oxidativa. Para evidenciar la formación de este ácido se agrega cloruro férrico el cual forma un complejo de color verde con el ácido fenilpirúvico (Difco, 1984).

Motilidad Indol Lisina, MILI: Este medio se utiliza como ayuda en la identificación de Enterobacteriaceae en base a su movilidad, producción de indol, lisina descarboxilasa y lisina deaminasa. La presencia de clorhidrato de lisina permite la detección de la actividad de las enzimas: lisina descarboxilasa o lisina deaminasa. La lisina presente en el medio puede ser descarboxilada por microorganismos que poseen la enzima lisina descarboxilasa. La lisina es transformada en amina cadaverina lo que produce la coloración violeta del medio debido al viraje del indicador de pH púrpura de bromocresol. La descarboxilación solo tiene lugar en medio ácido; la acidificación de este medio se da por fermentación de la glucosa. Los microorganismos lisin Descarboxilasa- negativos, pero fermentadores de glucosa, producen un viraje al amarillo de la totalidad del medio de cultivo (Difco, 1984).

Motilidad Indol Ornitina, MIO: Este medio de cultivo semisólido es utilizado para detectar movilidad bacteriana, producción de indol y deaminasa de ornitina (Difco, 1984). La triptéina es una fuente importante de triptófano, lo cual permite la detección de la enzima triptofanasa. Esta enzima, actúa sobre el triptófano liberándose indol, el cual se combina con el aldehído presente en el reactivo revelador (reactivo de Kovacs o de Ehrlich), originando un compuesto de color rojo. El agar es el agente solidificante, el cual se encuentra en una concentración que le da la característica de medio semisólido, útil para evidenciar la motilidad bacteriana (Terragno *et al.*, 2007). La reacción de ornitina positiva se indica mediante un color púrpura en todo el medio. El microorganismo bajo prueba fermenta la dextrosa del medio acidificándolo. Esta reducción de pH provoca que el indicador púrpura de bromo cresol se torne de color amarillo y se faciliten condiciones óptimas para la descarboxilación de la ornitina del medio. Si esta reacción ocurre el pH vuelve a subir y como resultado el indicador se vuelve púrpura (Difco, 1984).

Reacciones Rojo de Metilo y Voges-Proskauer, RM/VP: Estas reacciones son utilizadas para visualizar la producción de compuestos que se originan por los diferentes tipos de fermentación de la glucosa de ácidos por vía de fermentación ácido mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol. Se conocen dos tipos generales: la fermentación ácido mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol (butilenglicólica). En la fermentación ácido mixta se forman fundamentalmente lactato, acetato y succinato y en menor cantidad etanol, H₂ y CO₂ mientras que en la vía del butanodiol se forman cantidades menores de acetato y succinato, siendo los principales productos el butanodiol, etanol, H₂ y CO₂ (Alcocer, 2008).

El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo de viraje entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo), que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación ácido mixta (Alcocer, 2008).

El acetil-metil-carbinol o acetoína, es un producto intermediario en la producción de butanodiol. En medio alcalino y en presencia de oxígeno la acetoína es oxidada a diacetilo. Este se muestra en presencia del revelador de VP produciéndose un color rojo fucsia (Alcocer, 2008).

Urea, U: La utilización del medio agar urea permite diferenciar los microorganismos capaces de utilizar la urea como única fuente de carbono por acción de la enzima ureasa. La urea es una diamida del ácido carbónico que puede ser hidrolizada con liberación de amoníaco y dióxido de carbono. Durante la incubación se forma amonio, el mismo que produce una reacción alcalina, cambiando el color original a un color fucsia-rojizo. Esta reacción alcaliniza el medio haciendo que el indicador de pH rojo de fenol cambie de amarillo a rojo (Rustigian y Stuart, 1941).

4.3.2 PROCEDIMIENTO

Hecktoen: Para el transporte y aislamiento de colonias en placas de agar Hecktoen, se realizaron estrías continuas a partir de los aislados conservados en congelamiento a -80 °C en medio Skin Milk (Difco), en Zurita&Zurita Laboratorios. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas.

Los aislados conservados en crioviales, obtenidos del Hospital Vozandes, fueron transportados previamente en caldo BHI e incubados a 37 °C durante 24 horas. A partir de este cultivo se sembró en el agar Hecktoen por medio de estrías continuas y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Las muestras inoculadas en tubos de pruebas bioquímicas se sembraron tomando una porción de la masa de células de una única colonia típica aislada, y fueron incubados a 37 °C durante 18 a 24 horas, para su posterior interpretación.

TSI: con la ayuda de una aguja bacteriológica se realizó la inoculación por estocada profunda y estría superficial (Alcocer, 2008).

CIT: La inoculación fue realizada mediante estría superficial con el uso de una aguja bacteriológica (Alcocer, 2008).

SIM: para la inoculación se utilizó la técnica de picada profunda llevando la aguja bacteriológica hasta tres cuartos del agar. Para revelar la producción de indol, se añadió al medio de 3 a 5 gotas del reactivo de Ehrlich (Alcocer, 2008).

FA: Por medio de estría superficial se inoculó una porción de masa de células. Pasado el tiempo de incubación, se adicionó 4 a 5 gotas de solución de clorato férrico directamente al tubo inclinado y se procedió a la lectura (Alcocer, 2008).

MILI: con el uso de una aguja bacteriológica se inoculó la muestra por medio de picada profunda llevando el aguja bacteriológica hasta tres cuartos del agar (Alcocer, 2008).

MIO: la inoculación se realizó por picada profunda llevando la aguja bacteriológica hasta tres cuartos del agar. Luego de la incubación se realizó la lectura de la motilidad y degradación de ornitina, a continuación se agregaron de 3 a 5 gotas del reactivo de Ehrlich para revelar la prueba de indol (Alcocer, 2008).

MR/VP la siembra se realizó en dos tubos de caldo por dilución con ayuda de un asa bacteriológica. Para la prueba de VP se adicionaron 0,6 mL de una solución naftol 5%, se agitó y enseguida se adicionaron 0,2 mL de una solución de KOH al 40%, se dejó reposar y se observó el tubo periódicamente hasta por una hora. Para la prueba de RM se adicionaron de 2 a 4 gotas de Rojo de metilo observando inmediatamente (Alcocer, 2008).

U: la inoculación fue realizada con el uso de una aguja bacteriológica por medio de estrías continuas superficiales (Alcocer, 2008).

4.4 IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO

Shigella

Las pruebas bioquímicas por sí solas no logran la identificación a nivel de especie. Por lo tanto es indispensable la identificación por pruebas serológicas.

La serotipificación se realizó utilizando la técnica de aglutinación en lámina propuesta por Edwards y Edwing (1972) y siguiendo las recomendaciones del Manual Difco Shigell O Antisera (2011). Mediante esta técnica se puso en evidencia la presencia de antígenos somáticos O enfrentando el antisuero polivalente (anticuerpo) con la bacteria (antígeno). Las cepas fueron enfrentadas con los cuatro antisueros policlonales comerciales Difco *Shigella* Antisera Poly de serogrupos: Grupo A, *S. dysenteriae*, serotipos 1-7; Grupo B, *S. flexneri*, serotipos 1-6; Grupo C, *S. boydii*, serotipos 1-7; y, Grupo D, *S. sonnei*, serotipos I y II.

4.4.1 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Debido a la característica del género *Shigella* de ser inmóviles, la técnica de aglutinación en lámina con el uso de sueros policlonales comerciales únicamente evidencia los antígenos somáticos O, compuestos por cadenas polisacáridicas del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa, integrante de la pared celular. Cuando un antisuero específico se mezcla con una suspensión de un cultivo puro de *Shigella* se observa una reacción de aglutinación. Los antígenos somáticos O están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos; su composición es aproximadamente: 60% polisacáridos, 20-30% lípidos y 3,5-4% hexosamina. Son cadenas laterales de polisacáridos del lipopolisacárido de envoltura (LPS) que se encuentra en todos los microorganismos Gram negativos. La cadena de polisacáridos del antígenos somáticos O es un polímero de unidades repetidas de oligosacáridos (de 3 a 5 azúcares) lineales o ramificados. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena determina la especificidad antigénica somática de la bacteria. Como esta

estructura difiere ampliamente entre los distintos serogrupos, hay diferencias en la especificidad antigénica O (Caffer y Terragno, 2001).

4.4.2 PROCEDIMIENTO

Para la realización de los análisis de aglutinación, los aislados fueron inoculados en placas Petri con agar nutriente (Difco™) e incubados a 37 °C por 18 horas.

Una vez aisladas las bacterias se realizó un análisis de la autoglutinación, las colonias fueron transferidas a un porta objetos de aglutinación y diluidas con una 35 µl de solución salina estéril al 0,85%. El porta objetos de aglutinación fue agitado constantemente por un minuto y posteriormente se observó la presencia o ausencia de aglutinación. En el caso de existir aglutinación se registró presencia de cepas rugosas por lo que no se pudo proceder a realizar la aglutinación con el antisuero sin un previo calentamiento de los aislados. De ser negativa la aglutinación, se procedió a utilizar los antisueros directamente.

Para la utilización de los antisueros policlonales y la validación de los resultados, se realizaron controles positivos y negativos. Para el control positivo se utilizaron las cepas ATCC: *S. sonnei* 25931; *S. boydii* (1) 9207; y *S. flexneri* (2b) 12022. Se tomó una asada de una colonia y se la colocó en el porta objetos de aglutinación, posteriormente fueron colocados 35 µl del suero correspondiente con el grupo, se agitó el porta objetos de aglutinación por un minuto y se observó la presencia de aglutinación. Para los controles negativos se utilizó un agota de cloruro de sodio al 0,85% y la cepa *Escherichia coli*

ATCC con 35 μ l de cada suero policlonal, y se agitó el portaobjetos de aglutinación y se observó la ausencia de aglutinación.

Una vez realizados estos ensayos se iniciaron las pruebas con los diferentes aislados. A partir de las muestras aisladas en las cajas Petri con agar nutriente, para cada aislado, una colonia fue trasferida hacia el porta objetos de aglutinación, posteriormente se colocaron 35 μ l del respectivo antisuero policlonal. El porta objetos de aglutinación fue agitado por un minuto y se observó la presencia o ausencia de aglutinación para cada antisuero.

La lectura de la presencia o ausencia de aglutinación se realizó dentro de una cabina de flujo laminar con el uso de una luz indirecta.

4.5 SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

Para este procedimiento fue utilizado el método de difusión con disco (Bauer *et al.*, 1966) en agar Müller-Hinton (Difco TM) siguiendo las recomendaciones propuestas por el “Clinical and Laboratory Standars Institute” (CLSI 2010).

Los antibióticos estudiados están indicados para la utilización en bacterias enteropatógenas causantes de síndrome diarreico. Estos son: ácido nalidíxico (30 μ g), tetraciclina (30 μ g), nitrofurantoina (300 μ g), ampicilina (10 μ g), ceftazidima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), cloranfenicol (30 μ g), trimetoprim/sulfametoxazol (23,75/1,25 μ g), azitromicina (15 μ g). Todos los antibióticos utilizados fueron de la marca BB-BBL. Los puntos de corte para cada antibiótico fueron

establecidos según las recomendaciones del CLSI (2010) para *Enterobacteriaceae* tomándose la medida en milímetros, siendo resistente, intermedio y sensible respectivamente: ácido nalidíxico ≤ 13 , 14-18, ≥ 19 ; tetraciclina ≤ 11 , 12-14, ≥ 15 ; nitroflurantoína ≤ 14 , 15-16, ≥ 17 ; ampicilina ≤ 13 , 14-16, ≥ 17 ; ceftazidima ≤ 14 , 15-17, ≥ 18 ; ceftriaxona ≤ 13 , 14-20, ≥ 21 ; ciprofloxacina ≤ 15 , 16-20, ≥ 21 ; cloranfenicol ≤ 12 , 13-17, ≥ 18 ; trimetoprim/sulfametoxazol ≤ 10 , 11-15, ≥ 16 ; y, azitromicina ≤ 13 , 14-17, ≥ 18 . Este último según las especificaciones del fabricante, pues el CLSI no ha establecido aún el punto de corte para este antibiótico.

4.5.1 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El método de Kirby- Bauer de difusión con disco, es una técnica descrita en 1966 que se basa en la utilización de discos de papel impregnados de antibiótico con una carga conocida previamente. El antibiótico en el disco al ser colocado sobre una superficie de agar inoculada previamente con bacteria en forma de una fina lámina uniforme, se difunde radialmente desde el disco a través del agar produciendo halos de difusión de acuerdo a la efectividad y grado de difusión del antibiótico. La característica de difusión del antibiótico permite que la concentración inicial vaya disminuyendo a medida que el antibiótico se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir el crecimiento bacteriano produciéndose un halo de inhibición.

El diámetro de la zona de inhibición se incluye dentro de las categorías de sensible, intermedio o resistente de acuerdo a las tablas publicadas para este propósito por los organismos de control como el CLSI (2010).

4.5.2 PROCEDIMIENTO

La prueba de sensibilidad a antimicrobianos se realizó transfiriendo de tres a cinco colonias, aisladas previamente en agar nutriente con un crecimiento a 37 °C por 18 horas, a caldo Müeller-Hinton (Difco TM), hasta obtener el 0,5 en la escala de MacFarland medida a través de un espectrofotómetro (Termoespectronic 20D+) a 620 nm para de esta manera obtener un inóculo de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

La suspensión fue sembrada en la superficie de placas Petri con agar Müeller-Hinton (Difco TM) con un hisopo estéril, se estrió de manera continua en 4 sentidos. Los discos de antibiótico fueron colocados con ayuda de una pinza estéril. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 horas. Los diámetros de los halos de inhibición fueron medidos (en milímetros) con una regla y comparados con la tabla del CLSI (2010).

Se utilizó como control las cepas ATCC *Shigella sonnei* 25931, *Shigella boydii* (1) 9207 y *Shigella flexneri* (2b) 12022.

4.6 DETECCIÓN MOLECULAR DE GENES DE VIRULENCIA EN *Shigella* spp.

4.6.1 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL

Cada aislado fue inoculado en 5 ml de caldo Tripticasa de Soya (TSB) (Difco TM) a 37 °C por 24 horas. Posteriormente 1,5 ml del caldo fueron transferidos a microtubos estériles y centrifugados por un minuto a 14 000 revoluciones por minuto (rpm). Una vez

desechado el sobrenadante, las muestras fueron lavadas una vez con 1 ml de buffer hidroximetil aminometano 50 mM + ácido etilendiaminotetraacético 20 mM, pH 8 (buffer Tris – EDTA) y consecuentemente centrifugadas por 2 minutos a máxima velocidad (14 000 rpm). Finalizados estos pasos, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 400 µL de Tris 50 mM + EDTA 20 mM, pH 8; a continuación fueron añadidos: 50 µL de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%, 10 µL de lisozima (a 5 mg/ml) y 5 µL de proteinasa K (a 20 mg/ml), y esta reacción fue incubada a 37 °C por 1 hora.

Una vez transcurrido el tiempo la muestra fue centrifugada por 2 minutos a máxima velocidad (14 000 rpm). El sobrenadante fue recolectado en nuevos microtubos estériles y mezclado con la pipeta P1000 5-10 veces para quebrar proteínas. A esta reacción fueron adicionados: 23,25 µL de cloruro de sodio 5M y 46,5 µL de solución de acetato de sodio 3M. Subsiguientemente esta mezcla fue incubada a 4 °C por 1 hora.

A continuación la muestra fue centrifugada por 15 minutos a máxima velocidad (14 000 rpm), a esto se adicionó 660 µL (2 volúmenes) de etanol helado al 100%, inmediatamente la muestra fue dejada en reposo de 10-15 minutos. Los tubos con la solución fueron centrifugados por 15 minutos a máxima velocidad y el sobrenadante fue descartado. Finalmente las muestras se dejaron a secar en una cabina de flujo laminar y el ADN fue resuspendido con 200 µL de 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5 (buffer Tris-EDTA).

En todas las sesiones de extracción se utilizó 1,5 ml de medio de cultivo TSB estéril como control negativo de extracción.

El templado obtenido fue implementado a las reacciones de PCR para la confirmación de integridad del ADN y análisis de presencia o ausencia de los genes de virulencia a estudiar.

4.6.2 CONFIRMACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN

La confirmación de la aptitud del ADN para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa PCR fue realizada mediante la amplificación del gen codificante de la subunidad 16S del ribosoma bacteriano.

Los iniciadores utilizados para la amplificación del gen 16S descritos por Malhotra-Kumar *et al.* (2005) se encuentran detallados en la Tabla 2. Para medir el peso molecular de las bandas obtenidas se utilizó 100 bp DNA Ladder TrackIt™ (Invitrogen).

La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25 µl utilizando las siguientes concentraciones: 1 µl ADN, 12,5 µl Green GoTaq® Master Mix (Promega), 1 µl de cada iniciador (Invitrogen) y 9,5 µl de agua libre de nucleasas (Promega). Como control negativo se utilizó agua de grado molecular y como control positivo para el gen 16S ARNr se empleó la cepa CB-QCA 3337 *Shigella flexneri*.

El ciclo de amplificación del gen 16S fue llevado a cabo en un termociclador Labnet Multigene Model TC9600-G programando un ciclo de denaturalización inicial a 93 °C por 3 minutos, seguido de 27 ciclos, los cuales consistieron en un paso de denaturalización a 93 °C por 30 segundos, seguido de un paso de hibridación a 59,3 °C 45 segundos, y un último paso de extensión a 65 °C por 45 segundos; finalmente un ciclo de

extensión a 72 °C durante 5 minutos. Los productos resultantes de la reacción en cadena de la polimerasa fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis electroforético.

4.6.3 OBTENCIÓN DE CEPAS CONTROL

Para la obtención de controles positivos de la región 16S ARNr y los genes de virulencia en estudio se envió las muestras a Macrogen Korea para su secuenciamiento.

4.6.3.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras fueron purificadas a partir de gel de agarosa utilizando el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y enviadas en tubos eppendorf de 1,5 ml.

4.6.3.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Se utilizó el programa Blast para el alineamiento y análisis de secuencias. Se usó la información enviada en formato FASTA junto con la obtenida de los iniciadores aplicados en este estudio para determinar el tamaño de amplicón y la similitud con las secuencias ya publicadas en la base de datos para cada gen.

4.6.4 ANÁLISIS DE PRESENCIA O AUSENCIA DE LOS GENES DE VIRULENCIA

Para la identificación de genes de virulencia en *Shigella* spp. se emplearon los iniciadores previamente descritos por Fusano *et al.* (1995) y Lüscher y Altewegg (1994) los cuales se encuentran detallados en la Tabla 3.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se usó el ADN total obtenido en la sección 4.6.1. Las condiciones de amplificación utilizadas son descritas por Lin Thong *et al.* (2005) y Vargas *et al.* (1999), con modificaciones.

Como control negativo se utilizó agua de grado molecular en lugar de ADN y como control positivo para todos los genes en estudio se empleó la cepa CB-QCA 3349 *Shigella flexneri* pues este aislado posee cuatro de los cinco genes en estudio: *ipaH*, *ial*, *set1A* y *set1B*.

La PCR fue estandarizada en un volumen de 25 µl, conteniendo: 12,5 µl de Green GoTaq® Master Master Mix (Promega), 1 µl de cada iniciador (Invitrogen) y 1 µl de ADN.

El programa de amplificación de los genes fue aplicado utilizando un termociclador Labnet Multigene Model TC9600-G. Se inició el programa de PCR con una denaturación inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con una denaturalización a 95 °C durante 50 segundos, hibridización, para los genes *ipaH*, *ial*, y *set1B* a 52 °C por 1,5 minutos; para el gen *set1A* a 48 °C por 1,5 minutos; para el gen *Stx* a 55 °C por 1,5

minutos; y, extensión a 72 °C durante 2 minutos, seguido de un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 minutos.

El peso molecular de las bandas obtenidas para cada gen fue medido visualmente mediante el uso de 100bpDNA Ladder TrackIt™ (Invitrogen).

4.6.5 TINCIÓN Y VISUALIZACIÓN DE CALIDAD DE LA EXTRACCIÓN DEL ADN Y PRODUCTOS DE PCR

La electroforesis del gel se realizó en una cámara WWR™ a 125 Voltios por 45 minutos en tampón 1X con 89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico y 2,50 mM de EDTA (TBE 0,5X).

La tinción de los geles se realizó con 2 ml de solución 1X Sybr Gold 10,000X en DMSO (Invitrogen) para luego ser visualizados en un transiluminador Safe Imager (Invitrogen) y fotodocumentados en el sistema de captura de imágenes MiniBis Pro (DNR Bio- Imaging Systems) con la ayuda del programa informático GelCapture 4.5.3.

4.7 MANTENIMIENTO DE BACTERIAS

Una vez identificados los aislados las especies del género *Shigella* spp., fueron conservadas en la Colección Bacteriana Quito Católica, CB-QCA en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas realizando copias tanto en agar nutriente a temperatura ambiente como en caldo BHI con glicerol a -80 °C. Para la conservación de los aislados a temperatura ambiente, fue almacenada una copia de los

cultivos en tubos de vidrio 10X120 mm con tapa de caucho hermética, conteniendo agar nutriente con crecimiento de 24 horas a 37 °C. Para la conservación de los aislados por congelamiento, inicialmente cada muestra fue sembrada en 5 ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) e incubados a 37 °C por 18 horas. Posteriormente fue adicionado 30% de glicerol estéril y se distribuyeron alícuotas de 1 ml a tubos eppendorf estériles, en número de 4 copias, tres copias fueron almacenadas a -80 °C y una copia a -20 °C.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis porcentual de los resultados se realizó empleando Microsoft Office Excel 2010 (©2010 Microsoft Corporation).

Para el estudio de los resultados obtenidos tanto en serotipaje como en presencia de genes de virulencia, y resistencia a antimicrobianos, se utilizó el método estadístico de análisis de correspondencias múltiples (MCA); donde se determinó la contribución de varios factores en un simple evento o resultado, mediante la comparación de los diferentes serotipos utilizados, con la presencia de genes, y la resistencia a antibióticos individualmente.

Para este análisis se empleó el programa estadístico informático “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) versión 12,0.

5 RESULTADOS

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

De los 82 aislados 49 muestras (59,75%) fueron obtenidas a partir de heces, 18 muestras (21,95%) a partir de secreciones vaginales, y 15 muestras (18,29%) no tiene origen determinado debido a que éste no se registró al realizar la congelación (Figura 1).

Los aislados positivos para *Shigella* fueron 79. Del total de 82 aislados recolectados dos aislados resultaron no viables y uno se reidentificó como *Escherichia coli*.

5.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DEL GÉNERO *Shigella*

Los aislados positivos para *Shigella* presentaron las características típicas para el género:

En el agar Hecktoen las colonias de *Shigella* presentan una coloración verde con consistencia húmeda y en relieve (Difco, 1984) (Figura 2).

