ISSN - 0034 - 9313

REVISTA ECUATORIANA DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS (REMCB)

VOLUMEN XXXVI - Nº 2 - NOVIEMBRE 2015

Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas
Volumen XXXVI - Nº 2, noviembre 2015
ISSN - 0034 - 9313

Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Av. 12 de Octubre 1076 y Roca, Quito, Ecuador

Corrección de estilo y ortografía: Alfonso Sánchez

Asistente de edición: Lic. Maria Jose Salazar Nicholls

Impresión, diseño y diagramación:

QUALITYPRINT
Soluciones reales para necesidades reales.

QualityPrint Cía. Ltda., Quito, Ecuador

Fotografía portada: Jorge A. Castillo-Castro.

"La biodiversidad en los bosques tropicales, sobre todo en el Yasuní, es sorprendente. La vida se abre campo aprovechando todos los sustratos posibles. Un brote de helecho crece de entre una cama de musgos y hepáticas que cubren las ramas de las plantas. Las briofitas (musgos y hepáticas y antocerotes) son considerados como los reservorios más importantes de agua así como también los sustratos más importantes para la colonización de nuevos sustratos"

REVISTA ECUATORIANA DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Rector: Dr. Fernando Ponce León S.J.

Casa de la Cultura Ecuatoriana Benjamín Carrión
Presidente: Sr. Raúl Pérez Torres

Sociedad Ecuatoriana de Ciencias Biológicas, Núcleo de Pichincha
Presidente: Dr. Jaime Costales Cordero

Editores:

Dra. Doris Vela Peralta[1] (Ciencias Biológicas)

Dr. Tjitte de Vries[1] (Ciencias Biológicas)

[1]Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Freddy G. Carrión Suárez MD. Psq. [1,2] (Medicina)

[1]Pontificia Universidad Católica del Ecuador

[2]Asociación Ecuatoriana de Psiquiatría

Coeditores:

Dr. Carlos A. Soria Proaño[1]

Dr. Rommel Montufar Galárraga[1]

[1]Pontificia Universidad Católica del Ecuador

La Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas (REMCB) (ISSN 0034-9313) es un órgano de difusión científica auspiciada por la Casa de la Cultura Ecuatoriana Benjamín Carrión, la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y la Sociedad Ecuatoriana de Biología, Núcleo de Pichincha. La REMCB se encuentra incluida en el Latin Index, se publica semestralmente y está dirigida a los científicos nacionales e internacionales así como a estudiantes de Ciencias de la Vida.

El contenido de los artículos científicos y de las publicaciones que aparecen en la revista son responsabilidad exclusiva de sus autores o de los auspiciantes y no representan necesariamente el sentir de los editores de la REMCB, quienes no se responsabilizan por errores o por las consecuencias surgidas por el uso del material que aparece publicado en la misma.

Sensibilidad antimicrobiana y detección de genes de virulencia en aislados clínicos de *Shigella* spp.

Irina Villacrés[1], Iliana Alcocer[1], Jeannete Zurita[2] y Mercedes Rodríguez-Riglos[1]

[1] Laboratorio de Microbiología, Escuela de Ciencias Biológicas,
Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador, iralcocer@puce.edu.ec

[2] Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Recibido: 2015-08-07; aceptado: 2015-10-05

RESUMEN.- El género *Shigella* comprende las especies *S. flexneri, S. sonnei, S. boydii* y *S. dysenteriae,* bacterias responsables de la shigelosis. Éste género se caracteriza por la presencia de multirresistencia a antibióticos y una variedad de factores de virulencia que permiten la infección al hospedero. El objetivo de este estudio fue establecer la sensibilidad antimicrobiana y detectar 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. Se analizaron 79 aislados obtenidos de Zurita & Zurita Laboratorios y del hospital Vozandes. Mediante serotipificación, se registraron tres especies: *S. flexneri* (64.6 %), *S. sonnei* (29.1 %), y *S. boydii* (6.3 %). La sensibilidad antimicrobiana siguió el método de difusión con disco según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI). La resistencia obtenida fue a tetraciclina (96.20 %), ampicilina (94.9 %), trimetoprima/sulfametoxazol (86.1 %) y cloranfenicol (84.8 %). No se registraron aislados de *Shigella* con resistencia a ciprofloxacino, azitromicina ni a ceftriaxona. Se determinó la presencia de genes de virulencia por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se determinó una alta prevalencia de los genes *ipaH* (91.1 %) e *ial* (82.3 %), los genes codificantes de enterotoxina 1 (*set1A* y *set1B*) se encontraron en un 35.4 %. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de multirresistencia a antibióticos y cepas virulentas.