Para el TSI el género *Shigella* se presenta como un microorganismo fermentador únicamente de glucosa, se observó una estría alcalina en el ápice del tubo y un fondo ácido de color amarillo (rojo/amarillo); no presenta coloración negra debido a que no es productor de H₂S y tampoco se observa la producción de gas (Terragno *et al.*, 2007). (Figura 3-A).

Shigella es un microorganismo citrato permeasa negativo por lo que el medio Citrato de Simmons se mantiene inalterado y permanece de color verde sin crecimiento bacteriano (Mikoleit, 2009) (Figura 3-B).

En el medio SIM se evidencia la falta de producción de indol con la adición del reactivo de Ehrlich, además se observa que la bacteria no produce H₂S y que su motilidad es negativa (Figuras 3- C y 3-J).

Las bacterias pertenecientes al género *Shigella* se presentan como microorganismos incapaces de deaminar la fenilalanina por lo que no se da una modificación en el color del medio (Figura 3-D).

En la lectura del medio MILI se observó que los microorganismos son lisina-descarboxilasa negativos, además de confirmarse la motilidad (Figura 3-E).

En la lectura en el medio MIO la especie *S. sonnei* es la única ornitina positivo presentándose un tubo de color púrpura completo (Figura 3-F) mientras que el resto de especies (*S. dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. boydii*) son ornitina negativos presentándose los tubos de color amarillo que pueden ser púrpura en la parte superior (Kingombe *et al.*, 2006) (Figura 3-G).

El género *Shigella* tiene una motilidad negativa ya que no presentan flagelos. La lectura del indol (triptofanasa) en las especies *boydii*, *flexneri* y *dysenteriae* puede ser positiva o negativa mientras que para la especie *sonnei* es siempre negativa (Kingombe *et al.*, 2006).

Sin embargo, la única técnica para definir el nivel de especie dentro de género *Shigella* es la serotificación.

Para la prueba de RM se observa que todos los miembros del género *Shigella* son positivos (Figura 3-H), mientras que para la prueba VP se presentan negativos.

Los microorganismos ureasa negativos no cambian el color del medio, que es entre rosado pálido y amarillo. *Shigella* es siempre ureasa negativa (Figura 3-I).

5.3 IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO

Shigella

Por medio del método de aglutinación en lámina (Figura 4) se obtuvo la identificación de las especies del género *Shigella* descritas en la Tabla 4, obteniéndose 50 aislados (63,29%) positivos para *Shigella flexneri*, 23 aislados (29,11%) para *Shigella sonnei*, 6 aislados (7,59%) positivos para *Shigella boydii*, y 0,00% de aislados positivos para *Shigella dysenteriae* (Figura 5).

5.4 SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

La sensibilidad a antimicrobianos obtenida para los diferentes antibióticos enfrentados con los aislados de *Shigella* spp. se observa en la Tabla 6. Como control positivo fue incluido el análisis de las cepas ATCC: *S. sonnei* 25931; *S. boydii* (1) 9207; y *S. flexneri* (2b) 12022; las cuales mostraron sensibilidad a todos los antibióticos utilizados (Figura 6).

Analizando globalmente al género, se observó que 76 aislados (96,20%) presentan una resistencia a tetraciclina; 75 aislados (94,94%) fueron resistentes a ampicilina; 68 aislados (86,08%) fueron resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol; 67 aislados (84,81%) presentaron resistencia a cloranfenicol; 12 aislados (15,19%) fueron resistentes a azitromicina, 8 aislados (10,13%) fueron resistentes a ácido nalidíxico; 5 aislados (6,33%) presentaron resistencia a nitrofurantoina; 1 aislado (1,27%) fue resistente tanto a ceftriaxona como a ciprofloxacina; y 0,00% de los aislados fueron resistentes a ceftazidima (Figuras 7, 8 y 9).

5.4.1 PATRONES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA MOSTRADOS POR LOS AISLADOS DE *Shigella*

Una vez analizada la sensibilidad a antibióticos presentada por los aislados de *Shigella* utilizados en el presente estudio, se realizó una clasificación según patrones específicos de resistencia antimicrobiana mostrada durante el análisis. Los patrones de resistencia fueron divididos en 16 categorías representadas por números romanos: I-XVI. Como se observa en la Tabla 5 existen 16 fenotipos de resistencia donde el más prevalente es el fenotipo VI (resistente a Te, C, AM, SXT) con 45 aislados (56,96%); continúa el fenotipo XII (resistente a Te, C, AM) con 6 aislados (7,59%); el fenotipo IV (resistente a Te, C, AM, SXT, AZM con 5 aislados (6,33%); el fenotipo IX (resistente a Te, AM, SXT) con 4 aislados (5,06%); fenotipo III (resistente a Te, C, NA, AM, AZM) con 3 aislados (3,79%); los fenotipos II (resistente a Te, C, NA, AM, SXT, AZM) , V (resistente a F/M, Te, C, AM, SXT), VII (resistente a Te, NA, AM, SXT), VIII (resistente a F/M, Te, AM, SXT), y X (resistente a Te, C, SXT) con el 2,53% (2 aislados); y los fenotipos I (resistente a F/M, Te, CIP, C, NA, CRO, AM, SXT, AZM), XI (resistente a C, AM, SXT), XIII

(resistente a Te, AM), XIV(resistente a Te, AZM), XV(resistente a AM), y XVI (no presenta resistencia) con el 1,27% (1 aislado). Estos datos pueden observarse gráficamente en la Figura 10.

5.4.2 SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS REGISTRADO PARA CADA ESPECIE DE *Shigella* spp.

Se determinó los datos de la resistencia individualmente para cada especie del género *Shigella* spp.

Del total de 79 aislados identificados como *Shigella*, 50 aislados fueron identificados como *Shigella flexneri*. En estos se observó 47 (94%) aislados resistentes a tetraciclina; 46 aislados (92%) a ampicilina; 45 aislados (90%) a cloranfenicol; 41 aislados (82%) a trimetoprim/sulfametoxazol; 5 aislados (10%) a ácido nalidíxico; 3 aislados (6%) a azitromicina; el 2 aislados (4%) a nitrofurantoina; 1 aislado (2%) a ciprofloxacina y ceftriaxona; y 0% a ceftazidima (Figura 11).

Se identificaron 23 aislados como *Shigella sonnei*, de estos 23 aislados (100%) mostraron resistencia a tetraciclina y ampicilina; 22 aislados (95,65%) a trimetoprim/sulfametoxazol; 21 aislados (91,30%) a cloranfenicol; 8 aislados (34,78%) manifestaron resistencia a azitromicina; 3 aislados (13,04%) presentaron resistencia a ácido nalidíxico; 2 aislados (8,70%) presentaron resistencia a nitrofurantoina y ningún aislado registró resistencia a ciprofloxacina al igual que para ceftazidima y ceftriaxona (Figura 12).

En relación a los 6 aislados positivos para *S. boydii* se observó 6 aislados (100,00%) resistentes para los antibióticos ampicilina y tetraciclina; para el antibiótico trimetoprim/sulfametoxazol se observó 5 aislados (83,33%) resistentes; 1 aislado (16,67%) resistente para los antibióticos azitromicina, cloranfenicol y nitrofurantoina; y, para los antibióticos ácido nalidíxico, ceftazidima, ceftriaxona y ciprofloxacina no se observaron aislados resistentes en esta especie (Figura 13).

5.5 DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS GENES DE VIRULENCIA EN *Shigella* spp.

5.5.1 CONFIRMACIÓN DE LA EXTRACCIÓN E INTEGRIDAD DEL ADN

El revelado del gel de agarosa evidenció la presencia de bandas confirmándose así la presencia de ADN total extraído (Figura 14).

En la Figura 15 se observa el gel representativo de la confirmación de la integridad del ADN mediante el uso de iniciadores que amplifican una banda de 100 pb la cual confirma la presencia de la secuencia ribosomal y por lo tanto la integridad del ADN apto para la utilización en reacciones de PCR.

5.5.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Una vez obtenidas las secuencias enviadas desde MacroGen Korea, y las secuencias previamente descritas para cada gen se procedió a analizar los datos con el programa Blast.

Para el gen 16S ARNr se obtuvo un 98% de identidad (Anexo 1), para el gen *ipaH* se obtuvo un 100% de identidad (Anexo 2); para el gen *ial* se obtuvo el 99,00% de identidad en un total de 10 secuencias donde se producen alineamientos significativos (Anexo 3); para el gen *setIA* se obtuvo 100,00% de identidad (Anexo 4); y para el gen *setIB* se obtuvo un 99,00% de identidad (Anexo 5).

5.5.3 ANÁLISIS DE PRESENCIA O AUSENCIA DE GENES DE VIRULENCIA

El análisis de la presencia de los genes fue evidenciado mediante la amplificación en gel de agarosa obteniéndose las bandas con el peso específico para cada gen estudiado. Así para el gen *ipaH* se obtuvieron bandas de 423 pb, para el gen *ial* bandas de 320 pb, para el gen *setIA* bandas de 309 pares de bases y para el gen *setIB* bandas de 147 pb (Figura 16).

Los resultados obtenidos para el total de 79 aislados analizados se observan en la Tabla 8; 72 aislados (91,14%) presentaron el gen *ipaH*; el gen *ial* se presentó en 65 aislados (82,28%); 47 aislados (59,49%) presentaron el gen *setIB*; y 32 aislados (40,51%) el gen *setIA*. Ningún aislado evidenció presencia del gen *Stx* (Figura 17).

5.5.4 PATRONES DE VIRULENCIA MOSTRADOS POR LOS AISLADOS DE *Shigella* spp.

Se realizó una clasificación según patrones específicos de virulencia que mostraron los aislados durante este estudio. Se enumeró los diferentes patrones con número

cardinales del 1 al 10. Como se observa en la Tabla 7 existen 10 genotipos de virulencia donde los más prevalentes son el genotipo 1 (presente para *ipaH*, *set1A*, *set1B*, *ial*) y 10 (presente para *set1A*, *set1B*) con 27 aislados (34,17%); continúa el genotipo 4 (presente para *ipaH*, *set1B*, *ial*) con 19 aislados (24,10%); sigue el genotipo 2 (presente para *ipaH*, *ial*) con 16 aislados (20, 24%); 5 aislados (6,33%) presentan el genotipo 6 (presente para *ipaH*); 4 aislados (5,06%) presentan el genotipo 9 (ausencia de todos los genes); 3 aislados (3,80%) presentan el genotipo 5 (presente para *ipaH*, *set1A*); los genotipos 7 (presente para *set1B*) y 3 (presente para *ipaH*, *set1A*, *ial*) se presentan en 2 aislados (2,52%); y finalmente el genotipo 8 (presente para *ial*) se presenta en 1 aislado (1,26%). Estos datos se pueden observar gráficamente en la Figura 18.

5.5.5 ANÁLISIS DE PRESENCIA DE GENES DE VIRULENCIA REGISTRADA PARA CADA ESPECIE

Para *Shigella flexneri* se obtuvo porcentajes de presencia de genes de virulencia reportados en la Figura 19. Del total de 50 aislados positivos, 46 aislados (92,00%) presentó el gen *ipaH*; el gen *ial* se encontró presente en 41 aislados (82,00%); el gen *set1B* se presentó en 34 aislados (68,00%); y 31 aislados (62,00%) evidencian la presencia del gen *set1A*.

Los porcentajes de presencia de los genes analizados en *S. sonnei* se presentan en la Figura 20. De un total de 23 aislados positivos para *Shigella sonnei*, 21 aislados (91,30%) presentaron el gen *ipaH*; para el gen *ial* se obtuvieron 18 aislados (78,26%) positivos; 10 aislados (43,48%) fueron positivos para la presencia del gen *set1B*; y 1 aislado (4,35%) positivo para el gen *set1A*.

Los resultados obtenidos para la especie *S. boydii* se describen en la Figura 21. De los 6 aislados obtenidos como positivos para esta especie, 6 aislados (100,00%) fueron positivos para el gen *ial*; 5 aislados (83,33%) presentaron el gen *ipaH*; y 3 aislados (50%) presentaron el gen *set1B*; para el gen *set1A* no se reportó resultados positivos.

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La relación entre cada especie y la resistencia a antibióticos se observa en el Anexo 6. Existe alta heterogeneidad en los patrones de resistencia al relacionarlos con las especies con una concentración superior de casos de *S. flexneri* multirresistentes en relación a las otras especies.

La relación obtenida entre las especies y la presencia de genes se observa en el Anexo 7. La presencia de genes *ipaH*, *ial*, *set1A* y *set1B* representan la mayor concentración de casos en *S. flexneri*. Para *S. sonnei* se observó una mayor concentración de casos con presencia de genes *set1A* y *set1B*. En el caso de *S. boydii* se observó una mayor presencia del gen *ial*.

6 DISCUSIÓN

Las enfermedades diarreicas a nivel mundial han sido atribuidas a diferentes agentes infecciosos siendo uno de los más comunes *Shigella*. Mundialmente se producen unos dos mil millones de caso de diarrea cada año y se consideran como la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco (OPS, 2009). A nivel de Latinoamérica y el Ecuador las enfermedades diarreicas agudas (EDA) son la segunda causa de morbilidad en la población en general, y de mortalidad en niños menores de 5 años y adultos mayores (INEC, 2009). Siendo las EDA enfermedad un problema de salud a nivel mundial se considera imprescindible realizar la capacitación en identificación y determinación de la sensibilidad de los antibióticos en enfermedades entéricas debido a razones epidemiológicas (OPS, 2009).

La shigelosis generalmente es transmitida por contacto directo fecal, oral o por la ingestión de comida o agua contaminada. Las moscas y cucarachas son vectores importantes en las zonas donde la eliminación de excretas es abierta (Gonzales y Cecchini, 2003). En este estudio el 59,76% de shigellas fueron obtenidas a partir de muestras de heces fecales. El porcentaje obtenido de muestras de secreción vaginal (18,29%) es considerado como una importante causa de vulvo vaginitis en países en vías de desarrollo. La sintomatología es caracterizada por secreción vaginal con moco y sangre pues los mecanismos de patogenicidad hacia el epitelio intestinal se reproducen en el epitelio vaginal pues las cepas tienen los mismos factores de patogenicidad (Gonzales y Cecchini, 2003).

Entre los marcadores fenotípicos la serotipificación es el método de mayor agudeza para la especiación del género *Shigella*. Este método permite realizar estudios de vigilancia que determinen la prevalencia de serogrupos y serovariedades en diferentes zonas geográficas, ya sea en estudios de brotes o de casos esporádicos (Guerrant *et al.*, 1999). En este estudio se utilizó con el 100% de éxito el método de serotipaje en los aislados de *Shigella* obteniéndose la presencia de las especies *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. boydii*. No se han descubierto hasta la fecha cepas de *S. dysenteriae* en el Ecuador y en este estudio tampoco se aislaron.

Estudios relativos a la identificación de especies dentro del género *Shigella* han determinado que en países en vías de desarrollo la circulación prevalente de ciertas especies se encuentra relacionada con el nivel socioeconómico, siendo los más habituales *S. flexneri* en países en vías de desarrollo y *S. sonnei* en países industrializados, *S. boydii* y *S. dysenteriae* presentan una menor frecuencia. No se ha encontrado aun una explicación para este comportamiento (Gonzales y Cecchino, 2003).

En el presente estudio se observó que la especie más común resultó ser *S. flexneri* con un 63,29%, seguido por *S. sonnei* con un 29,11%, *S. boydii* con un 7,59% y finalmente no se reportó presencia de *S. dysenteriae*. Estos datos se revalidan con los datos publicados para Latinoamérica, especialmente estudios realizados en Brasil, Uruguay, Cuba y Argentina donde la información para la prevalencia de estas especies de *Shigella* son similares (Mota *et al.*, 2005; Merino *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008). A diferencia de las publicaciones para países industrializados donde la especie con mayor prevalencia es *S. sonnei*, seguido de *S. flexneri*, *S. boydii* y en menor proporción *S. dysenteriae* (Replogle *et al.*, 2000).

Durante años las enfermedades diarreicas como la shigelosis han sido tratadas mundialmente con el uso de antibióticos como trimetoprim /sulfametoxazol, ampicilina, ciprofloxacina y azitromicina (Silva *et al.*, 2008); sin embargo, la aparición de aislados multirresistentes ha limitado el tratamiento y ha incrementado la prevalencia de la enfermedad (Silva *et al.*, 2008). La diversidad de fenotipos de resistencia mostrados por los aislados pudiera deberse a que la resistencia este siendo mediada por plásmidos, con la excepción para quinolonas y azitromicina, y además por integrones o transposones que estén incorporados al cromosoma bacteriano (Ramírez *et al.*, 2004).

Estudios competentes relacionados a la resistencia a antimicrobianos en *Shigella* spp. en países de Latinoamérica como Brasil, Chile, Cuba, Argentina, y Uruguay reportan una alta resistencia a los antibióticos trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol y ampicilina (Silva *et al.*, 2008; Boehme *et al.*, 2002; Ramírez *et al.*, 2004; Vila *et al.*, 1994; Mota *et al.*, 2005). Mientras que para países como Canadá, Senegal e India se reporta una resistencia a la ampicilina y tetraciclina (Bassa *et al.*, 2010). Para Ecuador según la REDNARBEC, 2008 se ha reportado una multirresistencia a los antibióticos trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol, ampicilina y tetraciclina.

En este estudio se observó una alta resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina y trimetoprim/sulfametoxazol lo que concuerda con los datos reportados a nivel mundial y especialmente en Latinoamérica. La resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol y ampicilina ha sido atribuida a plásmidos transferibles con pesos moleculares de 94,5 a 120 kb (Merino *et al.*, 2004), por lo que puede ser explicada por el intercambio de material genético entre cepas, además cierta resistencia se debe a la presión selectiva pues la

combinación de trimetoprim/sulfametoxazol ha sido muy utilizada para el tratamiento de shigelosis (Mota *et al.*, 2005).

Si bien el número de aislados es bajo (79 aislados), se puede concluir en este estudio a nivel de especie, tanto *Shigella flexneri* como *S. sonnei* y *S. boydii* presentan una alta multirresistencia a tetraciclina, ampicilina y trimetoprim/sulfametoxazol. Para el antibiótico cloranfenicol solamente *S. flexneri* y *S. sonnei* son altamente resistentes y en el caso de *Shigella sonnei* se observa además de los antibióticos mencionados anteriormente, una alta resistencia a azitromicina. Estudios relacionados corroboran lo descrito en este estudio siendo *S. flexneri* multirresistentes a ampicilina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol y cloranfenicol; mientras que para *S. sonnei* la resistencia es observada para los antibióticos ácido nalidíxico, trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina y ampicilina. En el caso de *S. boydii* la multirresistencia se ha observado para ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina (Bassa *et al.*, 2010).

Debido a que existen cepas recurrentes multirresistentes a los antibióticos de primera línea utilizados para combatir la shigelosis, se considera un tratamiento eficaz el uso de ácido nalidíxico y cefalosporinas como la ceftazidima (Replogle *et al.*, 2000). El uso de cefalosporinas de tercera generación como ceftazidima y ceftriaxona está indicado exclusivamente para lactantes que requieren hospitalización debido a la gravedad del cuadro clínico. En adultos y niños menores de 5 años está indicada la ciprofloxacina como droga de primera elección, y la azitromicina está indicada para los niños que no requieren hospitalización (Saurina *et al.*, 2000).

Según los resultados obtenidos en este estudio sería recomendable el uso de estos antibióticos, ya que la resistencia obtenida para ellos es muy baja siendo para el ácido nalidíxico 10,13%, ciprofloxacina y ceftriaxona 1,27% y para ceftazidima un 0,00%, constituyéndose este último el más recomendable pues no se ha observado una resistencia. Es importante recalcar que en este estudio los resultados obtenidos revelaron sensibilidad en el género *Shigella* para el antibiótico nitroflurantoína con un 6,33% por lo que también serían aconsejable para un tratamiento empírico en casos de shigelosis.

El género *Shigella* produce principalmente enfermedades diarreicas que pueden llevar a serias complicaciones debido a que las diferentes especies integrantes del género presentan factores de virulencia como genes de invasión celular, enterotoxinas y exotoxinas que afectan severamente al paciente, lo cual posteriormente en casos severos puede llevar a la muerte (Jiménez y Achí, 2009).

El gen *ipaH* es considerado uno de los genes más estables y presentes en todas las especies de *Shigella* en razón de que se encuentra tanto en el cromosoma bacteriano como en múltiples copias en ADN plasmidial (Lin Thong *et al.*, 2005) además este gen se encuentra identificado en otras bacterias patógenas como en *E. coli* enteropatógena, por lo que se lo considera un gen con altas características virulentas (Aranda *et al.*, 2004); En los análisis realizados el gen *ipaH* fue encontrado en el 91,14% de los aislados, postulándose como el de mayor presencia dentro de los genes analizados en este estudio. La variación de este porcentaje con lo descrito por otros autores se puede deber a que las cepas negativas sufrieron mutación o delección del gen (Silva *et al.*, 2008). Aunque esto es muy poco probable ya que el gen se encuentra en el cromosoma bacteriano y en copias en el plásmido de invasión, estos casos se observan en cepas poco virulentas o algunas que se han

mantenido en congelación por mucho tiempo como es el caso de los aislados utilizados en este estudio (Silva *et al.*, 2008).

Aunque el gen *ial* está encargado de permitir la invasión celular, en algunos casos no se observó la presencia de este. Tal comportamiento se debe a que el gen *ial* reside en una región del plásmido que es un “*hot spot*” para deleción espontánea (Lin Thong *et al.*, 2005). En este estudio se comprobó esta afirmación obteniéndose una presencia del gen en los aislados estudiados del 82,28% siendo el segundo gen presente dentro de los analizados en este trabajo.

En estudios anteriores autores describen que la presencia de los genes *setIA* y *setIB* juntos, únicamente se observan en la especie *S. flexneri* concluyéndose que estos genes se encuentran altamente conservados esta especie (Noriega *et al.*, 1995; Vargas *et al.*, 1999). Según los datos recopilados en este análisis se ratifica lo antes mencionado porque se obtuvo un 34,80% de presencia de estos genes juntos y dentro de este porcentaje el 100,00% de los aislados positivos pertenecen la especie *S. flexneri*, es decir que al presentarse en conjunto estos dos genes únicamente en la especie *flexneri* se podría afirmar que esta es la única especie productora de la toxina Shiga.

La sola presencia de uno de los genes no indica que la cepa sea virulenta por lo que es importante evaluar los resultados globalmente (Lin Thong *et al.*, 2005). En este estudio se formó patrones de virulencia según los genotipos encontrados en los aislados estudiados. El patrón de virulencia con mayor presencia es el número 1 (*ipaH*, *setIA*, *setIB*, *ial*) lo que nos significa que la mayoría de los aislados presentan 4 de los 5 genes

estudiados. Estos resultados sugieren que la mayoría de cepas aisladas son de carácter altamente virulento.

El uso de la técnica de secuenciamiento resultó ser muy útil para la obtención de cepas control para el estudio realizado. Debido a la dificultad en la obtención de cepas para validar los datos obtenidos en el desarrollo de la PCR de los genes de virulencia analizados, fue recomendable el envío de muestras para ser analizadas por secuenciamiento, de modo que a través de programas informáticos de acceso libre, se logró obtener los controles necesitados con gran efectividad.

Los análisis estadísticos demostraron que existe una relación entre las especies y su patogenicidad y virulencia, así se determinó a la especie *S. flexneri* con la mayor presencia de los genes de virulencia estudiados y con la mayor multirresistencia a antimicrobianos. Las especies *S. sonnei* y *S. boydii* presentan a su vez genes de virulencia y multirresistencia pero en menor proporción que la especie *S. flexneri*.

Los resultados conseguidos en este estudio representan los primeros relacionados con genes de virulencia y resistencia a antibióticos en el país. En esta bacteria se observó claramente la presencia de cepas multirresistentes a antibióticos utilizados comúnmente como tratamiento primario de shigelosis, esto, combinado con la alta virulencia de las cepas, representa un problema para el control y tratamiento de esta bacteria.

7 CONCLUSIONES

1. Por medio de métodos bioquímicos y la técnica de serotipaje, se consiguió la identificación de tres de las cuatro especies pertenecientes al género *Shigella*. En estos, la mayor prevalencia se determinó en la especie *S. flexneri* (63,29%); seguido de la especie *S. sonnei* (29,11%); y, finalmente la especie *S. boydii* (7,59%). No se reportó aislados pertenecientes a la especie *S. dysenteriae*.
2. El mayor porcentaje de resistencia a antibióticos observado en los aislados de *Shigella* spp., fue para tetraciclina (96,20%); seguido de ampicilina (91,14%); trimetoprim/sulfametoxazol, (86,08%); y, finalmente, cloranfenicol (84,81%).
3. El perfil fenotípico de patrones de resistencia que se registró con mayor frecuencia fue el caracterizado como VI: Te, C, AM, SXT; seguido de los perfiles XII: Te, C, AM, VI: Te, C, AM, SXT, AZM y IX: Te, AM, SXT.
4. En este estudio se observó además una baja resistencia a ciertos antibióticos como a ciprofloxacina (1,27%) y a ceftazidima (0,00%). En el ámbito de los patrones de fenotipos de resistencia se observa que el patrón XVI (Ninguno) existe en un 1,27% de prevalencia, que nos indica que existen aislados que presentan sensibilidad a todos los antibióticos probados.
5. La caracterización de la virulencia de *Shigella* demuestra una alta concurrencia de los genes que codifican para proteínas que permiten a la bacteria la invasión de las células del hospedero. En este caso se analizó la presencia de los genes *ipaH* e *ial*, obteniéndose 91,14% y 82,28%, respectivamente.

6. Para los genes productores de toxinas, en el caso de los productores de la enterotoxina 1 *set1A* y *set1B*, por separado se los encontró en un 59,49% al gen *set1B* y en un 40,51% al gen *set1A*. Conjuntamente se los encontró en un 34,18%, siendo este el porcentaje final de producción de la enterotoxina 1.
7. No se observó producción de la exotoxina *Shigella* toxin, esto se debió probablemente a que esta toxina es producida en su mayoría para la especie *S. dysenteriae* y en el análisis no se identificó al mismo dentro de las muestras aisladas.
8. Los resultados obtenidos de la presencia de genes de virulencia demuestran que los aislados en general presentan una alta virulencia con respecto a factores que le permiten el ingreso a la célula hospedera. Es decir que los genes *ipaH* e *ial* están causando el ingreso facilitado de la bacteria a la célula hospedera precediendo el desencadenamiento del resto de la cascada molecular que permitiría el avance de la infección dentro de la célula hospedera.
9. La presencia de los genes *set1A* y *set1B* en conjunto únicamente en la población de la especie *S. flexneri* indica que en esta especie se produce la toxina Shiga, y siendo esta la especie con mayor prevalencia en este estudio, se puede concluir que la mayoría de casos de shigelosis pueden llegar a complicarse debido a la acción de la toxina.

8 RECOMENDACIONES

1. En razón de que los patrones de resistencia antimicrobiana cambian constantemente, es importante mantener un monitoreo continuo de la sensibilidad antimicrobiana de *Shigella* para poder guiar de manera adecuada el tratamiento empírico de los cuadros diarreicos en el país.
2. La presencia de aislados multirresistentes a antibióticos es una realidad. Se presentan cefalosporinas de tercera generación y ciprofloxacina como alternativas al tratamiento de shigelosis, pues como se deja constancia en este estudio existe todavía una sensibilidad aprovechable a estos antibióticos.
3. Aunque el tratamiento de shigelosis con antibióticos resulta en el decrecimiento de los síntomas y la excreción del microorganismo, es importante conocer que muchos casos pueden ser manejados con rehidratación y cuidados. Es considerado razonable reservar el tratamiento con antibióticos únicamente en casos severos, sobretodo en pacientes en edades extremas como lactantes y adultos mayores.

9 LITERATURA CITADA

- Alcocer, I. 2008. Manual de laboratorio de Microbiología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador pp. 41-44, 49-50.
- Aranda, K., Fagundes-Neto, U. y Scaletsky, I. 2004. Evaluation of Multiplex PCR for Diagnosis of Infection with Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. Journal of Clinical Microbiology 42 (12): 5849-5853.
- Baron, S. 1996. Medical Microbiology. 4th edition. Texas, EUA .Chap 22.
- Barrantes, K. y Achí, R. 2009. Interacciones celulares en el proceso de invasión de *Shigella* spp. Revista Panamericana de Infectología 11 (2): 56-61.
- Bassa, A., Dadie, A., Guessennd, N., Gbonon, V., Dako, E., Dje, M. y Dosso, M. 2010. Virulence Factors and Resistance Profile of *Shigella* Isolated During Infectious Diarrhea in Abidjan, Côte D'Ivoire. Journal of Applied Sciences Research 6 (6): 594-599.
- Bauer, A. W., Kirby, W. N. W., Sherrins, G. J. y Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology 45: 493-496.
- Beneson, AS. 1997. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. 16^a ed. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C, EUA. pp. 412-416.

- Boheme, C., Iglesias, T., Loyola, A., Soto, L., Rodríguez, G. y Reydet, P. 2002. Comparación de la susceptibilidad de especies de *Shigella* a antimicrobianos de uso habitual en el Hospital Regional de Temuco, Chile. *Revista Médica de Chile* 130 (9): 1021-6.
- Caffer, M. y Terragno, R. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Servicio Enterobacterias – Departamento Bacteriología – INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Buenos Aires, Argentina.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteen International Supplement, CLSI document. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- Cossart, P. y Sansonetti, P. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304: 242-248.
- Dickinson and Company. 2009. Instrucciones de uso – medio en placas listo para su uso. BD Hecktoen Enteric Agar (HE Agar).
- Difco. 1984. Manual Difco. Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología. Décima edición pp. 451, 455, 539, 541, 761, 1019.
- Difco. 2011. Manual Difco *Shigella* Antisera Poly O. Becton, Dickinson and Company. County Clare, Ireland. pp. 11-13.

- Dougherty, M. J., Spach, D. H., Larson, A. M., Hooton, T. M. y Coyle, M. B. 1996. Evaluation of an extended blood culture protocol to isolate fastidious organisms from patients with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (10): 2444-2447.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. y Stackebrandt, E. 2006. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Gamma Subclass.* Third edition. Volume 6. Springer. United States of America. Chap. 3.3.6.
- Edwards, P. y Edwing, W. 1972. *Identification of Enterobacteriaceae.* Third edition. Burgess Publ. Co. Minneapolis, United States of America.
- Fasano A. 2002. Toxins and the gut: role in human disease. *Gut* 50: 9-14.
- Fusano, A., Noriega, F., Maneval, D., Chanasongcram, S., Russell, R., Guandalini, S. y Levine, M. 1995. *Shigella* enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Clinical Investigation* 95: 2853-2861.
- Gonzales, S. y Cecchini, D. 2003. OPS- Diagnóstico e investigación epidemiológica contra las enfermedades transmitidas por alimentos. Módulo 2.
- Guerrant, R. L., Hughes, J. M. y Lima, J. 1999. Diarrhea in developing countries: magnitude, special setting and etiologies. *Journal of Infectious Diseases Supplement* 1: S41.

- Hale, T. 1991. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiological Reviews* (2): 206-224.
- Henhly, H., Sheff, D. y Stamnes, M. 1996. Shiga toxin facilitates its retrograde transport by modifying microtubules dynamics. *Molecular Biology Cell* 17: 4379-4389.
- INEC. 2009. Anuario de Estadísticas Hospitalarias: Camas y Egresos. Diez principales causas de morbilidad. Lista Internacional Detallada-CIE-10.
- Jennison, A. y Verma, N. 2007. The acid-resistance pathways of *Shigella flexneri* 2457T. *Microbiology* 153: 2593-2602.
- Jiménez, K. y Achí, R. 2009. Interacciones celulares en el proceso de invasión de *Shigella* spp. *Revista Panamericana de Infectología* 11 (2): 56-61.
- King, S. y Metzger, W. 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. II. Comparison of Hecktoen Enteric Agar with S and EMB Agar. *Applied Microbiology* 16: 579-581.
- Kingombe, C., Cerqueira- Campos, M., Trottier, Y. y Josée, H. 2006. Isolation and identification of *Shigella* spp. from foods. Health Products and Food Branch. Ottawa. Vol. 3. MFLP-25. Disponible en: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/index_e.html [Consultado el 3 de agosto de 2011].

- Kliegman, R. M., Behrman, R. E., Jenson, H. B. y Stanton, B. F. 2007. Nelson Textbook of Pediatrics. 18th edition. Philadelphia, USA. Chap 196.
- Klotloff, K. L., Winickoff, J. P., Ivanoff, B., Clemens, J. D., Swerdlow, D. L., Sandonetti, P. J., Adak, G. K. y Levine, M. M. 1999. Carga mundial de infecciones por *Shigella*: implicaciones para el desarrollo de vacunas y la aplicación de estrategias de control. *Bulletin of the World Health Organization* 77 (8): 651-666.
- León-Ramírez, S. 2002. Shigelosis (Disentería Bacilar). *Salud en Tabasco* 8 (1): 20-23.
- Lepape, A. y Monnet, D. L. 2009. Experience of European intensive care physicians with infections due to antibiotic-resistant bacteria. *Eurosurveillance* 14 (45): 1939.
- Lima, A., Sidrim, J., Lima, N., Titlow, W., Evans, M. y Greenberg, R. 1997. Molecular epidemiology of multiplex antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (5): 1061-5.
- Ling, J., Kam, K. M., Lam, A. y French, G. 1998. Susceptibilities of Hong Kong Isolates of Multiply Resistant *Shigella* spp. to 25 Antimicrobial Agents, Including Ampicillin plus Sulbactam and New 4-Quinolones. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. pp. 20-23.
- Lin Thong, K., Ling Hoe, S., Puthuchery, S., y Yasin, R. 2005. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. *Journal of Infectious Diseases* 5: 5-8.

- Lüscher, D. y Altwegg, M. 1994. Detection of *Shigellae*, enteroinvasive and enterotoxigenic *E. coli* in the polymerase chain reaction (PCR) in patient returning from tropical countries. *Molecular and Cellular Probes* 8: 285-290.
- Malhotra-Kumar, S., Lammens, C., Piessens., J. y Goossens, H. 2005. Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Macrolide and Tetracycline Resistance Determinants in *Streptococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (11): 4798–4800.
- Mandell, GL., Bennett, JE. Y Dolin, R. 2009. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th edition. Philadelphia, USA. Chap. 224.
- Merino, A., Hreñuk, E., Ronconi, M. y Alonso, M. 2004. Resistencia a antibióticos y epidemiología molecular de *Shigella* spp. en el nordeste argentino. *Revista Panamericana de Salud Pública* 15 (4): 219– 24.
- Mikoleit, M. L. 2009. Laboratory protocol: Biochemical Identification of *Salmonella* and *Shigella* using an abbreviated panel of tests. WHO Global Foodborne Infections Network (formerly WHO Global Salm-Surv) A WHO network building capacity to detect, control and prevent foodborne and other enteric infections from farm to table”. WHO Global Foodborne Infections Network Laboratory Sub-Committee.
- Mota, I., Varela, G., Gadea, M., Caffer, M., Sirok, A. y Schelotto, F. 2005. serotipos, perfil plasmídico y antibiotipos de cepas de *Shigella flexneri* aisladas de niños menores de 5 años con diarrea sanguinolenta usuarios de los servicios de Salud pública. *Revista Médica de Uruguay* 21: 30-36.

NEOGEN Corporation. 2008. Hecktoen Enteric Agar (7138).

Noriega, F. R., Liao, F. M., Formal, S. B., Fasano, A. y Levine, M. M. 1995. Prevalence of *Shigella* enterotoxin I among *Shigella* clinical isolates of diverse serotypes. *Journal of Infectious Diseases* 172: 1408-1410.

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

Organización Panamericana de la Salud. 2005. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Basilia- Brasil.

Ramírez, M., Valdés, N., Bravo, L., Fernández, A. y Castañeda, N. 2004. Perfil plasmídico resistencia antimicrobiana en cepas de *Shigella* aisladas en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 56 (3): 178-85.

Red Nacional de Vigilancia de Resistencia Bacteriana, Ecuador (RENARBEC). 2010. Reporte de Resistencias Bacterianas para el año 2008. Agentes Hospitalarios y Comunitarios. pp. 12.

Replogle, M., Fleming, D. y Cieslak. O. 2000. Emergence of Antimicrobial- Resistance Shigellosis in Oregon. *Clinical Infectious Diseases* 30: 515-9.

- Rustigian, R. y Stuart, C. 1941. Decomposition of urea by *Proteus*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 47: 108-1.
- Sack, R., Rahman, M., Yunus, M. y Khan, E. 1997. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. Clinical Infectious Diseases 24 (1): 102–5.
- Sansonetti, P. 2006. The bacterial weaponry. Lessons from *Shigella*. Annals of de New York Academy of Science 1072: 307-312.
- Saurina, G., Quale, J. M. y Manikal, V. M. 2000. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. Journal Antimicrobial Chemotherapy 45: 895-8.
- Schroeder, G., Naja, J. y Hilbi, H. 2007. Intracellular type III secretion by cytoplasmic *Shigella flexneri* promotes caspase-1-dependent macrophage cell death. Microbiology 153: 2862-2876.
- Silva, T., Nogueira, A., Magalhaes, F., Fagundes, A. Pereira, L. y Puccinelli, P. 2008. Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of *ipa* genes in an infantile population from Porto Velho (western Amazon region), Brazil. Memorias del Instituto Osxaldo Cruz, Rio de Janeiro 103 (7): 731-733.
- Simmons, J. S. 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon-*aerogenes* groups and for isolation of certain fungi. Journal of Infectious Diseases 39: 209-214.

- Suzuki, T. y Sasakawa, C. 2001. Molecular basis of the intracellular spreading of *Shigella*. *Infection and Immunity* 69: 5959-5966.
- Terragno, R., Caffer, M. y Binsztein, N. 2007. Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Shigella* spp. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán". Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
- Tzipori, S., Sheoran, A., Akiyosh, D., Donohue-Rolfe, A. y Trachtman, H. 2004. Antibody therapy in the management of Shiga Toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Clinical Microbiology Review* 17: 926-941.
- Vila, J., Gascón, J., Abadía, S., Gómez, J., Marco, F. y Moreno, A. 1994. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates causing traveler's diarrhea. *Antimicrobiological Agents Chemotherapy* 38 (11): 2668-70.
- Vargas, M., Gascon, J., Jiménez de Anta, M. y Vila, J. 1999. Prevalence of *Shigella* Enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* Strains Isolated from Patients with Traveler's Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (11): 3608-3611.
- WHO. 2011. 10 facts on antimicrobial resistance. Antimicrobial resistance. Fact sheet N°194. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/index.html> [Consultado 6 de agosto de 2011].

10 FIGURAS

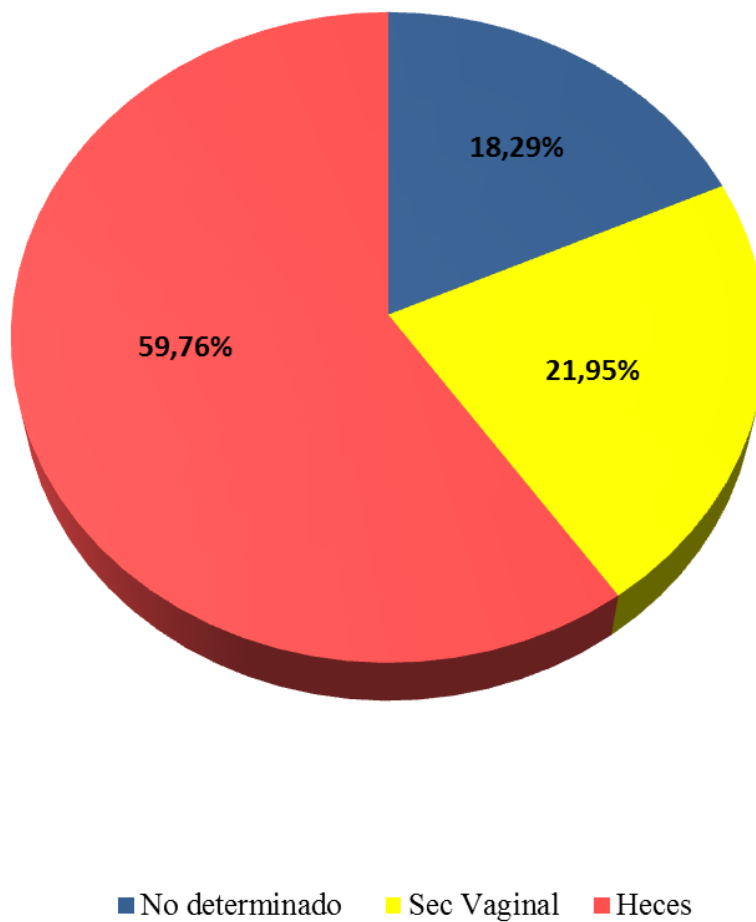


Figura 1 Porcentaje de las principales fuentes de origen de los aislados clínicos de *Shigella* spp. N=82

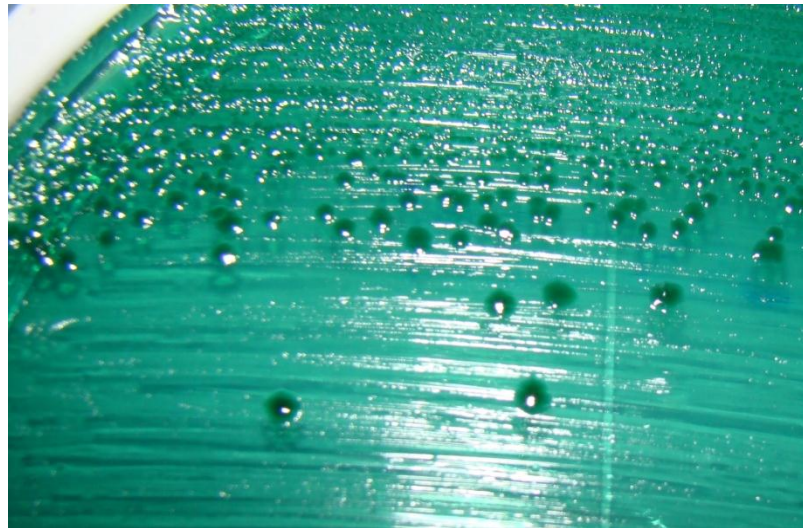


Figura 2. Identificación bioquímica de *Shigella* spp. utilizando agar entérico Hecktoen. Las colonias se presentan de color verde, redondas y húmedas.

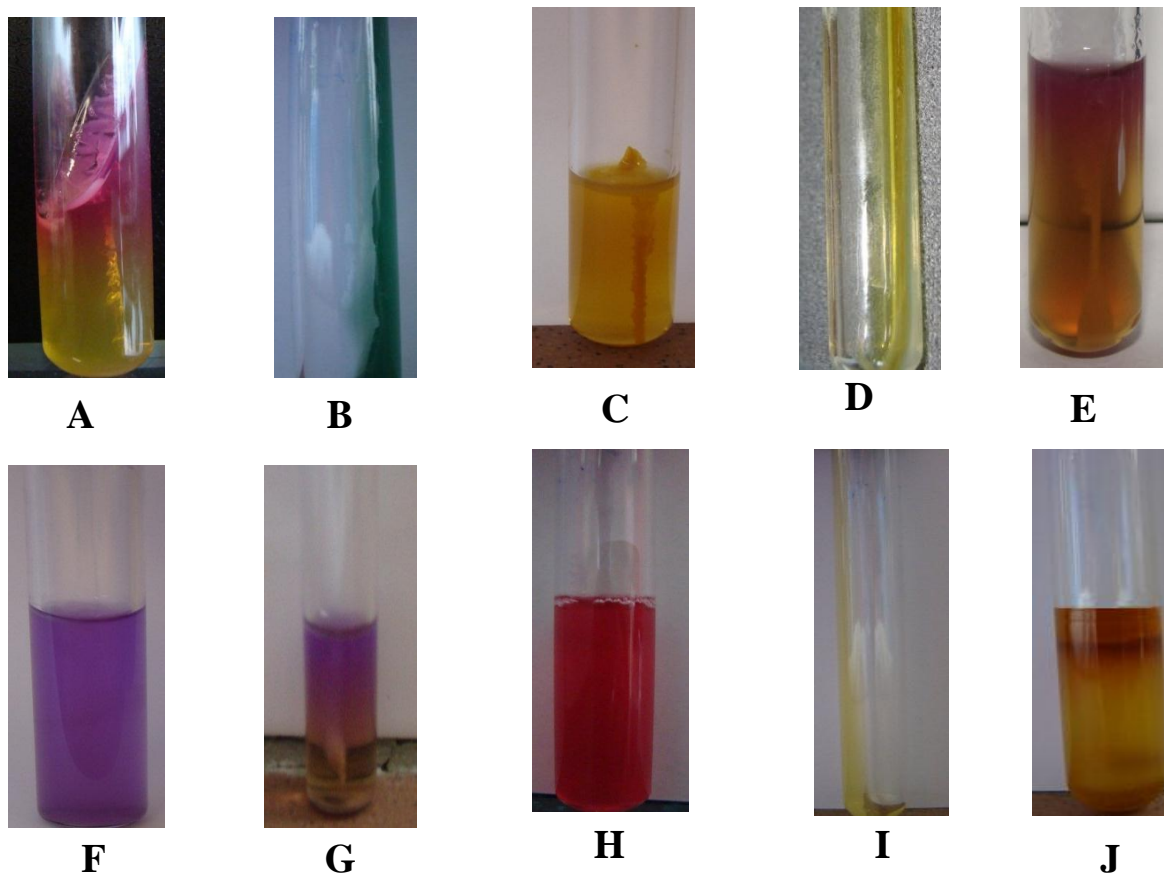


Figura 3. Pruebas de identificación bioquímica para *Shigella* spp. **A.** Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI) con producción de H₂S y gas negativas, presencia de estría alcalina en el ápice del tubo y un fondo ácido de color amarillo (rojo/amarillo) debido a la fermentación de la glucosa. **B.** Agar Citrato de Simmons con reacción negativa. **C.** Agar Sulfato- Indol- Motilidad con resultado negativo para todas las pruebas. **D.** Agar Fenilalanina con reacción negativa. **E.** Agar Motilidad- Indol- Lisina (MILI) con motilidad negativa y lisina descarboxilasa negativa. **F. y G.** Agar Motilidad- Indol- Ornitina (MIO), con motilidad negativa; en la figura F se observa ornitina descarboxilasa positiva propia de *S. sonnei* y en la figura G se observa ornitina descarboxilasa negativa característica de las especies *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. dysenteriae*. **H.** Prueba de Rojo de Metilo (RM) con reacción positiva. **I.** Agar Úrea con reacción ureasa negativa. **J.** Prueba indol negativa observada en el medio SIM.