PALABRAS CLAVES: enterotoxinas, genes de virulencia, resistencia antimicrobiana, serogrupos, *Shigella* spp.

ABSTRACT.- The genus *Shigella* includes *S. flexneri, S. sonnei, S. boydii* and S. *dysenteriae,* which are producers of shigelosis. The genus are characterized due to multidrug resistance to antibiotics and a variety of virulence factors that allow the infection to host. The objective of this study was to establish the antibiotic susceptibility and detection of virulence genes in clinical isolates of *Shigella* spp.: invasion plasmid antigen H (*ipaH*), invasion-associated locus (*ial*), *Shigella* toxin (*Stx*), *Shigella* enterotoxin 1A (*set1A*), and *Shigella* enterotoxin 1B (*set1B*). We analyzed 79 strains from "Zurita & Zurita Laboratorios" and "Hospital Vozandes". Three species were identified: *S. flexneri* (64.6 %), *S. sonnei* (29.1 %), and *S. boydii* (6.3 %) by antiserum agglutination. The antimicrobial susceptibility was performed by following the disk diffusion method and recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). High resistance was observed to tetracycline (96.2 %), ampicillin (94.9 %), trimethoprim/sulfamethoxazole (86.1 %), and chloramphenicol (84.8 %). No resistance was identified to ciprofloxacin, ceftriaxone and azitromicin. The analysis of the presence of virulence genes was performed using the Polymerase Chain Reaction (PCR). A high prevalence of genes *ipaH* (91.1 %) and *ial* (82.3 %) was determined, the encoding genes of enterotoxin 1 (*set1* and *set1B*) were found in 35.4 % of the isolates. The results demonstrate the existence of multidrug resistances to antibiotics and virulent strains of the genus *Shigella.*

KEYWORDS: antimicrobial resistance, enterotoxins, serogroups, *Shigella* spp., virulence genes.

INTRODUCCIÓN

El género *Shigella* (Shiga, 1989) comprende bacilos Gram negativos de 0.3 a 1.0 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). Las cuatro especies del género *Shigella* que provocan todas las manifestaciones clínicas de la shigelosis, que pueden causar desde diarrea acuosa hasta diarrea exudativa fulminante, son *Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella boydii* y

Shigella sonnei. La enfermedad más grave resulta de la infección causada por las especies *S. dysenteriae* tipo 1. Se considera que la cepas de *S. flexneri* son menos virulentas, mientras que, las de *S. boydii* y *S sonnei*, generalmente, originan episodios autolimitados de diarrea acuosa con fiebre. No se ha establecido hasta el momento la razón por la cual en los países industrializados predominan las infecciones por cepas se *S. sonnei* y *S. boydii*, mientras que, los aislamientos de *S. dysenteriae* y *S. flexneri* son característicos de los países en vías de desarrollo (Zurita, 2012).

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. Todas ellas pueden causar disentería bacilar, aunque con diferente gravedad (Zurita, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (2010) estima la ocurrencia de 165 millones de casos y 1.1 millones de muertes por año, de las cuales alrededor de 576000 son de niños menores de 5 años de edad.

La transmisión de estas bacterias se produce principalmente por ruta fecal-oral directa o indirecta en lugares que se caracterizan por una higiene deficiente (Kotloff *et al*., 1999). 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 shigelosis es una enfermedad diarreica aguda autolimitada, sin embargo, hay condiciones en las cuales se encuentra establecido el tratamiento cuyo objetivo principal es bajar la carga microbiana y la intensidad de los síntomas. Se recomienda el uso de ceftriaxona en lactantes menores de 6 meses que requieran hospitalización así como ciprofloxacino en adultos mayores con deshidratación severa. Debido a que el inóculo es muy bajo, también se recomienda tratamiento en los casos de hacinamiento (Zurita, 2012).