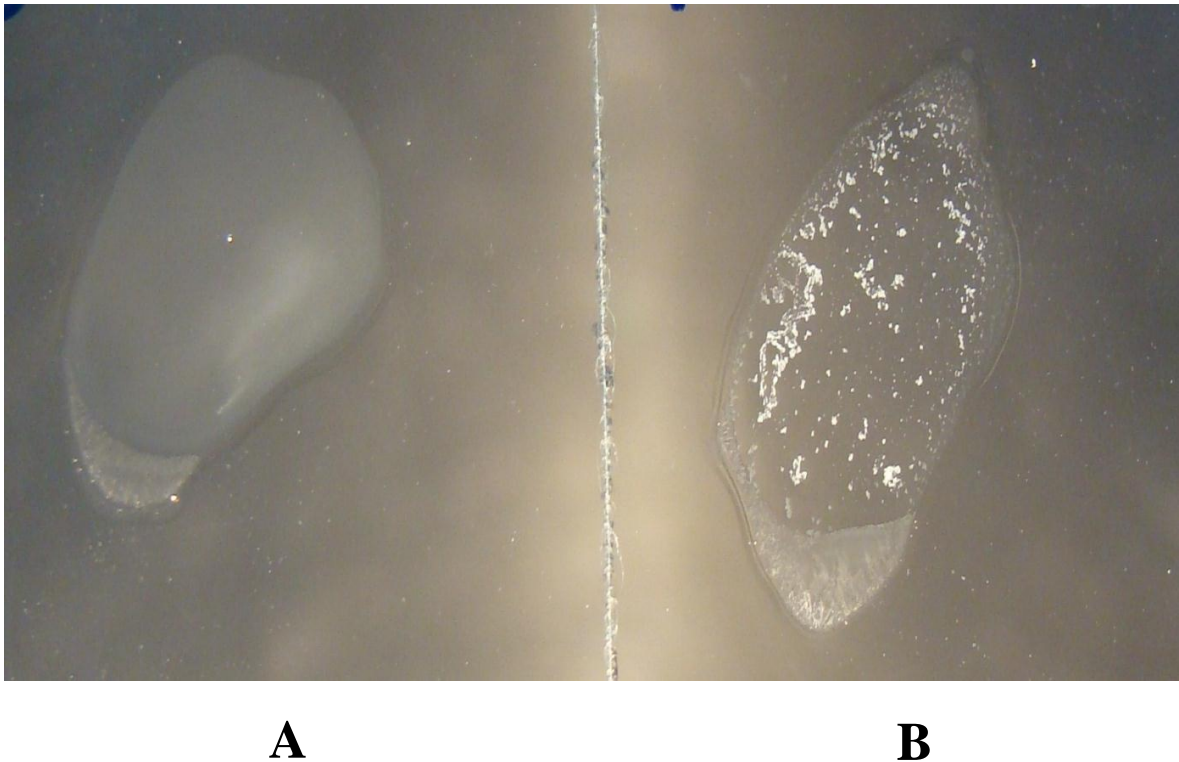


Figura 4. Prueba de aglutinación con antisuero en *Shigella* spp. **A.** Prueba negativa. No se observa aglutinación. **B.** Prueba positiva. Se observa la aglutinación del suero con la bacteria.

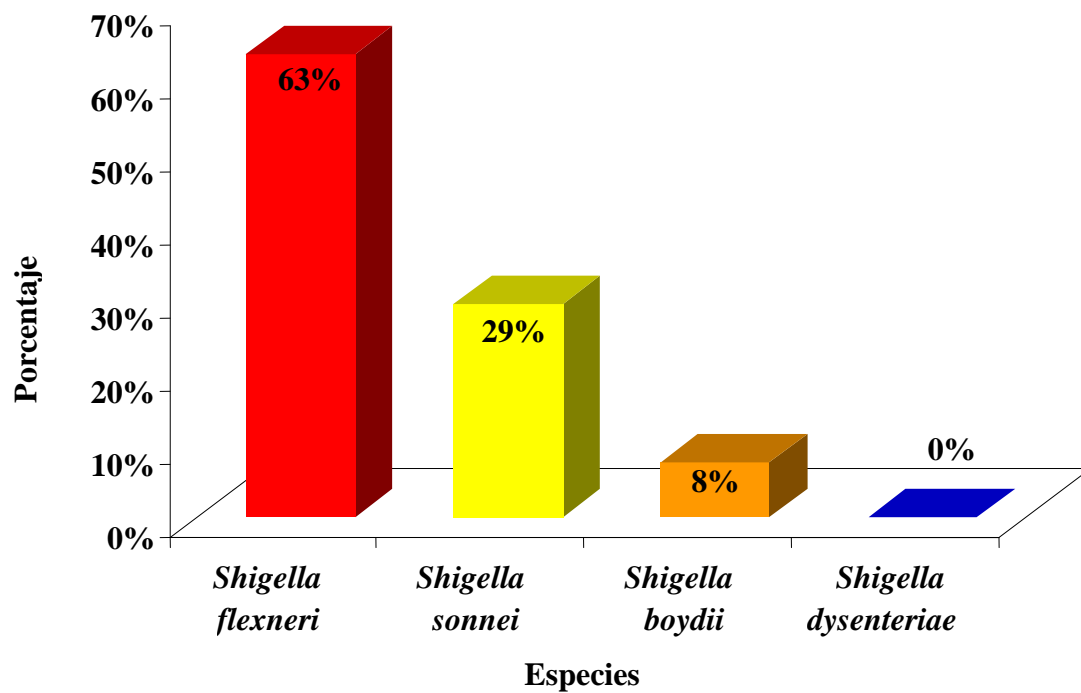


Figura 5. Porcentaje de identificación de las diferentes especies en la población total de aislados de *Shigella* spp. N=79

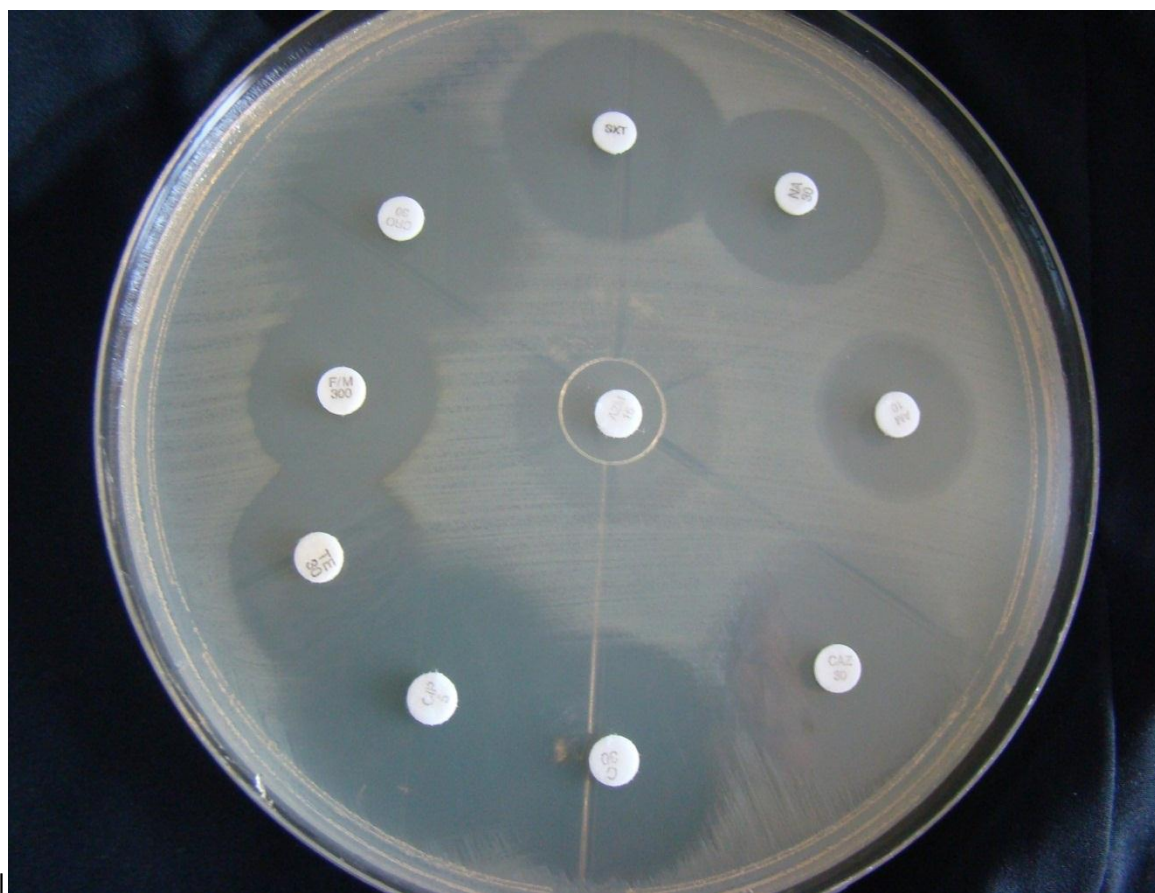


Figura 6. Antibiograma realizado en la cepa ATCC *Shigella flexneri* (2b) 12022

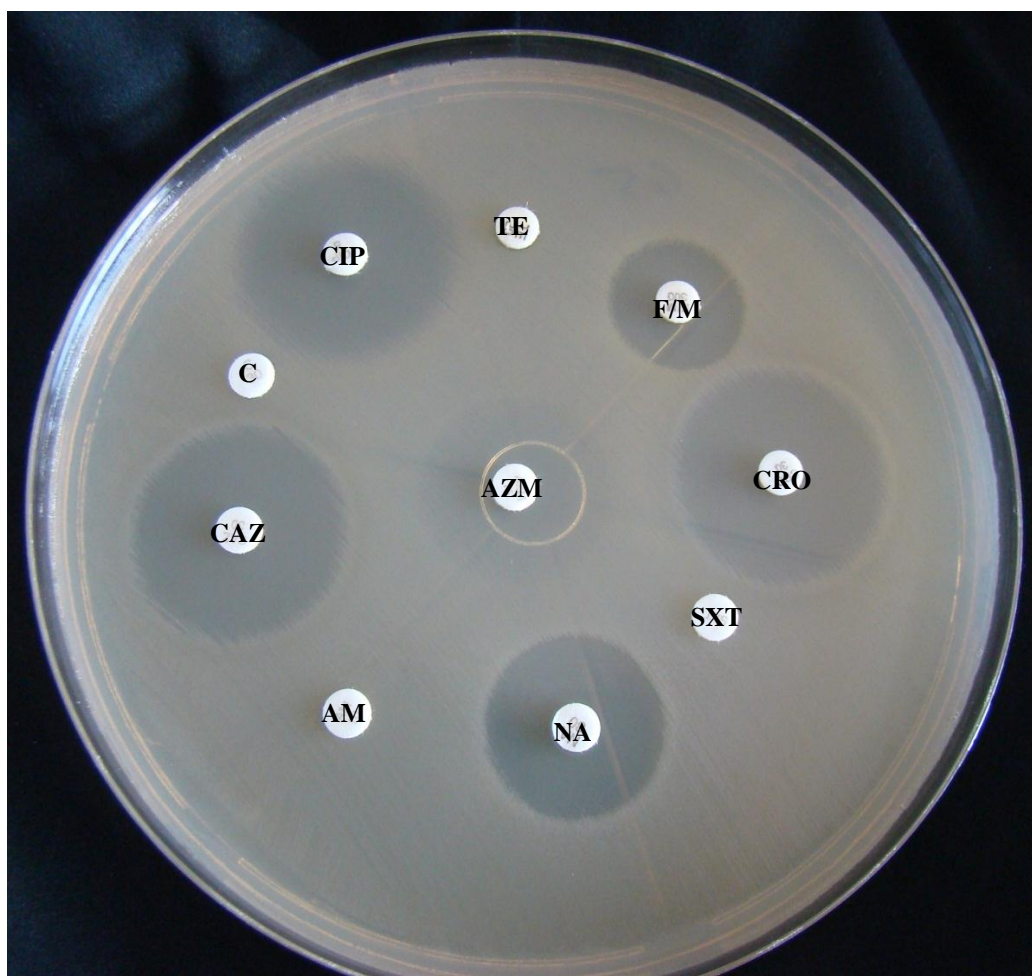


Figura 7. Difusión con disco realizada en muestras de *Shigella* spp. Antibiograma con discos de sensibilidad de antibióticos recomendados para el tratamiento de *Shigella* spp. **TE.** Tetraciclina; **F/M.** Nitrofurantoina; **CRO.** Ceftriaxona; **SXT.** Trimetoprim/sulfametoxazol; **NA.** Ácido nalidíxico; **AM.** Ampicilina; **CAZ.** Ceftazidima; **C.** Cloranfenicol; **CIP.** Ciprofloxacina; **AZM.** Azitromicina.

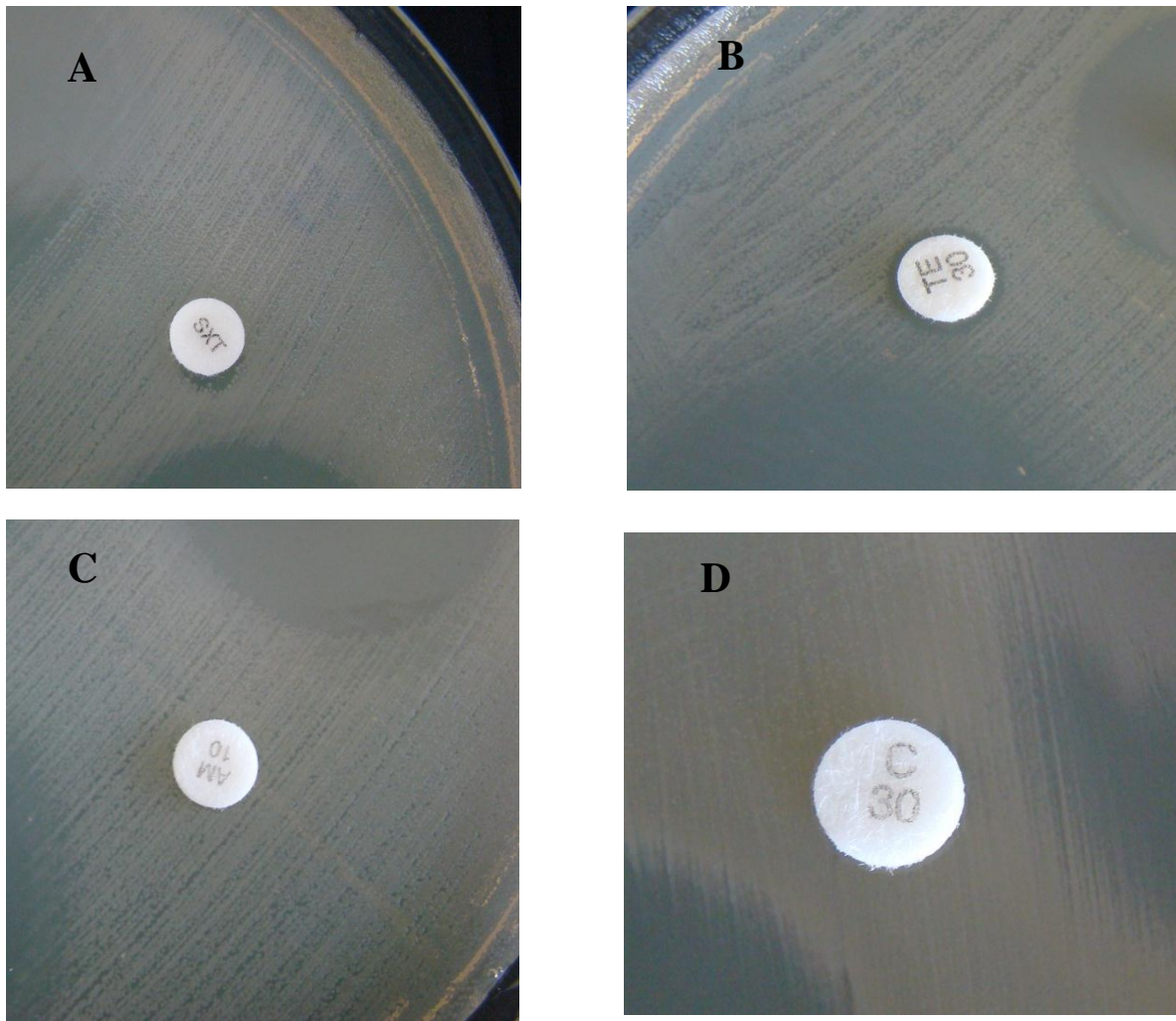


Figura 8. Resistencia a antibióticos en *Shigella* spp. **A.** Resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) **B.** Resistencia a tetraciclina (TE) **C.** Resistencia a ampicilina (AM) **D.** Resistencia a cloranfenicol (C).

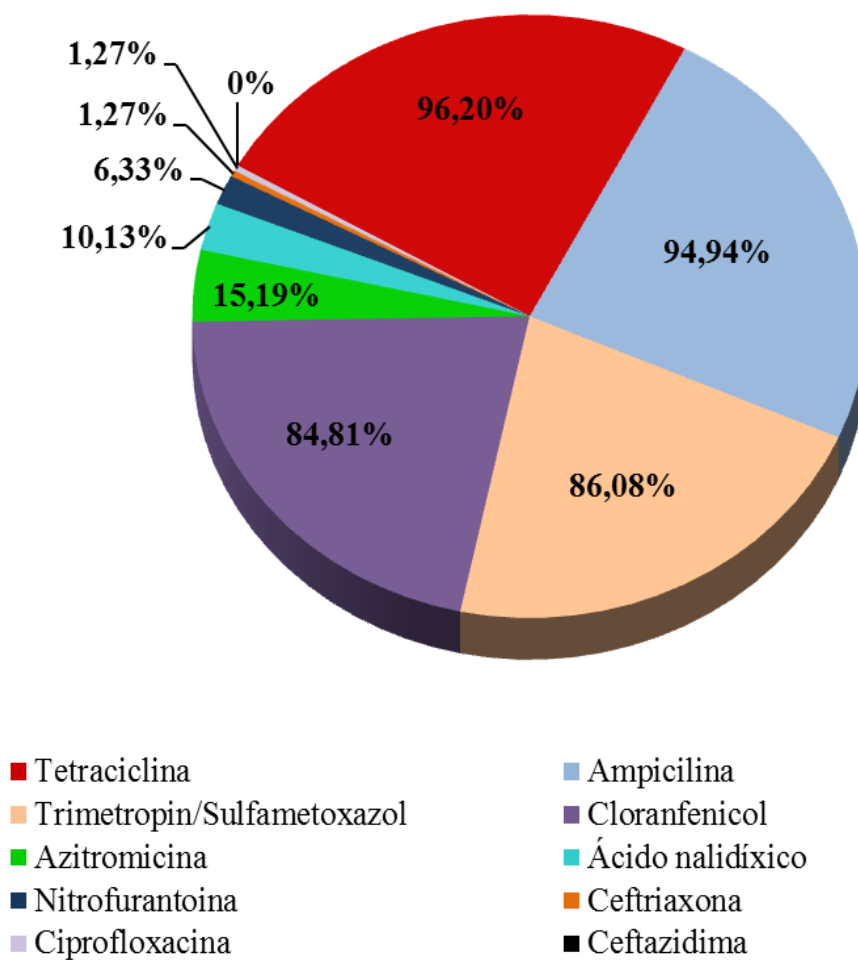


Figura 9. Porcentaje de resistencia a antibióticos dentro de la población de *Shigella* spp. N=79

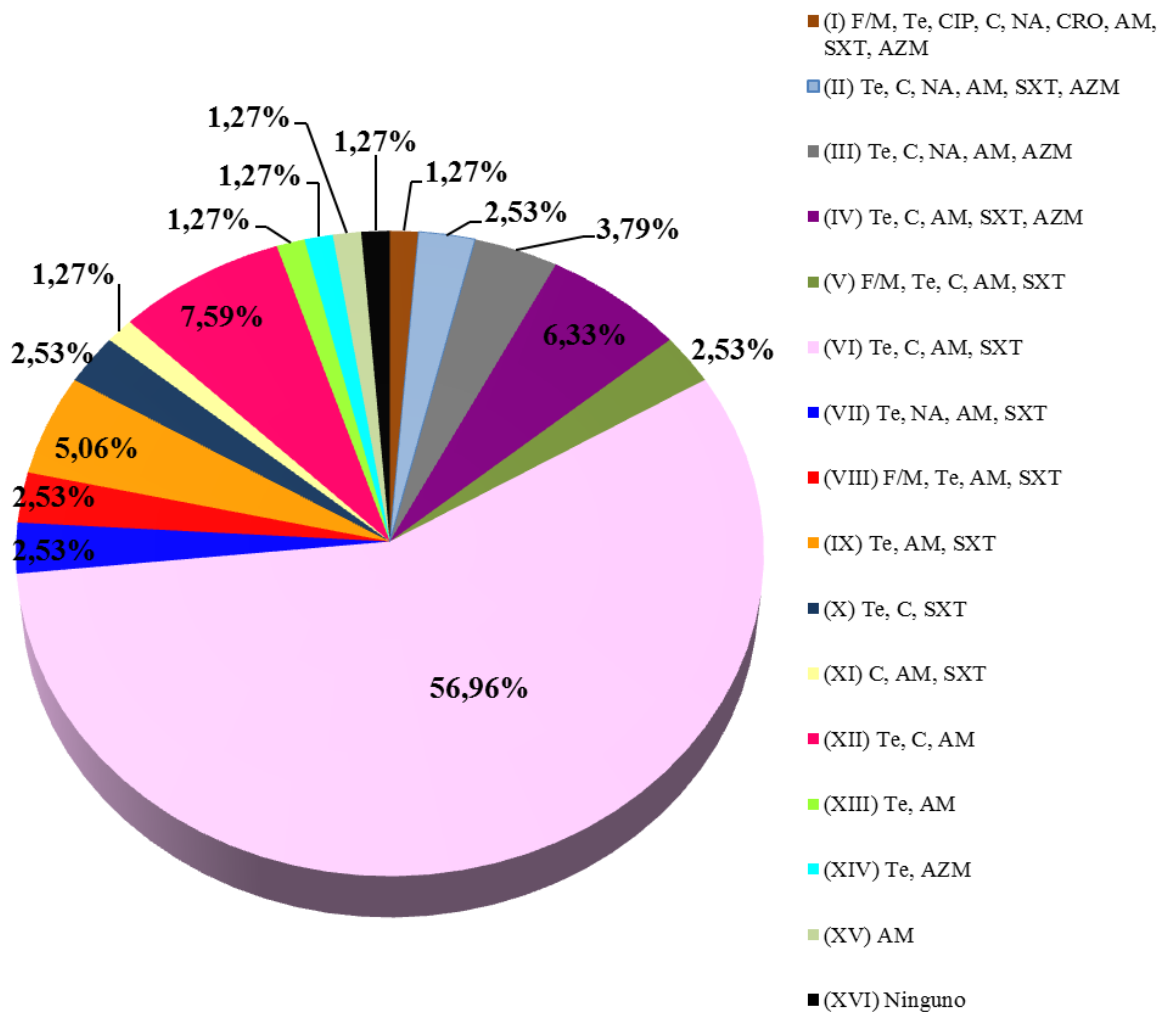


Figura 10. Porcentaje de patrones de resistencia antimicrobiana presentes dentro de la población de *Shigella* spp. N=79