El género *Shigella* presenta una variedad de factores de virulencia que le permiten el ingreso a la mucosa gástrica, evadiendo las defensas del hospedero. Varios de estos factores han sido asociados al género *Shigella*, los más relevantes en este estudio son los que intervienen en la invasión y colonización del epitelio intestinal como los genes *ipaH* (invasión plasmid antigen H), que permite la diseminación facilitada de *Shigella* a través de la mucosa y la inhibición de la coagulación inducida por trombina que provoca la eliminación de sangre en las heces (Hale, 1991) e *ial (*invasión-associated locus) que promueve la internalización e invasión del tejido "blanco" gracias a la producción de adhesinas e invasinas y permite la diseminación intercelular de la bacteria y el traslado y secreción de diversos factores de virulencia (Noriega *et al*., 1999). 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 en el cromosoma y en el ADN plasmidial en múltiples copias (Lin Thong *et al*., 2005).

La enterotoxina 1 (ShET-1), es una proteína codificada en el cromosoma bacteriano por los genes *set1A* (subunidad A de la proteína) de 309 pb y *set1B* (subunidad B de la proteína) de 147 pb. 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).

Otro factor de virulencia es la exotoxina Shiga, que es liberada únicamente durante la lisis celular. Su efecto es bloquear la síntesis proteica en la célula eucariota (Henhly *et al*., 1996). 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. La principal complicación de la liberación de la toxina Shiga es el desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico.

Por lo expuesto, el objetivo fue 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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio.- El presente estudio incluyó un total de 79 aislados clínicos de *Shigella* spp., obtenidos en Zurita & Zurita Laboratorios (Quito, Ecuador) y del hospital Vozandes en Quito. Fueron colectados durante el año 2005 al año 2010. Las muestras provienen de procesos infecciosos documentados.

Los aislados se mantienen en la Colección Bacteriana Quito Católica, CB-QCA del Laboratorio de Microbiología en la Escuela de Ciencias Biológicas con registro de los códigos hospitalarios, fechas de aislamiento, origen de los aislados, sexo y edad de los pacientes.

Identificación bioquímica del género *Shigella*.- El género *Shigella* de acuerdo con sus reacciones bioquímicas se identifica como un bacilo no mótil, no fermentador de lactosa, productor o no de ornitina descarboxilasa según la especie, no productor de triptofanasas y que presenta una fermentación butilén-glicólica. Para evidenciar este perfil se realizaron las pruebas bioquímicas estándares: agar con triple azúcar y hierro (TSI), motilidad, indol, ornitina (MIO) y rojo de metilo (RM)/Vogues-Proskauer (VP), a partir de colonias aisladas en agar entérico Hecktoen (Difco, 2003).

Identificación serológica de las especies del género *Shigella*.- La serotipificación se realizó mediante la técnica de aglutinación en lámina propuesta por Edwars y Edwing (1972) y conforme a las recomendaciones del Manual Difco *Shigella* 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. 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 American Type Culture Collection, ATCC: *S. sonnei* 25931; *S. boydii* (1) 9207; y *S. flexneri* (2b) 12022. Para los controles negativos se utilizó una gota de cloruro de sodio al 0.85 % y la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

Sensibilidad a los antimicrobianos.- Para este procedimiento fue utilizado el método de difusión con disco (Bauer *et al.*, 1966) en agar Müller-Hinton (Difco ™) con sujeción a las recomendaciones propuestas por el Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI, 2015).

Detección molecular de genes de virulencia en *Shigella* spp.- La extracción del ADN total se realizó con el empleo del método sugerido por Carvalho *et al.* (2001). La confirmación de la integridad 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 1. Para medir el peso molecular de las bandas obtenidas se utilizaron 100 bp DNA Ladder TrackIt™ (Invitrogen). Como control negativo se utilizó agua de grado molecular y como control positivo para el gen 16S ARNr se empleó la cepa *S. flexneri* ATCC (2b) 12022.

El ciclo de amplificación del gen 16S fue llevado a cabo en un termociclador Labnet Multigene Model TC9600-G programando un ciclo de desnaturalización inicial a 93° C por 3 minutos, seguido de 27 ciclos, los cuales consistieron en un paso de desnaturalización a 93° C por 30 segundos, seguido de un paso de anillamiento a 59.3° C 45 segundos, y un último paso de extensión a 65° C por 45 segundos; finalmente un

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la identificación de varios genes asociados a mecanismos de virulencia en *Shigella* spp y el 16S.