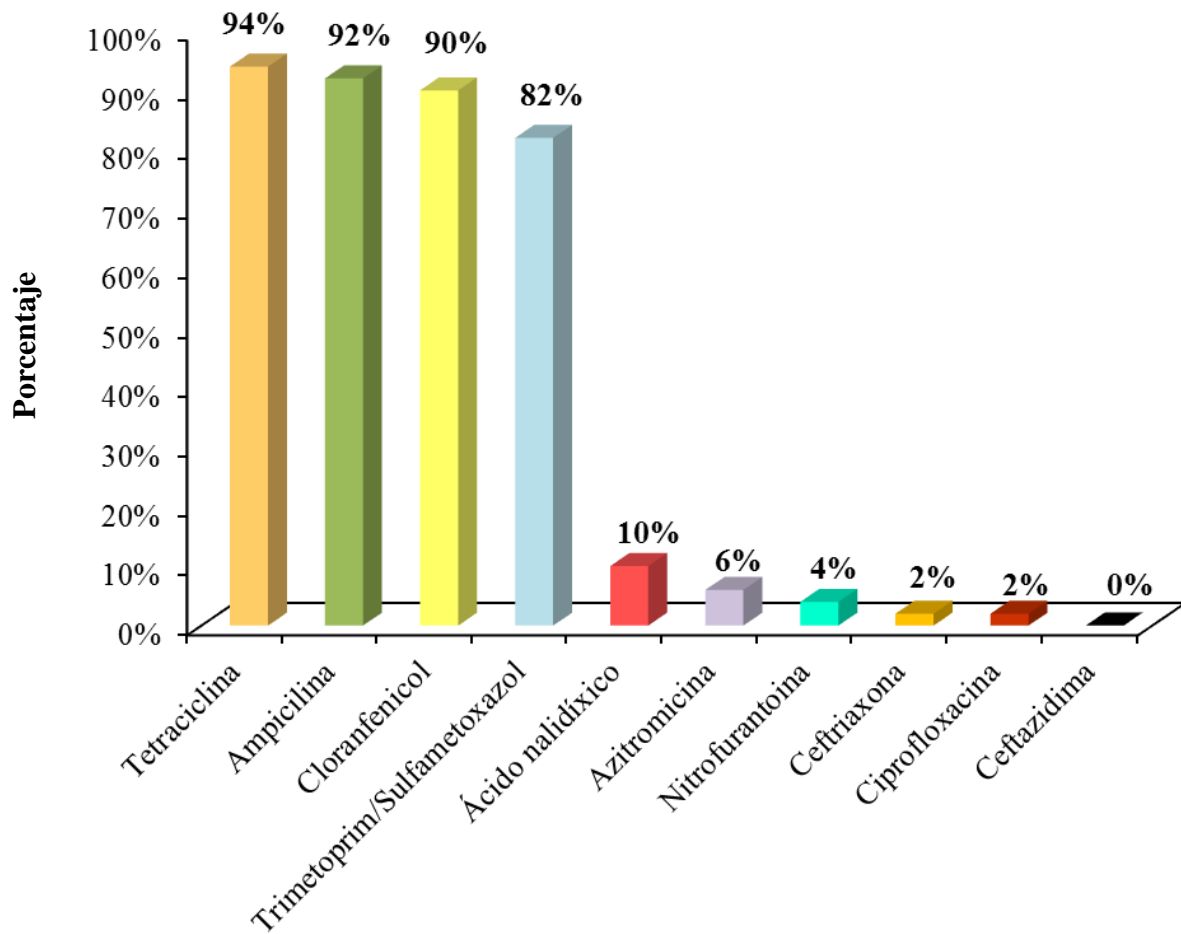


Figura 11. Porcentaje de resistencia a antibióticos dentro de la población de *Shigella flexneri*. N=50

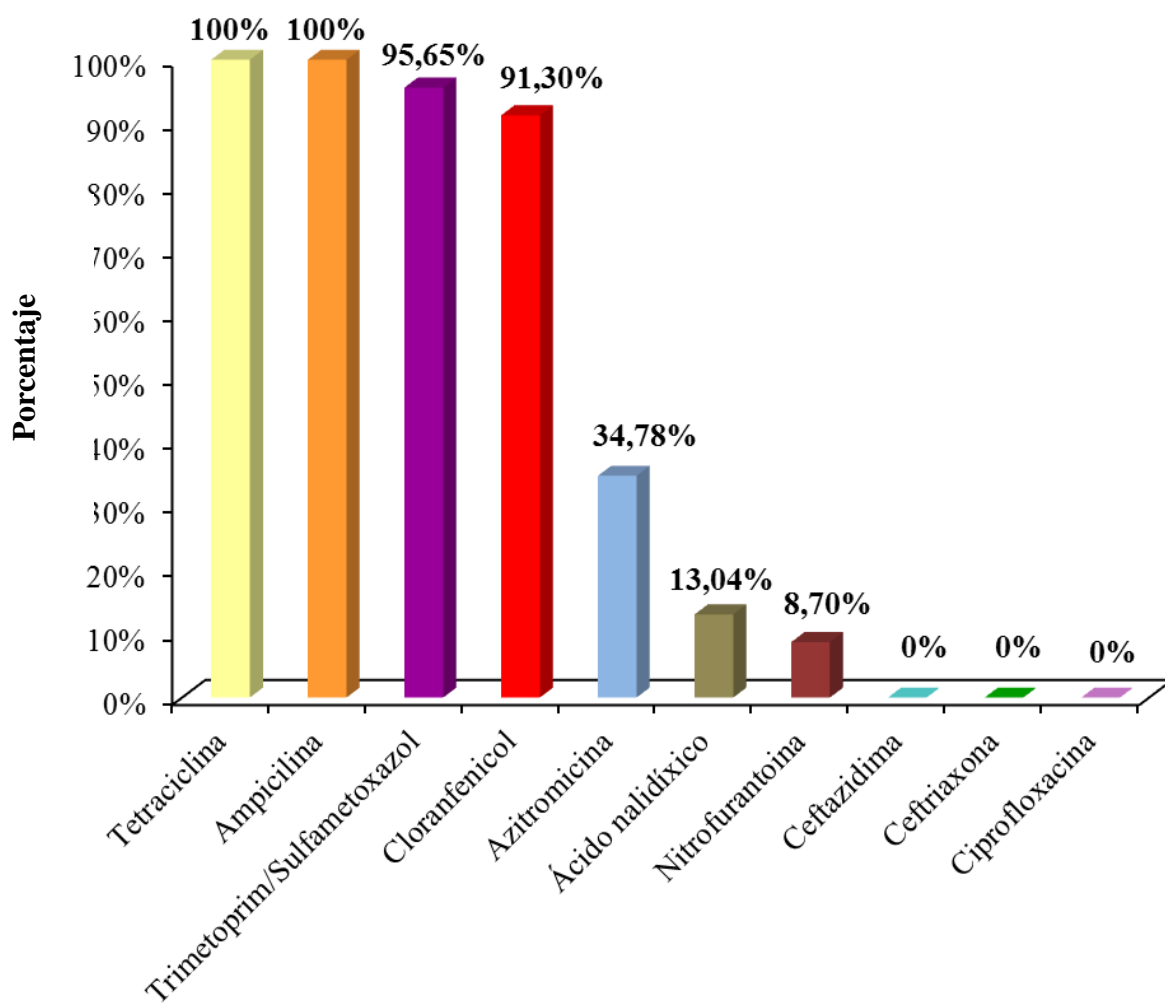


Figura 12. Porcentaje de resistencia a antibióticos dentro de la población de *Shigella sonnei*. N=23

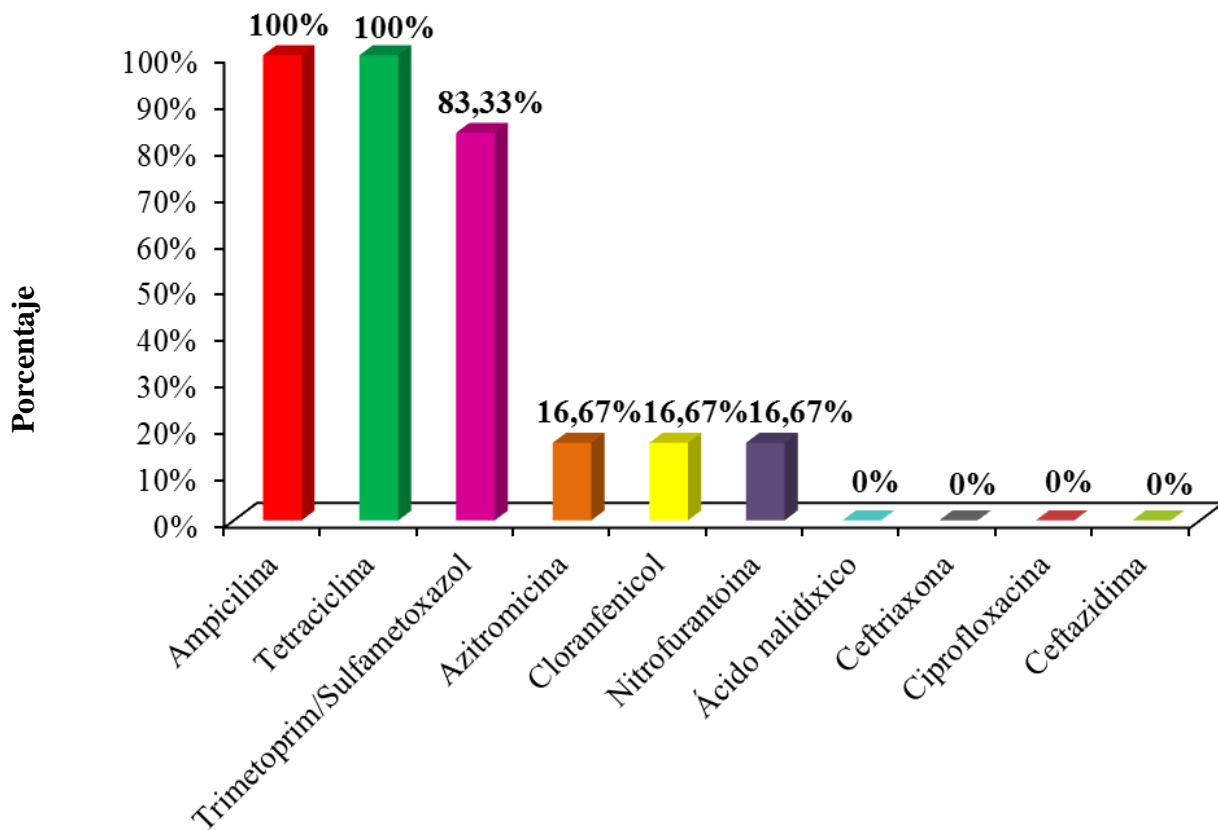


Figura 13. Porcentaje de resistencia a antibióticos dentro de la población de *Shigella boydii*. N=6

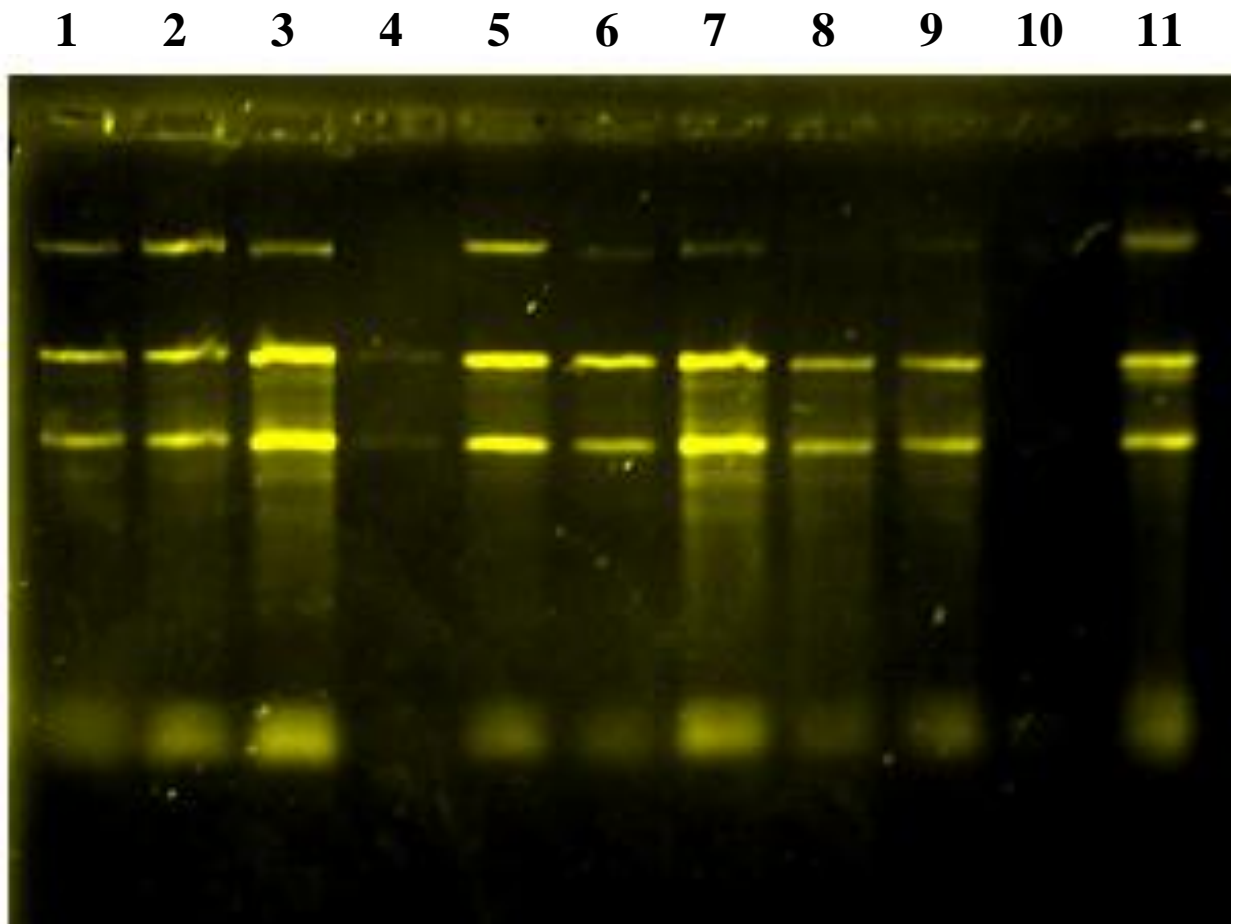


Figura 14. Gel representativo de la extracción de ADN de los aislados de *Shigella* spp. Canaletas 1-9, extracción positiva de ADN de los aislados de *Shigella* spp.; canaleta 10, control negativo de extracción, agua de grado molecular; y canaleta 11, control positivo de extracción cepa ATCC 12022 *Shigella flexneri* (2b).

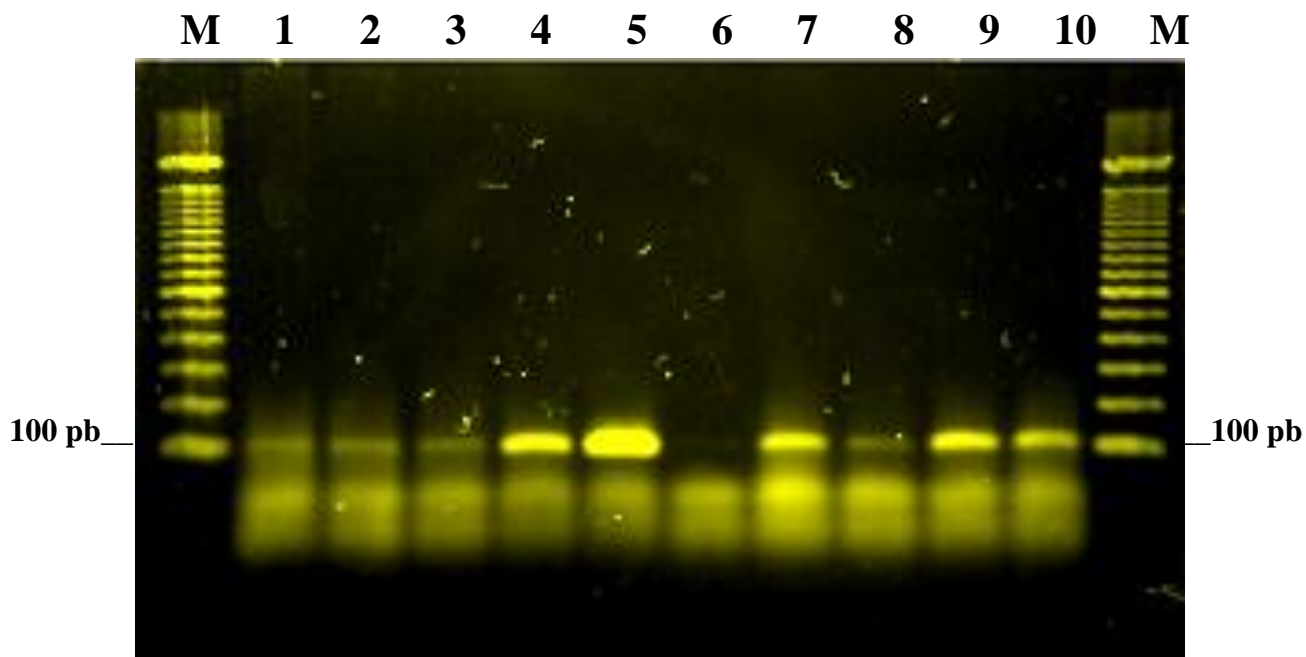


Figura 15. Representación fotográfica de la amplificación del gen 16S ARNr de *Shigella* spp. en gel de agarosa. M, Marcador de peso molecular 100pb; Pocillo 6, control negativo agua de grado molecular; Pocillo 7, control positivo cepa CB-QCA 3337 *Shigella flexneri*. Pocillos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 y 10, muestras de aislados de *Shigella* spp. positivos para la amplificación del gen 16S ARNr.

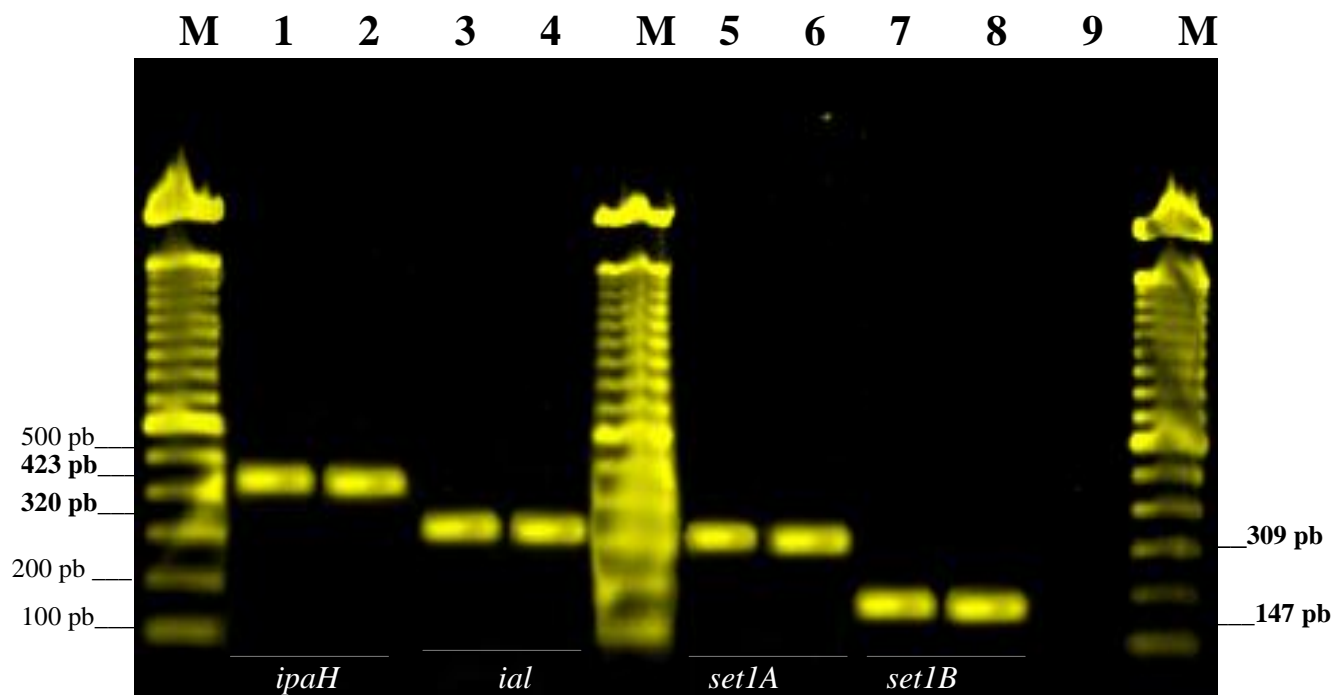


Figura 16. Representación fotográfica en gel de agarosa de la amplificación de los genes *ipaH*, *ial*, *set1A* y *set1B* en *Shigella* spp. M, marcador de peso molecular (100pb); Pocillo 1, control positivo gen *ipaH* cepa CB-QCA 3349 *Shigella flexneri*; Pocillo 2, muestra positiva de *Shigella* spp. para el gen *ipaH*; Pocillo 3, control positivo gen *ial* cepa CB-QCA 3349 *Shigella flexneri*; Pocillo 4, muestra positiva de *Shigella* spp. para el gen *ial*; Pocillo 5, control positivo gen *set1A* cepa CB-QCA 3349 *Shigella flexneri*; Pocillo 6, muestra positiva de *Shigella* spp. para el gen *set1A*; Pocillo 7, control positivo gen *set1B* cepa CB-QCA 3349 *Shigella flexneri*; pocillo 8, muestra positiva de *Shigella* spp. para el gen *set1B*; Pocillo 9, control negativo, agua de grado molecular.

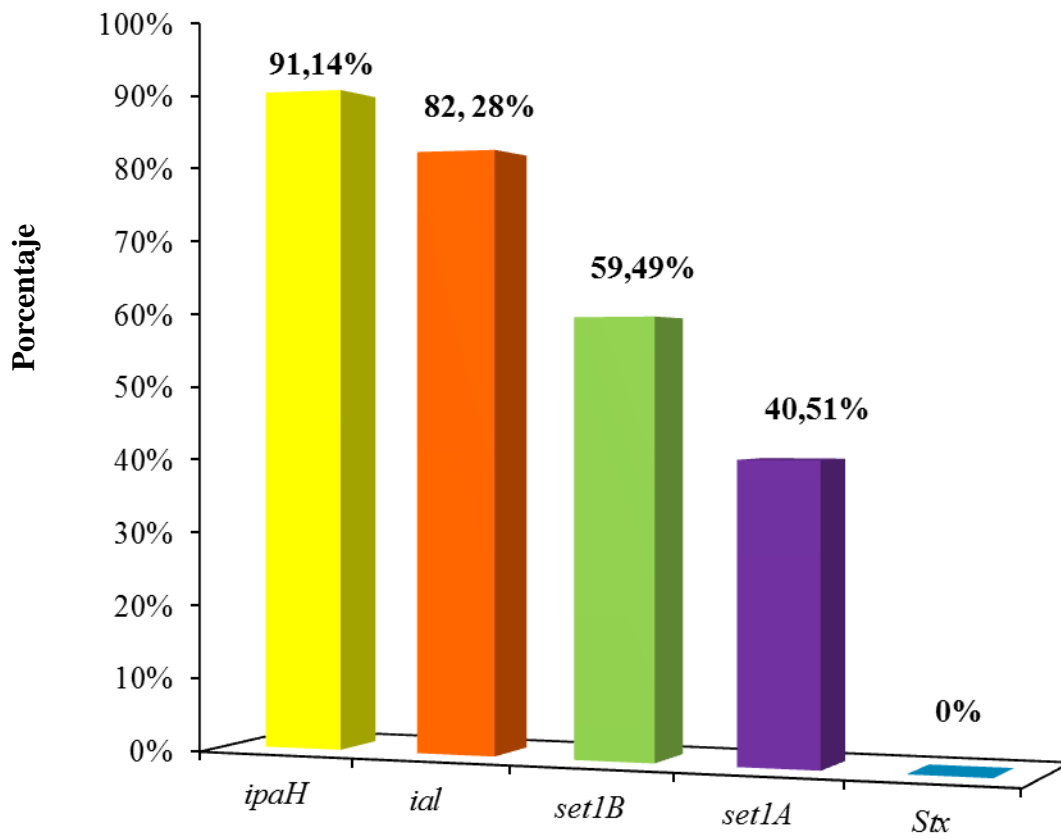


Figura 17. Porcentaje de presencia de los genes *set1A*, *set1B*, *ial*, *ipaH* y *Stx* en la población total de aislados de *Shigella* spp. N=79

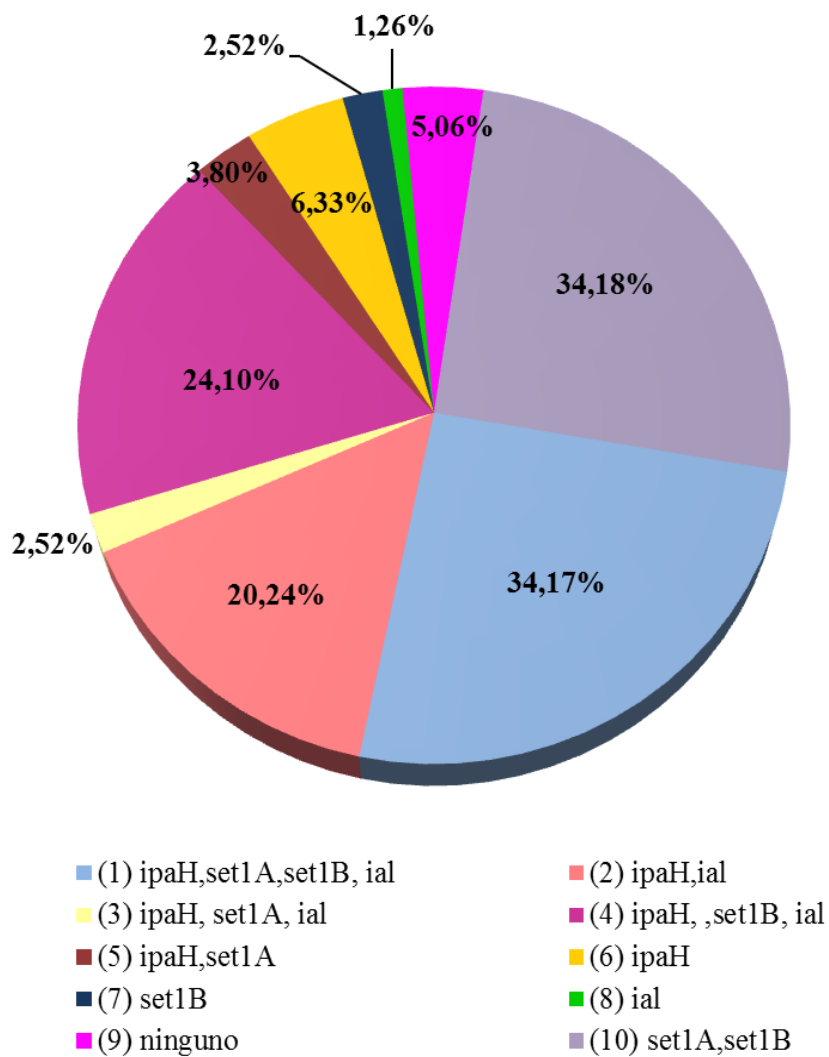


Figura 18. Porcentaje de los patrones de virulencia presentes dentro de la población de aislados de *Shigella* spp. N= 79

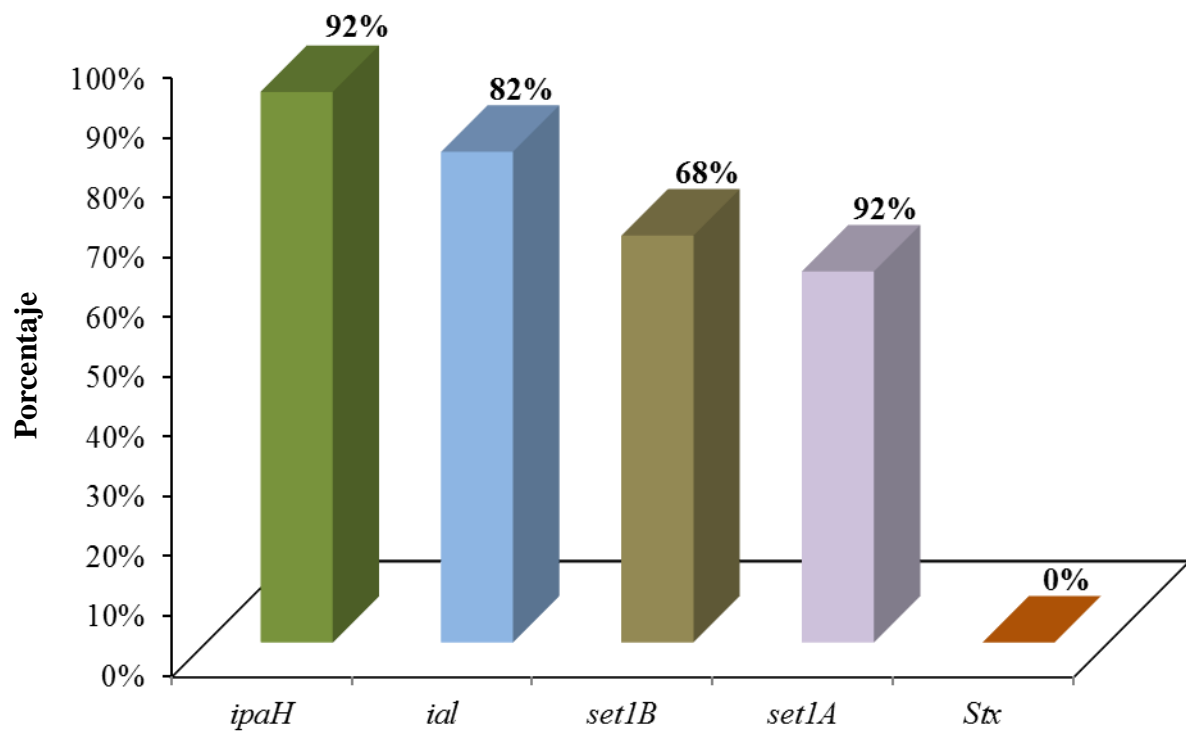


Figura 19. Porcentaje de presencia de los genes *set1A*, *set1B*, *ial*, *ipaH* y *Stx* en la población de aislados de *Shigella flexneri*. N=50

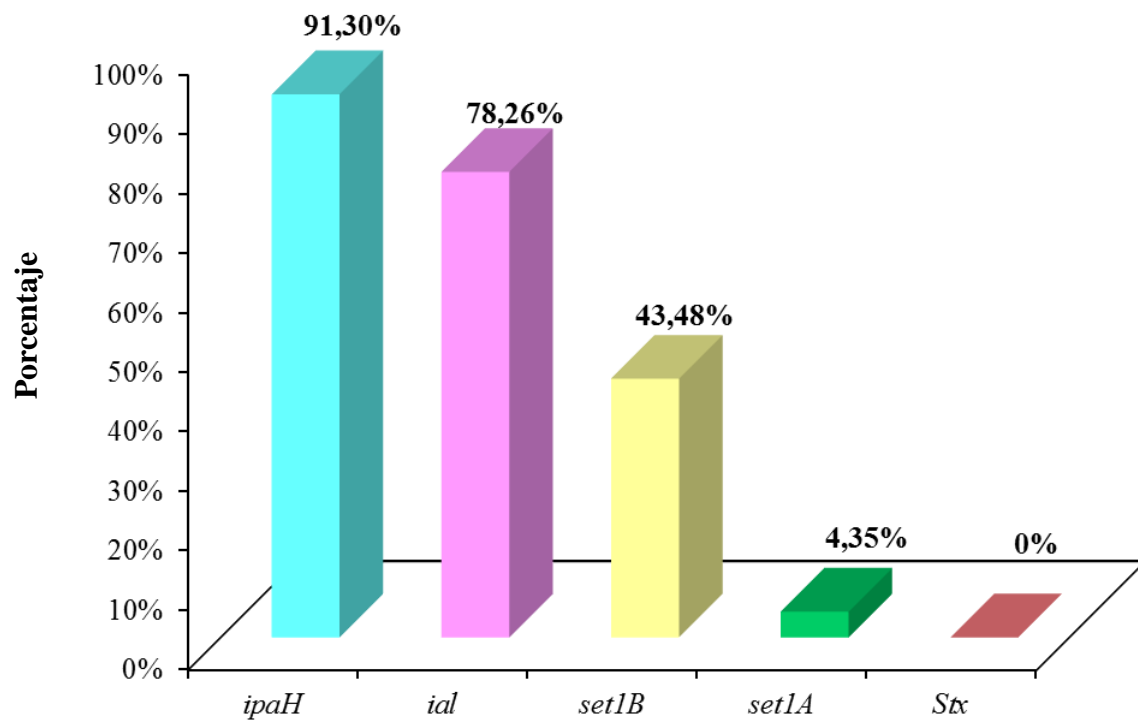


Figura 20. Porcentaje de presencia de los genes *set1A*, *set1B*, *ial*, *ipaH* y *Stx* en la población de aislados de *Shigella sonnei*. N=23

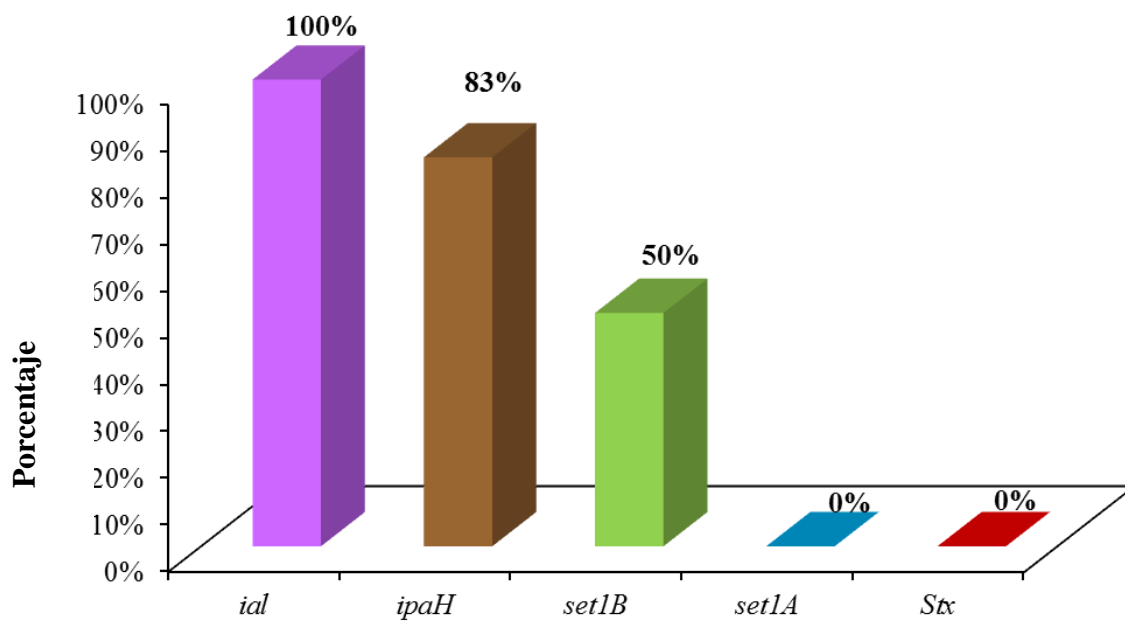


Figura 21. Porcentaje de presencia de los genes *set1A*, *set1B*, *ial*, *ipaH* y *Stx* en la población de aislados de *Shigella boydii*. N=6

11 TABLAS

Tabla 1 Datos de origen de los aislados de *Shigella* spp. analizados en este estudio

Código de congelación PUCE	Código Hospitalario	Fecha de aislamiento	Origen de la muestra	Sexo del paciente	Edad del paciente	Lugar de aislamiento
CB-QCA 3337	6 Sh fx	10/06/2005	Heces	F	38	Z&Z
CB-QCA 3338	10 Sh fx	30/05/2005	Heces	F	8	Z&Z
CB-QCA 3339	12 Sh bo	27/06/2005	Heces	F	53	Z&Z
CB-QCA 3340	15 Sh	ND	ND	ND	ND	Z&Z
CB-QCA 3341	22 Sh	01/08/2005	ND	ND	ND	Z&Z
CB-QCA 3342	25 Sh	06/08/2005	Heces	M	4	Z&Z
CB-QCA 3343	30 Sh fx	00/09/2005	Heces	F	8	Z&Z
CB-QCA 3344	36 Sh fx	21/09/2005	Heces	M	4	Z&Z
CB-QCA 3345	41 Sh fx	05/10/2005	Sec. Vaginal	F	6	Z&Z
CB-QCA 3346	46 Sh bo	28/10/2005	Heces	F	67	Z&Z
CB-QCA 3347	47 Sh so	28/10/2005	Heces	F	27	Z&Z
CB-QCA 3348	50 Sh	01/12/2005	Sec. Vaginal	F	6	Z&Z
CB-QCA 3349	67 Sh fx	00/08/2005	ND	ND	ND	Z&Z
CB-QCA 3350	78 Sh	14/02/2006	Heces	F	ND	Z&Z
CB-QCA 3351	80 Sh fx	15/02/2006	Heces	M	6	Z&Z
CB-QCA 3352	85 Sh fx	20/02/2006	Sec. Vaginal	F	6	Z&Z
CB-QCA 3353	94 Sh	11/03/2006	Sec. Vaginal	F	7	Z&Z
CB-QCA 3354	114 Sh fx	18/04/2006	Sec. Vaginal	F	5	Z&Z
CB-QCA 3355	115 Sh so	22/04/2006	Heces	M	20	Z&Z
CB-QCA 3356	116 Sh so	25/04/2006	Sec. Vaginal	F	4	Z&Z
CB-QCA 3357	122 Sh so	06/05/2006	Heces	M	2	Z&Z
CB-QCA 3358	135 Sh	08/06/2006	Heces	F	7	Z&Z
CB-QCA 3359	143 Sh	24/06/2006	Heces	F	18	Z&Z
CB-QCA 3360	147 Sh fx	26/06/2006	Sec. Vaginal	F	8	Z&Z
CB-QCA 3361	156 Sh fx	10/08/2006	Heces	F	2	Z&Z
CB-QCA 3362	158 Sh	06/08/2006	Heces	M	56	Z&Z
CB-QCA 3363	159 Sh so	10/08/2006	Heces	M	75	Z&Z
CB-QCA 3364	170 Sh bo	20/08/2006	Heces	M	2	Z&Z
CB-QCA 3365	179 Sh	27/12/2006	Sec. Vaginal	F	6	Z&Z
CB-QCA 3366	187 Sh so	12/09/2006	Heces	F	14	Z&Z
CB-QCA 3367	200 Sh fx	06/10/2006	Heces	F	6	Z&Z
CB-QCA 3368	208 Sh	31/10/2006	Heces	M	69	Z&Z
CB-QCA 3369	212 Sh	01/11/2006	ND	M	4	Z&Z
CB-QCA 3370	213 Sh	01/11/2006	Sec. Vaginal	F	9	Z&Z

Tabla 1 Datos de origen de los aislados de *Shigella* spp. analizados en este estudio (Continuación...)

Código de congelación PUCE	Código Hospitalario	Fecha de aislamiento	Origen de la muestra	Sexo del paciente	Edad del paciente	Lugar de aislamiento
CB-QCA 3371	226 Sh fx	28/11/2006	Heces	M	1	Z&Z
CB-QCA 3372	239 Sh	01/01/2007	ND	ND	ND	Z&Z
CB-QCA 3373	248 Sh so	20/01/2007	Heces	M	6	Z&Z
CB-QCA 3374	250 Sh so	17/01/2007	Heces	F	67	Z&Z
CB-QCA 3375	252 Sh fx	19/01/2007	Heces	M	1	Z&Z
CB-QCA 3376	259 Sh	26/01/2007	ND	F	6	Z&Z
CB-QCA 3377	266 Sh	22/02/2007	Sec. Vaginal	F	6	Z&Z
CB-QCA 3378	272 Sh	12/02/2007	Heces	M	6	Z&Z
CB-QCA 3379	303 Sh	23/08/2007	Sec. Vaginal	F	6	Z&Z
CB-QCA 3380	312 Sh	00/11/2007	Heces	M	5	Z&Z
CB-QCA 3381	336 Sh	27/12/2007	Sec. Vaginal	F	8	Z&Z
CB-QCA 3382	337 Sh	07/01/2008	Sec. Vaginal	F	3	Z&Z
CB-QCA 3383	338 Sh	07/01/2008	Sec. Vaginal	F	2	Z&Z
CB-QCA 3384	339 Sh	07/01/2008	Sec. Vaginal	F	2	Z&Z
CB-QCA 3385	357 Sh fx	12/02/2008	Heces	F	6	Z&Z
CB-QCA 3386	396 Sh fx	03/04/2008	Sec. Vaginal	F	4	Z&Z
CB-QCA 3387	397 Sh so	04/04/2008	Heces	M	8	Z&Z
CB-QCA 3388	401 Sh	ND	ND	ND	ND	Z&Z
CB-QCA 3389	412 Sh fx	05/06/2008	Sec. Vaginal	F	5	Z&Z
CB-QCA 3390	463 Sh	ND	ND	ND	ND	Z&Z
CB-QCA 3391	470 Sh	ND	ND	ND	ND	Z&Z
CB-QCA 3392	471 Sh	ND	ND	ND	ND	Z&Z
CB-QCA 3393	472 Sh	ND	ND	ND	ND	Z&Z
CB-QCA 3394	ot-3	ND	ND	ND	ND	HVZ
CB-QCA 3395	ot-11	16/06/2009	Heces	F	9	HVZ
CB-QCA 3396	ot-12	ND	ND	ND	ND	HVZ
CB-QCA 3397	ot-13	24/05/2009	Heces	M	7	HVZ
CB-QCA 3398	ot-14	21/05/2009	Heces	F	2	HVZ
CB-QCA 3399	ot-15	02/07/2009	Heces	F	6	HVZ
CB-QCA 3400	ot-18	10/07/2009	Heces	M	28	HVZ
CB-QCA 3401	ot-19	27/07/2009	Heces	M	20	HVZ
CB-QCA 3402	ot-20	31/07/2009	Heces	F	5	HVZ
CB-QCA 3403	ot-21	31/07/2009	Heces	F	6	HVZ
CB-QCA 3404	ot-22	31/07/2009	Heces	F	3	HVZ

Tabla 1 Datos de origen de los aislados de *Shigella* spp. analizados en este estudio (Continuación)

Código de congelación PUCE	Código Hospitalario	Fecha de aislamiento	Origen de la muestra	Sexo del paciente	Edad del paciente	Lugar de aislamiento
CB-QCA 3405	ot-25	04/09/2009	Heces	F	9	HVZ
CB-QCA 3406	ot-28	ND	ND	ND	ND	HVZ
CB-QCA 3407	ot-30	09/2009	Heces	M	1	HVZ
CB-QCA 3408	ot-31	09/2009	Heces	M	3	HVZ
CB-QCA 3409	ot-39	25/09/2009	Heces	M	5	HVZ
CB-QCA 3410	ot-44	10/09/2009	ND	M	14	HVZ
CB-QCA 3411	ot-49	08/11/2009	Heces	F	8	HVZ
CB-QCA 3412	to-50	26/11/2009	Heces	M	2	HVZ
CB-QCA 3413	ot-51	26/11/2009	Heces	M	2	HVZ
CB-QCA 3414	ot-56	22/12/2009	Heces	F	4	HVZ
CB-QCA 3415	ot-63	02/12/2010	Heces	M	43	HVZ
CB-QCA 3416	ot-64	07/02/2010	Heces	F	1	HVZ
CB-QCA 3417	ot-65	08/02/2010	Heces	M	73	HVZ
CB-QCA 3418	ot- 75	27/04/2010	Sec. Vaginal	F	2	HVZ

Sec. Vaginal, Secreción vaginal; ND, No determinado; Z&Z, Zurita & Zurita Laboratorios; HVZ, Hospital Vozandes; Sh, *Shigella*, Sh fx; *Shigella flexneri*; Sh so; *Shigella sonnei*; Sh bo; *Shigella boydii*.