Iniciador	Gen de virulencia	Secuencia de nucleótido (5′ a 3′)	Tamaño Amplicón (pb)	Referencia
16S rRNA F	rrs	GAGTACGACCGCAAGGTTGA	100	Malhotra-Kumar *et al.* (2005)
16S rRNA R	rrs	CTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG	100	Malhotra-Kumar *et al.* (2005)
ShET1AF	set1A	TCACGCTACCATCAAAGA	309	Fusano *et al.* (1995)
ShET1AR		TATCCCCCTTTGGTGGTA		
ShET1BF	set1B	GTGAACCTGCTGCCGATATC	147	Fusano *et al.* (1995)
ShET1BR		ATTTGTGGATAAAAATGACG		
ialR	ial	CTGGATGGTATGGTGAGG	320	Frankel *et al.* (1989)
ialR		GGAGGCCAACAATTATTTCC		
Shig1	ipaH	TGGAAAAACTCAGTGCCTCT	423	Lüscher y Altewegg (1994)
Shig2		CCAGTCCGTAAATTCATTCT		
StxF	Stx	CAGTTAATGTGGTTGCGAAG	895	Frankel *et al.* (1989)
StxFR		CTGCTAATAGTTCTGCGCATC		

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.

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 1.

Para la reacción en cadena de la polimerasa se usó el ADN total. Las condiciones de amplificación utilizadas son descritas por Lin Thong *et al.* (2005) y Vargas *et al.* (1999). 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, que contiene: 12.5 µl de Green 0.4 mM de cada iniciador (Invitrogen) y 1 µl de ADN.

El programa de amplificación de los genes se realizó en un termociclador Labnet Multigene Model TC9600-G. Se inició el programa de PCR con una desnaturalización inicial de 95° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con una desnaturalización a 95° C durante 50 segundos, anillamiento, 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 estimado visualmente mediante el uso de 100 bp DNA Ladder Tracklt™ (Invitrogen).

Análisis de los productos de amplificación.- Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.0 % en tampón TBE 1 X (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico y 2.50 mM de EDTA). El programa de electroforesis consistió en la aplicación de 8V/cm durante 45 minutos en tampón TBE 0.5 X. La tinción del gel se realizó con el empleo de SYBRGold (Invitrogen). Los resultados fueron documentados en el sistema de captura de imágenes MiniBis Pro (DNR Bio- Imaging Systems) con la ayuda del programa informático GelCapture 4.5.3.

Validación de los genes de virulencia.- Para validar el protocolo de amplificación y confirmar la identidad de la cepa se utilizó como control el aislado CB-QCA 3349 *Shigella flexneri* que posee cuatro de los cinco genes en estudio: *ipaH, ial, set1A* y *set1B.* Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen Korea para su secuenciamiento. Las muestras fueron purificadas a partir de gel de agarosa con la utilización del Kit Wizard ® SV Gel and PCR Clean-Up System. Las secuencias fueron editadas con el programa Genius versión 7.0 y alineadas con las secuencias depositadas en el GENBANK mediante la utilización de la herramienta BLAST.

Análisis estadístico.- El análisis porcentual de los resultados se realizó mediante el empleo de Microsoft Office Excel 2010 (©2010 Microsoft Corporation). Para el estudio de los resultados obtenidos tanto en la serotipificación como en la presencia de genes de virulencia, y resistencia a antimicrobianos, se utilizó el método estadístico de análisis de correspondencias múltiples (MCA), con el cual 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.

RESULTADOS

Población de estudio.- De los 79 aislados, 61 muestras (77.20 %) fueron obtenidas a partir de heces, 18 muestras (22.8 %) a partir de secreciones vaginales.

Identificación serológica de las especies del género *Shigella*.- Por medio del método de aglutinación en lámina se obtuvo la identificación de las especies del género *Shigella*, obteniéndose 51 aislados (64.6 %) positivos para *Shigella flexneri*, 23 aislados (29.1 %) para *Shigella sonnei*, 5 aislados (6.3 %) positivos para *Shigella boydii*, y 0 % de aislados positivos para *Shigella dysenteriae* (Figura 1).