Tabla 2 **Iniciadores utilizados para la confirmación de la integridad del ADN para su uso en reacciones de PCR**

Iniciador	Secuencia de iniciadores (5' a 3')	Tamaño de Amplicón (pb)	Referencia
16S rRNA Forward	GAGTACGACCGCAAGGTTGA	100	Malhotra-Kumar <i>et al.</i> (2005)
16S rRNA Reverse	CTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG		

Tabla 3 **Iniciadores utilizados para la identificación de varios genes asociados a mecanismos de virulencia en *Shigella* spp.**

Iniciador	Gen de virulencia	Secuencia de nucleótido (5' a 3')	Tamaño de Amplicón	Referencia
ShET1AF ShET1AR	<i>set1A</i>	TCACGCTACCATCAAAGA TATCCCCCTTTGGTGGTA	309	Fusano <i>et al.</i> (1995)
ShET1BF ShET1BR	<i>set1B</i>	GTGAACCTGCTGCCGATATC ATTTGTGGATAAAAATGACG	147	Fusano <i>et al.</i> (1995)
ialR ialR	<i>ial</i>	CTGGATGGTATGGTGAGG GGAGGCCAACAATTATTCC	320	Frankel <i>et al.</i> (1989)
Shig1 Shig2	<i>ipaH</i>	TGGAAAACTCAGTGCCTCT CCAGTCCGTAAATTCATTCT	423	Lüscher y Altwegg (1994)
StxF StxFR	<i>Stx</i>	CAGTTAATGTGGTTGCGAAG CTGCTAATAGTTCTGCGCATC	895	Frankel <i>et al.</i> (1989)

Tabla 4 Identificación de aislados por serotipificación siguiendo el método de aglutinación en lámina

Código de congelación PUCE	Código hospitalario	Origen de la muestra	Especie de <i>Shigella</i> spp.
CB-QCA 3337	6 Sh fx	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3338	10 Sh fx	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3339	12 Sh bo	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3340	15 Sh	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3341	22 Sh	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3342	25 Sh	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3343	30 Sh fx	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3344	36 Sh fx	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3345	41 Sh fx	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3346	46 Sh bo	Heces	<i>E. coli</i>
CB-QCA 3347	47 Sh so	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3348	50 Sh	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3349	67 Sh fx	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3350	78 Sh	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3351	80 Sh fx	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3352	85 Sh fx	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3353	94 Sh	Sec. Vaginal	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3354	114 Sh fx	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3355	115 Sh so	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3356	116 Sh so	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3357	122 Sh so	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3358	135 Sh	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3359	143 Sh	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3360	147 Sh fx	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3361	156 Sh fx	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3362	158 Sh	Heces	<i>S. boydii</i>
CB-QCA 3363	159 Sh so	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3364	170 Sh bo	Heces	Muerta
CB-QCA 3365	179 Sh	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3366	187 Sh so	Heces	<i>S. boydii</i>
CB-QCA 3367	200 Sh fx	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3368	208 Sh	Heces	<i>S. boydii</i>
CB-QCA 3369	212 Sh	ND	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3370	213 Sh	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>

Tabla 4 Identificación de aislados por serotipificación siguiendo el método de aglutinación en lámina. (Continuación...)

Código de congelación PUCE	Código hospitalario	Origen de la muestra	Especie de <i>Shigella</i> spp.
CB-QCA 3371	226 Sh fx	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3372	239 Sh	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3373	248 Sh so	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3374	250 Sh so	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3375	252 Sh fx	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3376	259 Sh	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3377	266 Sh	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3378	272 Sh	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3379	303 Sh	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3380	312 Sh	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3381	336 Sh	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3382	337 Sh	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3383	338 Sh	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3384	339 Sh	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3385	357 Sh fx	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3386	396 Sh fx	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3387	397 Sh so	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3388	401 Sh	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3389	412 Sh fx	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3390	463 Sh	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3391	470 Sh	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3392	471 Sh	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3393	472 Sh	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3394	ot-3	ND	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3395	ot-11	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3396	ot-12	ND	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3397	ot-13	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3398	ot-14	Heces	Muerta
CB-QCA 3399	ot-15	Heces	<i>S. boydii</i>
CB-QCA 3400	ot-18	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3401	ot-19	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3402	ot-20	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3403	ot-21	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3404	ot-22	Heces	<i>S. flexneri</i>

Tabla 4 Identificación de aislados por serotipificación siguiendo el método de aglutinación en lámina. (Continuación)

Código de congelación PUCE	Código hospitalario	Origen de la muestra	Especie de <i>Shigella</i> spp.
CB-QCA 3405	ot-25	Heces	<i>S. boydii</i>
CB-QCA 3406	ot-28	ND	<i>S. boydii</i>
CB-QCA 3407	ot-30	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3408	ot-31	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3409	ot-39	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3410	ot-44	ND	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3411	ot-49	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3412	to-50	Heces	<i>S. sonnei</i>
CB-QCA 3413	ot-51	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3414	ot-56	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3415	ot-63	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3416	ot-64	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3417	ot-65	Heces	<i>S. flexneri</i>
CB-QCA 3418	ot- 75	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>

Sec. Vaginal, Secreción vaginal; ND, No determinado; Sh, *Shigella*, Sh fx; *Shigella flexneri*; Sh so; *Shigella sonnei*; Sh bo; *Shigella boydii*.

Tabla 5 Patrones de resistencia antimicrobiana mostrados por los aislados de *Shigella* spp.

Fenotipos de resistencia	Patrón	Especies			Total de cepas	%
		<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. boydii</i>		
I	F/M, Te, CIP, C, NA, CRO, AM, SXT, AZM	1			1	1,27
II	Te, C, NA, AM, SXT, AZM		2		2	2,53
III	Te, C, NA, AM, AZM	3			3	3,79
IV	Te, C, AM, SXT, AZM		4	1	5	6,33
V	F/M, Te, C, AM, SXT	1	1		2	2,53
VI	Te, C, AM, SXT	32	13		45	56,96
VII	Te, NA, AM, SXT	1	1		2	2,53
VIII	F/M, Te, AM, SXT	1		1	2	2,53
IX	Te, AM, SXT	1		3	4	5,06
X	Te, C, SXT	2			2	2,53
XI	C, AM, SXT	1			1	1,27

Tabla 5 Patrones de resistencia antimicrobiana mostrados por los aislados de *Shigella* spp. (Continuación)

Fenotipos de resistencia	Patrón	Especies			Total de cepas	%
		<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. boydii</i>		
XII	Te, C, AM	5	1		6	7,59
XIII	Te, AM			1	1	1,27
XIV	Te, AZM	1			1	1,27
XV	AM	1			1	1,27
XVI	Ninguno	1			1	1,27

F/M, Nitrofurantoina; Te, Tetraciclina; CIP, Ciprofloxacina; CAZ, Ceftazidima; CRO, Ceftriaxona; C, Cloranfenicol; NA, Ácido nalidíxico; AM, Ampicilina; SXT, Trimetoprim/Sulfametoxazol; AZM, Azitromicina.

Tabla 6 Sensibilidad a antimicrobianos y fenotipos de resistencia en *Shigella* spp.

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	Nitrofurantoina	Tetraciclina	Ciprofloxacina	Ceftazidima	Cloranfenicol	Ácido nalidíxico	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim/Sulfametoxazol	Azitromicina	Fenotipos de resistencia
CB-QCA 3337	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	XVI
CB-QCA 3338	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	IX
CB-QCA 3339	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VII
CB-QCA 3340	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3341	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3342	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3343	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3344	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3345	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	XI
CB-QCA 3347	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3348	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3349	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	X
CB-QCA 3350	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	XV
CB-QCA 3351	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3352	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI

Tabla 6 Sensibilidad a antimicrobianos y fenotipos de resistencia en *Shigella* spp. (Continuación...)

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	Nitrofurantoina	Tetraciclina	Ciprofloxacina	Ceftazidima	Cloranfenicol	Ácido nalidíxico	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim/Sulfametoxazol	Azitromicina	Fenotipos de resistencia
CB-QCA 3353	Sec. Vaginal	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3354	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3355	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3356	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3357	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3358	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3359	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3360	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3361	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3362	Heces	<i>S. boydii</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	IX
CB-QCA 3363	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	XIV
CB-QCA 3365	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3366	Heces	<i>S. boydii</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	IV
CB-QCA 3367	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3368	Heces	<i>S. boydii</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	IX

Tabla 6 Sensibilidad a antimicrobianos y fenotipos de resistencia en *Shigella* spp. (Continuación...)

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	Nitrofurantoina	Tetraciclina	Ciprofloxacina	Ceftazidima	Cloranfenicol	Ácido nalidíxico	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim/Sulfametoxazol	Azitromicina	Fenotipos de resistencia
CB-QCA 3369	ND	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	VI
CB-QCA 3370	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3371	Heces	<i>S. sonnei</i>	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	V
CB-QCA 3372	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3373	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	IV
CB-QCA 3374	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3375	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	XII
CB-QCA 3376	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3377	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3378	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3379	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3380	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3381	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3382	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	XII
CB-QCA 3383	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	XI

Tabla 6 Sensibilidad a antimicrobianos y fenotipos de resistencia en *Shigella* spp. (Continuación...)

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	Nitrofurantoina	Tetraciclina	Ciprofloxacina	Ceftazidima	Cloranfenicol	Ácido nalidíxico	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim/Sulfametoxazol	Azitromicina	Fenotipos de resistencia
CB-QCA 3384	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3385	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3386	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3387	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	R	IV
CB-QCA 3388	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3389	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3390	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	XII
CB-QCA 3391	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3392	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3393	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	XII
CB-QCA 3394	ND	<i>S. sonnei</i>	R	R	S	S	S	S	S	R	I	S	VIII
CB-QCA 3395	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3396	ND	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	R	S	I	S	I	III
CB-QCA 3397	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R	II
CB-QCA 3399	Heces	<i>S. boydii</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	XIII

Tabla 6 Sensibilidad a antimicrobianos y fenotipos de resistencia en *Shigella* spp. (Continuación...)

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	Nitrofurantoina	Tetraciclina	Ciprofloxacina	Ceftazidima	Cloranfenicol	Ácido nalidíxico	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim/Sulfametoxazol	Azitromicina	Fenotipos de resistencia
CB-QCA 3400	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3401	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	R	S	R	R	I	II
CB-QCA 3402	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	VII
CB-QCA 3403	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	III
CB-QCA 3404	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3405	Heces	<i>S. boydii</i>	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	VIII
CB-QCA 3406	ND	<i>S. boydii</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	IX
CB-QCA 3407	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	VII
CB-QCA 3408	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3409	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3410	ND	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	I	IV
CB-QCA 3411	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	XII
CB-QCA 3412	Heces	<i>S. sonnei</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	I	IV
CB-QCA 3413	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	VI
CB-QCA 3414	Heces	<i>S. flexneri</i>	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	V

Tabla 6 Sensibilidad a antimicrobianos y fenotipos de resistencia en *Shigella* spp (Continuación)

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	Nitrofurantoina	Tetraciclina	Ciprofloxacina	Ceftazidima	Cloranfenicol	Ácido nalidíxico	Ceftriaxona	Ampicilina	Trimetoprim/Sulfametoxazol	Azitromicina	Fenotipos de resistencia
CB-QCA 3415	Heces	<i>S. flexneri</i>	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I
CB-QCA 3416	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	X
CB-QCA 3417	Heces	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	S	S	I	R	S	VI
CB-QCA 3418	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	S	R	S	S	R	I	S	R	R	S	III
ATCC 12022		<i>S. flexneri</i> (2b)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	XVI
ATCC 9207		<i>S. boydii</i> (1)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	XVI
ATCC 25931		<i>S. sonnei</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	XVI

S. flexneri, *Shigella flexneri*; *S. sonnei*, *Shigella sonnei*; *S. boydii*, *Shigella boydii*; Sec. Vaginal, Secreción vaginal; ND, No determinado; R, resistente; S, sensible; I, intermedio

Tabla 7 Patrones de virulencia mostrados por los aislados de *Shigella* spp.

Genotipos de virulencia	Patrón	Especies			Total de cepas	%
		<i>S. flexneri</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. boydii</i>		
1	<i>ipaH, set1A, set1B, ial</i>	27			27	34,17
2	<i>ipaH, ial</i>	6	8	2	16	20,24
3	<i>ipaH, set1A, ial</i>	2			2	2,52
4	<i>ipaH, ,set1B, ial</i>	7	9	3	19	24,10
5	<i>ipaH, set1A</i>	2	1		3	3,80
6	<i>IpaH</i>	3	2		5	6,33
7	<i>set1B</i>	1	1		2	2,52
8	<i>Ial</i>			1	1	1,26
9	ninguno	3	1		4	5,06
10	<i>set1A, set1B</i>	27			27	34,18

ipaH, invasión plásmid antígeno H; *ial*, invasión-asociado locus; *set1A*, enterotoxina 1-subunidad A; *set1B*, enterotoxina 1-subunidad B.

Tabla 8 Presencia y ausencia de los genes *ipaH*, *set1A*, *set1B*, *ial* y *Stx* y genotipos de virulencia en aislados de *Shigella* spp.

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	GENES					Genotipos de virulencia
			<i>ipaH</i>	<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>ial</i>	<i>Stx</i>	
CB-QCA 3337	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	A	A	A	A	6
CB-QCA 3338	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3339	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3340	ND	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3341	ND	<i>S. flexneri</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3342	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3343	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	A	A	A	5
CB-QCA 3344	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3345	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3347	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3348	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3349	ND	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3350	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3351	Heces	<i>S. flexneri</i>	A	A	A	A	A	9
CB-QCA 3352	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	A	A	A	A	6
CB-QCA 3353	Sec. Vaginal	<i>S. sonnei</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3354	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10

Tabla 8 Presencia y ausencia de los genes *ipaH*, *set1A*, *set1B*, *ial* y *Stx* y genotipos de virulencia en aislados de *Shigella* spp.

(Continuación...)

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	GENES					Genotipos de virulencia
			<i>ipaH</i>	<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>ial</i>	<i>Stx</i>	
CB-QCA 3355	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3356	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3357	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3358	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3359	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3360	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	A	A	A	A	6
CB-QCA 3361	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	A	A	A	5
CB-QCA 3362	Heces	<i>S. boydii</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3363	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3365	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3366	Heces	<i>S. boydii</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3367	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3368	Heces	<i>S. boydii</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3369	ND	<i>S. sonnei</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3370	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10

Tabla 8 Presencia y ausencia de los genes *ipaH*, *set1A*, *set1B*, *ial* y *Stx* y genotipos de virulencia en aislados de *Shigella* spp.

(Continuación...)

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	GENES					Genotipos de virulencia
			<i>ipaH</i>	<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>ial</i>	<i>Stx</i>	
CB-QCA 3371	Heces	<i>S. sonnei</i>	A	A	A	A	A	9
CB-QCA 3372	ND	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3373	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3374	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	A	A	A	6
CB-QCA 3375	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3376	ND	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3377	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3378	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3379	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3380	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3381	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3382	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3383	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3384	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3385	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	A	A	P	A	2

Tabla 8 Presencia y ausencia de los genes *ipaH*, *set1A*, *set1B*, *ial* y *Stx* y genotipos de virulencia en aislados de *Shigella* spp.

(Continuación...)

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	GENES					Genotipos de virulencia
			<i>ipaH</i>	<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>ial</i>	<i>Stx</i>	
CB-QCA 3386	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3387	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3388	ND	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3389	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3390	ND	<i>S. flexneri</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3391	ND	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3392	ND	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3393	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3394	ND	<i>S. sonnei</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3395	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	A	A	A	6
CB-QCA 3396	ND	<i>S. flexneri</i>	A	A	A	A	A	9
CB-QCA 3397	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3399	Heces	<i>S. boydii</i>	A	A	A	P	A	8
CB-QCA 3400	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3401	Heces	<i>S. sonnei</i>	A	A	A	A	A	7

Tabla 8 Presencia y ausencia de los genes *ipaH*, *set1A*, *set1B*, *ial* y *Stx* y genotipos de virulencia en aislados de *Shigella* spp.

(Continuación...)

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	GENES					Genotipos de virulencia
			<i>ipaH</i>	<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>Ial</i>	<i>Stx</i>	
CB-QCA 3402	Heces	<i>S. flexneri</i>	A	A	A	A	A	7
CB-QCA 3403	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	A	P	A	3
CB-QCA 3404	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3405	Heces	<i>S. boydii</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3406	ND	<i>S. boydii</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3407	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3408	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3409	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	P	P	A	4
CB-QCA 3410	ND	<i>S. sonnei</i>	P	P	A	A	A	5
CB-QCA 3411	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3412	Heces	<i>S. sonnei</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3413	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	A	P	A	3
CB-QCA 3414	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10
CB-QCA 3415	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	P	P	P	A	1-10

Tabla 8 Presencia y ausencia de los genes *ipaH*, *set1A*, *set1B*, *ial* y *Stx* y genotipos de virulencia en aislados de *Shigella* spp.
(Continuación)

Código de congelación PUCE	Origen de la muestra	Identificación serológica	GENES					Genotipos de virulencia
			<i>ipaH</i>	<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>Ial</i>	<i>Stx</i>	
CB-QCA 3416	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3417	Heces	<i>S. flexneri</i>	P	A	A	P	A	2
CB-QCA 3418	Sec. Vaginal	<i>S. flexneri</i>	A	A	A	A	A	9

S. flexneri, *Shigella flexneri*; *S. sonnei*, *Shigella sonnei*; *S. boydii*, *Shigella boydii*; Sec. Vaginal, Secreción vaginal; ND, No determinado; P, presencia; A, ausencia.

12 ANEXOS

Anexo 1 Alineamiento de las secuencia obtenida para el uso como control positivo del gen 16S ARNr en *Shigella* spp.

NÚMERO DE ACCESO

GenBank: [gb|CP001383.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/CP001383.1) *Shigella flexneri* 2002017, complete genome

SECUENCIA OBTENIDA DEL PROGRAMA BLAST

```
>gb|CP001383.1|:2764828-2764926 Shigella flexneri 2002017,complete genome
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGCGTCA
ATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTACTC
```

SECUENCIA EN FORMATO FASTA OBTENIDA POR SECUENCIAMIENTO

```
>110614-17_P11_16s_M-16s-F*txt.
GAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA
GCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC
```

DESCRIPCIÓN DEL ALINEAMIENTO

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
6569		178	178	100%	2e-50	98%	

ALINEAMIENTO

```
>lcl|6569
Length=99
Score = 178 bits (96), Expect = 2e-50
Identities = 98/99 (99%), Gaps = 0/99 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1  GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC 60
          |||
Sbjct99  GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC 40

Query 61  GCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTACTC 99
          |||
Sbjct 39  CCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTACTC 1
```

Anexo 2 Alineamiento de las secuencia obtenida para el uso como control positivo del gen *ipaH* en *Shigella* spp.

NÚMERO DE ACCESO

GenBank: [gb|CP001383.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gb|CP001383.1) *Shigella flexneri* 2002017, complete genome

SECUENCIA OBTENIDA DEL PROGRAMA BLAST

```
>gb|CP001383.1|:42222-42643 Shigella flexneri 2002017, complete genome
GCGCTGACGGTCTGGTGTGTTGCCAAACACCCGTCGCGGCAAATTACTGGCGGCAAACTGGGTT
ATCGCCTTAAAGCGGCGGTGTCTAACGATGCCAGCACCGTCAGCGTACAGGACGGTAAAGCAACAG
TGAAACACATGGTTTACGGCGGTCTGGCGATTGGCGAAGAACGCATTGCCACGCCGTATGCGGTAC
TGACCATCAGCAGCGGCACGTTTCGATGCGGCTCAGCCAGACGCGTCACGCACTGGCGAAACGCACA
CCGTGGAGTGGCAGGCTCCGGCTGTGGCGATTACCCGCACGGCAACCCAGGCGCGCCAGAGCAACA
GCGTCGATCTCGACAAAGCCCGTCTGGTGGTTCAGCGTCGGTCGCGGCATTGGCAGCAAAGAGAACA
TTGCGCTGGCAGAACAGCTTTGCAAG
```

SECUENCIA EN FORMATO FASTA OBTENIDA POR SECUENCIAMIENTO

>110614-17_N09_Shig-shig12F*txt.

```
TGGAAAACTCAGTGCCTCTGCGCTGACGGTCTGGTGTGTTGCCAAACACCCGTCGCGGCAAATT
ACTGGCGGCAAACTGGGTTATCGCCTTAAAGCGGCGGTGTCTAACGATGCCAGCACCGTCAGCGT
ACAGGACGGTAAAGCAACAGTGAACACATGGTTTACGGCGGTCTGGCGATTGGCGAAGAACGCAT
TGCCACGCCGTATGCGGTACTGACCATCAGCAGCGGCACGTTTCGATGCGGCTCAGCCAGACGCGTC
ACGCACTGGCGAAACGCACACCGTGGAGTGGCAGGCTCCGGCTGTGGCGATTACCCGCACGGCAAC
CCAGGCGCGCCAGAGCAACAGCGTCGATCTCGACAAAGCCCGTCTGGTGGTTCAGCGTCGGTCGCGG
CATTGGCAGCAAAGAGAACATTGCGCTGGCAGAACAGCTTTGCAAGCCAGTCCGTAAATTCATTCT
```

DESCRIPCIÓN DEL ALINEAMIENTO

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
41393		780	780	100%	0.0	100%	

ALINEAMIENTO

>lcl|41393

Length=462

Score = 780 bits (422), Expect = 0.0
 Identities = 422/422 (100%), Gaps = 0/422 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 1 GCGCTGACGGTCTGGTGCTGTTGCCAAACACCCGTCGCGGCAAATTACTGGCGGCAAAC 60

|||||

Sbjct 21 GCGCTGACGGTCTGGTGCTGTTGCCAAACACCCGTCGCGGCAAATTACTGGCGGCAAAC 80

Query 61 TGGGTTATCGCCTTAAAGCGGCGGTGTCTAACGATGCCAGCACCGTCAGCGTACAGGACG 120

|||||

Sbjct 81 TGGGTTATCGCCTTAAAGCGGCGGTGTCTAACGATGCCAGCACCGTCAGCGTACAGGACG 140

Query121 GTAAAGCAACAGTGAAACACATGGTTTACGGCGGTCTGGCGATTGGCGAAGAACGCATTG 180

|||||

Sbjct141 GTAAAGCAACAGTGAAACACATGGTTTACGGCGGTCTGGCGATTGGCGAAGAACGCATTG 200

Query181 CCACGCCGTATGCGGTACTGACCATCAGCAGCGGCACGTTTCGATGCGGCTCAGCCAGACG 240

|||||

Sbjct201 CCACGCCGTATGCGGTACTGACCATCAGCAGCGGCACGTTTCGATGCGGCTCAGCCAGACG 260

Query241 CGTCACGCACTGGCGAAACGCACACCGTGGAGTGGCAGGCTCCGGCTGTGGCGATTACCC 300

|||||

Sbjct261 CGTCACGCACTGGCGAAACGCACACCGTGGAGTGGCAGGCTCCGGCTGTGGCGATTACCC 320

Query301 GCACGGCAACCCAGGCGGCCAGAGCAACAGCGTCGATCTCGACAAAGCCCGTCTGGTGG 360

|||||

Sbjct321 GCACGGCAACCCAGGCGGCCAGAGCAACAGCGTCGATCTCGACAAAGCCCGTCTGGTGG 380

Query361 TCAGCGTCGGTCGCGGCATTGGCAGCAAAGAGAACATTGCGCTGGCAGAACAGCTTTGCA 420

|||||

Sbjct381 TCAGCGTCGGTCGCGGCATTGGCAGCAAAGAGAACATTGCGCTGGCAGAACAGCTTTGCA 440

Query421 AG 422

||

Sbjct441 AG 442

Anexo 3 Alineamiento de la secuencia obtenida para el uso como control positivo del gen *ial* en *Shigella* spp.

NÚMERO DE ACCESO

GenBank: [gb|CP001384.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/CP001384.1) *Shigella flexneri* 2002017 plasmid pSFxv_1, complete sequence

SECUENCIA OBTENIDA DEL PROGRAMA BLAST

```
>gb|CP001384.1|:132213-132532 Shigella flexneri 2002017 plasmid
pSFxv_1, complete sequence
CTGGATGGTATGGTGAGGTTTTATTGTCTTTTTGTCATGAAATAATGTTTTTAATTAAGAGTGGGG
TTTGATGGACATTTCAAGCTGGTTCGAAAGTATTCATGTGTTTTTAATACTCCTGAACGGCGTTTT
TTTTAGATTGGCTCCATTATTTTTCTTTCTTCCATTTTTAAATAACGGTATAATTTCTCCATCTAT
TAGAATACCTGTGATTTTTCTTGTTCATCAGGATTAATTACTTCTGGTAAGGTAGACATAGGTTT
TTCTGTTTTTGAACATGTTTATTTTCCTTATGTTCAAGGAAATAATTGTTGGCCTCC
```

SECUENCIA EN FORMATO FASTA OBTENIDA POR SECUENCIAMIENTO

```
>110614-17_L10_ial_M-IalF*txt.
ATGTTTTTAATTAAGAGTGGGTTTTGATGGACATTTCAAGCTGGTTCGAAAGTATTCATGTGTTTT
TAATACTCCTGAACGGCGTTTTTTTTAGATTGGCTCCATTATTTTTCTTTCTTCCATTTTTAAATA
ACGGTATAATTTCTCCATCTATTAGAATACCTGTGATTTTTCTTGTTCATCAGGATTAATTACTT
CTGGTAAGGTAGACTTAGGTTCTTCTGTTTTTGAACATGTTTATTTTCCTTATGTTCAAGGAAATAA
TTGTTGGCCTCC
```

DESCRIPCIÓN DEL ALINEAMIENTO

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
CP001384.1	<i>Shigella flexneri</i> 2002017 plasmid pSFxv_1, complete sequence	505	505	100%	7e-140	99%	
CP001062.1	<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94 plasmid pBS512_211, complete sequence	505	505	100%	7e-140	99%	
AF386526.1	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301 virulence plasmid pCP301, complete sequ	505	505	100%	7e-140	99%	
AY206439.1	<i>Shigella flexneri</i> plasmid pINV_F6_M1382 [ipa] (ipa), VirB (virB), Acp	505	505	100%	7e-140	99%	
AL391753.1	<i>Shigella flexneri</i> virulence plasmid pWR100: from 1 to 213494	505	505	100%	7e-140	99%	
AF348706.1	<i>Shigella flexneri</i> 5a plasmid virulence plasmid pWR501, complete sequ	505	505	100%	7e-140	99%	
CP000035.1	<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197 plasmid pSD1_197, complete sequence	505	505	100%	7e-140	99%	
CP000039.1	<i>Shigella sonnei</i> Ss046 plasmid pSS_046, complete sequence	505	505	100%	7e-140	99%	
D50601.1	<i>Shigella sonnei</i> genes for 26 ORFs, complete cds	505	505	100%	7e-140	99%	
D13663.1	<i>Shigella flexneri</i> plasmid pMYSH6000 DNA, region-5 containing 11 ORF	505	505	100%	7e-140	99%	

ALINEAMIENTO

>lcl|39891

Length=276

Score = 505 bits (273), Expect = 7e-148
 Identities = 275/276 (99%), Gaps = 0/276 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query45  ATGTTTTTAATTAAGAGTGGGGTTTGATGGACATTTCAAGCTGGTTCGAAAGTATTCATG  104
          |
Sbjct1   ATGTTTTTAATTAAGAGTGGGGTTTGATGGACATTTCAAGCTGGTTCGAAAGTATTCATG  60

Query105 TGTTTTTAATACTCCTGAACGGCGttttttttAGATTGGCTCCATTATTTTTCTTTCTTC  164
          |
Sbjct61  TGTTTTTAATACTCCTGAACGGCGTTTTTTTTAGATTGGCTCCATTATTTTTCTTTCTTC  120

Query165 CATTTTTAAATAACGGTATAATTTCTCCATCTATTAGAATACCTGTGATTTTTCTTGTTG  224
          |
Sbjct121 CATTTTTAAATAACGGTATAATTTCTCCATCTATTAGAATACCTGTGATTTTTCTTGTTG  180

Query225 CATCAGGATTAATTACTTCTGGTAAGGTAGACATAGGTTCTTCTGTTTTTGAACATGTTT  284
          |
Sbjct181 CATCAGGATTAATTACTTCTGGTAAGGTAGACTTAGGTTCTTCTGTTTTTGAACATGTTT  240

Query285 ATTCCTTATGTTCAAGGAAATAATTGTTGGCCTCC  320
          |
Sbjct241 ATTCCTTATGTTCAAGGAAATAATTGTTGGCCTCC  276
  
```

Anexo 4 Alineamiento de la secuencia obtenida para el uso como control positivo del gen *set1A* en *Shigella* spp.

NÚMERO DE ACCESO

GenBank:[gb|CP001383.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/CP001383.1) *Shigella flexneri* 2002017, complete genome.

SECUENCIA OBTENIDA DEL PROGRAMA BLAST

```
>gb|CP001383.1|:3109703-3110011 Shigella flexneri 2002017,
complete genome
TCACGCTACCATCAAAGATTACCTTTCTTCCCCCGGCACCTGTGGAATGGCGACATCCATATTCC
CGGTCAGCTGACCATGAAAGATAACGGGTTGTTTTGCCCGCCCGGCCAGGATCCTATCTTTTACTG
TCTGAACTGCTTTGTTTTTGTTCATGCCAACAAACTCCCCTGAGCCGGATCATTTCAGGCTGTTCC
CCCACAGAGTGTTACCATAGCTGGCAGATTTTCAGAATATAGAAGCGGGTCTGGCTGTTGAGTATCA
TGCTGTACAGGTTTCTGAGTGCCGGTACCACCAAAGGGGGATA
```

SECUENCIA EN FORMATO FASTA OBTENIDA POR SECUENCIAMIENTO

```
>110614-17_P10_shEt_1A_M-shET1AF*txt.
```

```
TGGAATGGCGACATCCATATTCGCGTTCAGCTGACCATGAAAGATAACGGGTTGTTTTGCCCGCCC
GGCCAGGATCCTATCTTTTACTGTCTGAACTGCTTTGTTTTTGTTCATGCCAACAAACTCCCCTG
AGCCGGATCATTTCAGGCTGTTCCCCACAGAGTGTTACCATAGCTGGCAGATTTTCAGAATATAGAA
CGGGTCTGGCTGTTGAGTATCATGCTGTACAGGTTTCTGAGTGCCGGTACCA
```

DESCRIPCIÓN DEL ALINEAMIENTO

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
3209		468	468	81%	8e-137	100%	

ALINEAMIENTO

>lcl|3209
Length=253

Score = 468 bits (253), Expect = 8e-137
Identities = 253/253 (100%), Gaps = 0/253 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query44  TGG AATGGCGACATCCATATTCCCGGTCAGCTGACCATGAAAGATAACGGGTTGTTTTGC 103
          |
Sbjct1   TGG AATGGCGACATCCATATTCCCGGTCAGCTGACCATGAAAGATAACGGGTTGTTTTGC 60

Query104 CCGCCCGGCCAGGATCCTATCTTTTACTGTCTGAACTGCTTTGTTTTTGTTCATGCCAAC 163
          |
Sbjct61  CCGCCCGGCCAGGATCCTATCTTTTACTGTCTGAACTGCTTTGTTTTTGTTCATGCCAAC 120

Query164 AA ACTCCCACTGAGCCGGATCATTCAGGCTGTTCCCCCACAGAGTGTTACCATAGCTGGC 223
          |
Sbjct121 AA ACTCCCACTGAGCCGGATCATTCAGGCTGTTCCCCCACAGAGTGTTACCATAGCTGGC 180

Query224 AG ATTTCAGAAATATAGAAGCGGGTCTGGCTGTTGAGTATCATGCTGTACAGGTTTCCTGG 283
          |
Sbjct181 AG ATTTCAGAAATATAGAAGCGGGTCTGGCTGTTGAGTATCATGCTGTACAGGTTTCCTGG 240

Query284 AG TGCCGGTACCA 296
          |
Sbjct241 AG TGCCGGTACCA 253

```

Anexo 5 Alineamiento de la secuencia obtenida para el uso como control positivo del gen *set1B* en *Shigella* spp.

NÚMERO DE ACCESO

GenBank:[gb|CP001383.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gb|CP001383.1) *Shigella flexneri* 2002017, complete genome.

SECUENCIA OBTENIDA DEL PROGRAMA BLAST

```
>gb|CP001383.1|:3109312-3109458 Shigella flexneri 2002017,
complete genome
GTGAACCTGCTGCCGATATCCAGGGCTGAGTTATGGTTCAGCGTAATATTCCTTCATACTGGCTC
CTGTCATTCACGGTGTCCGGGACAGAGGTACCTTCCTCCGGAATGACATAATTTCTGTTCCGTCA
TTTTTATCCACAAAT
```

SECUENCIA EN FORMATO FASTA OBTENIDA POR SECUENCIAMIENTO

>110614-17_L11_shEt_1B_M-shET1BF*txt.

```
TATGGATCAGCGTAATATTCCTTCATACTGGCTCCTGTCATTCACGGTGTCCGGGACAGAGGTAC
CTTCCTCCGGAATGACATAATTTCTGTTCCGTCAATTTTTATCCACAAATG
```

DESCRIPCIÓN DEL ALINEAMIENTO

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
57271		211	211	0%	9e-56	99%	

ALINEAMIENTO

>lcl|61439

Length=117

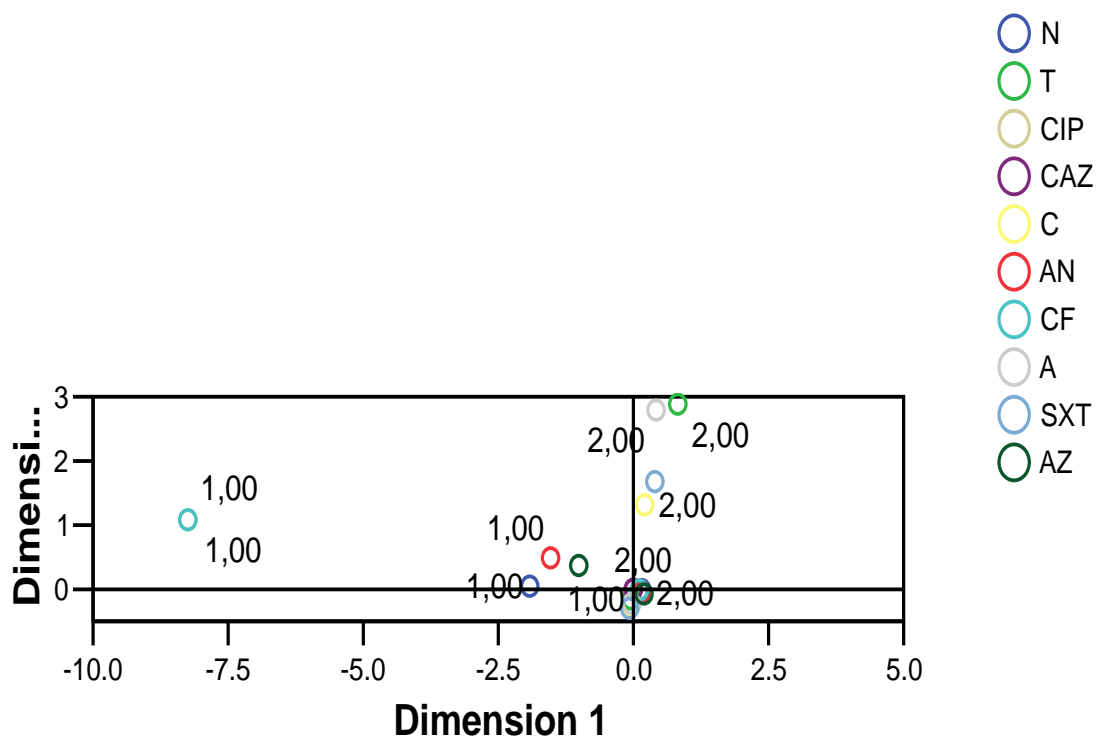
Score = 209 bits (113), Expect = 1e-59
Identities = 115/116 (99%), Gaps = 0/116 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query32  TATGGTTCAGCGTAATATTCCTTCATACTGGCTCCTGTCATTCACGGTGTCCGGGACAG  91
        ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct1   TATGGATCAGCGTAATATTCCTTCATACTGGCTCCTGTCATTCACGGTGTCCGGGACAG  60

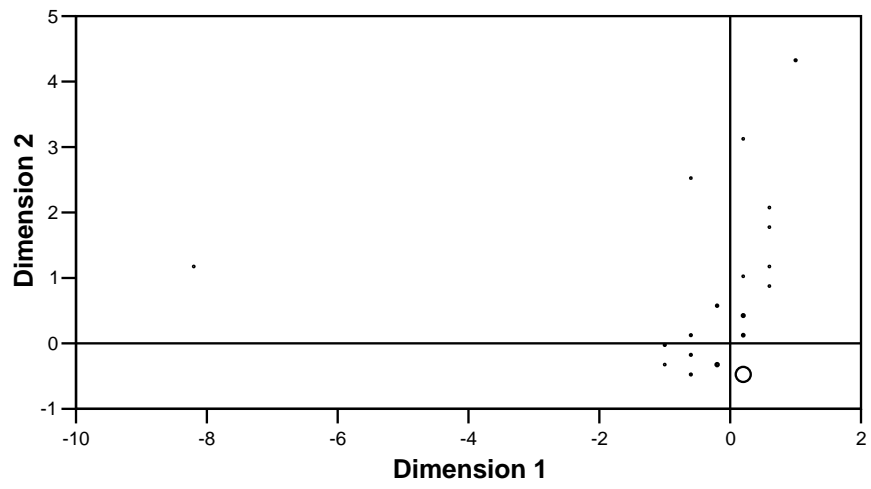
Query92  AGGTACCTTCCTCCGGAATGACATAATTCCTGTTCCGTCATTTTTATCCACAAAT  147
        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct61  AGGTACCTTCCTCCGGAATGACATAATTCCTGTTCCGTCATTTTTATCCACAAAT  116
```

ANEXO 6 **Detalle de los resultados del análisis de la comparación entre serogrupos de *Shigella* spp. y resistencia a antibióticos**

Quantifications

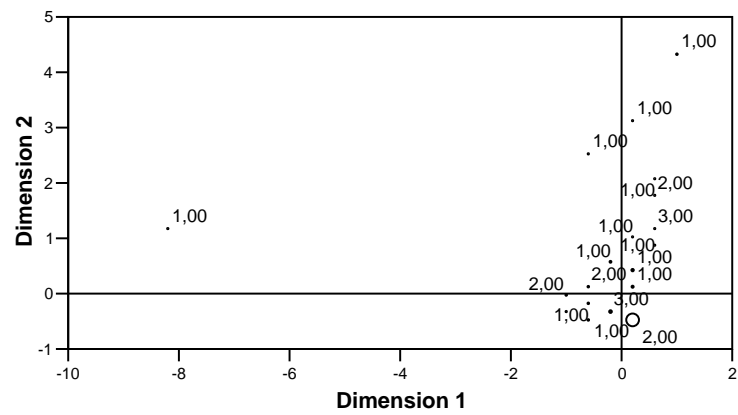


Object Scores



Cases weighted by number of objects.

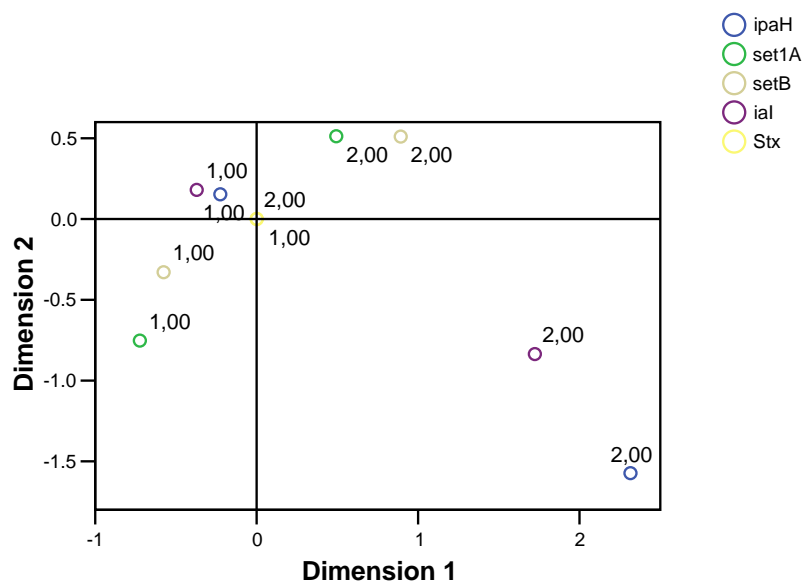
Object Scores Labeled by Serotipos



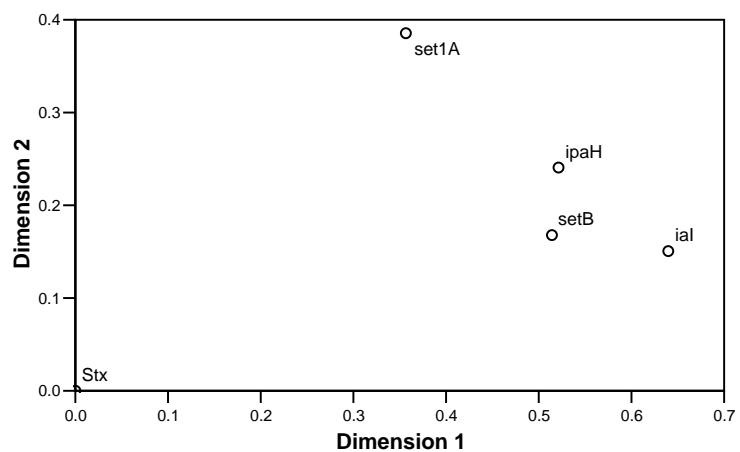
Cases weighted by number of objects.

ANEXO 7 **Detalle de los resultados del análisis de la comparación entre serogrupos de *Shigella* spp. y presencia de genes de virulencia.**

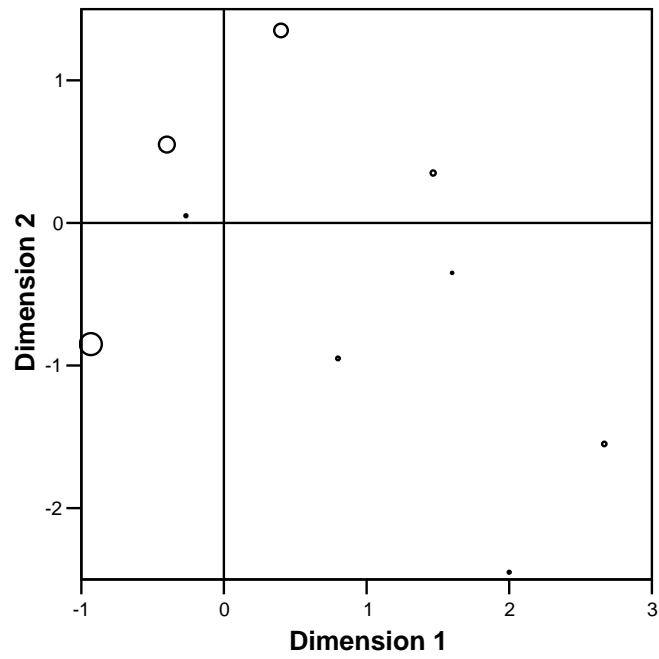
Quantifications



Discrimination Measures

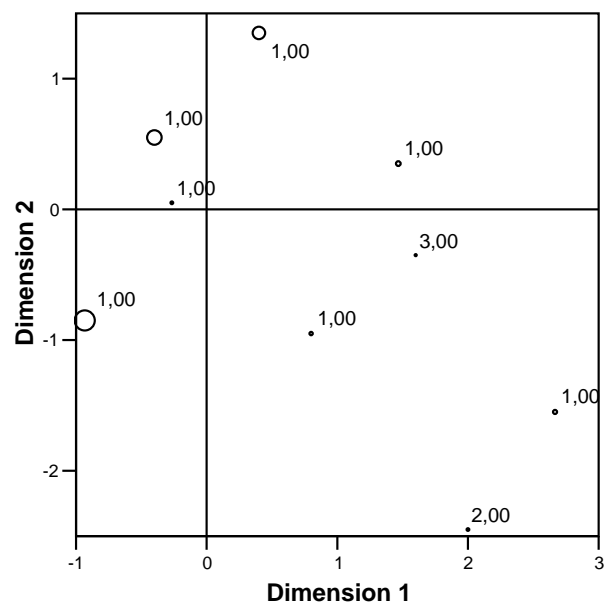


Object Scores



Cases weighted by number of objects.

Object Scores Labeled by Serotipos



Cases weighted by number of objects.