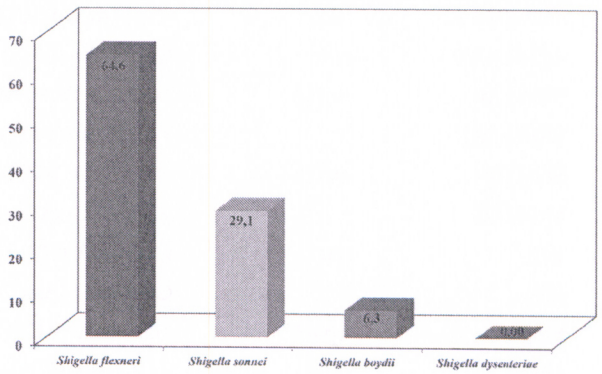


Figura 1. Porcentaje de identificación de las diferentes especies en la población total de aislados de *Shigella* spp. N=79

De los 51 aislados de *Shigella flexneri*, 33 (64.7 %) fueron aislados de heces y 18 (35.3 %) de secreción vaginal. De los 23 aislados de *Shigella sonnei*, 23 (100 %) fueron aislados de heces. De los 5 aislados de *Shigella boydii*, también el 100 % fueron aislados de heces.

Sensibilidad a los antimicrobianos.- La sensibilidad a antimicrobianos obtenida para los diferentes antibióticos enfrentados con los aislados de *Shigella* spp., se observa en la Figura 2. Analizando globalmente el género, se observó que 76 aislados (96.2 %) presentan una resistencia a tetraciclina, 75 aislados (94.9 %) fueron resistentes a ampicilina, 68 aislados (86.1 %) fueron resistentes a trimetoprima/sulfametoxazol, 67 aislados (84.8 %) presentaron resistencia a cloranfenicol, 7 aislados (8.9 %) fueron resistentes a ácido nalidíxico, 4 aislados (5.1 %) presentaron resistencia a nitrofurantoina y no se encontró aislamientos con resistencia a ciprofloxacino, azitromicina ni a ceftriaxona, (Figura 2). 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.

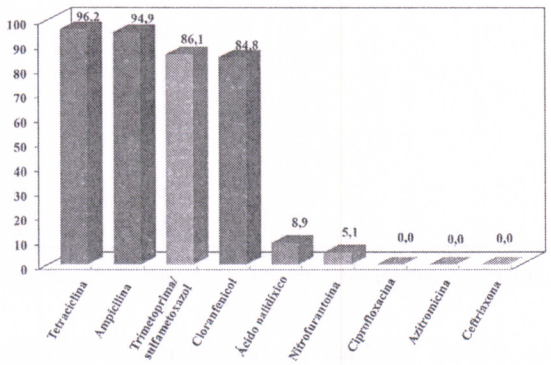


Figura 2. Porcentaje de resistencia a antibióticos dentro de la población de *Shigella* spp. N=79

Detección molecular de los genes de virulencia en *Shigella* spp.- Para el gen 16S ARNr se obtuvo un 98 % de identidad, para el gen *ipaH* se obtuvo un 100 % de identidad, para el gen *ial* se obtuvo el 99 % de identidad en un total de 10 secuencias donde se producen alineamientos significativos, para el gen *set1A* se obtuvo 100 % de identidad y para el gen *set1B* se obtuvo un 99 % de identidad.

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 (Figura 3).

Los resultados obtenidos para el total de 79 indican que 72 aislados (91.1 %) presentaron el gen *ipaH*,

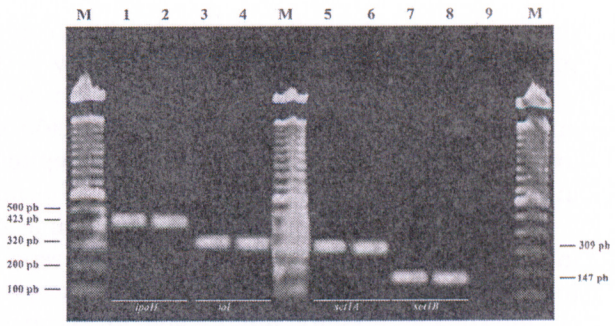


Figura 3. Representación fotográfica en gel de agarosa de la amplificación de los genes *ipaH, ial, set1A y set1B* en *Shigella* spp. M, marcador de peso molecular (100pb); Pocillo 1, control positivo gen *ipaH* cepa CB-QCA 3349 *Shigella flexneri*; Pocillo 2, muestra positiva de *Shigella* spp. para 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.

el gen *ial* se presentó en 65 aislados (82.3 %), 47 aislados (59.5 %) presentaron el gen *set1B* y 32 aislados (40.5 %) el gen *set1A*. Ningún aislado evidenció presencia del gen *Stx* (Figura 4). Seis aislados (7.6 %) no presentaron ningún gen de los analizados en este estudio.

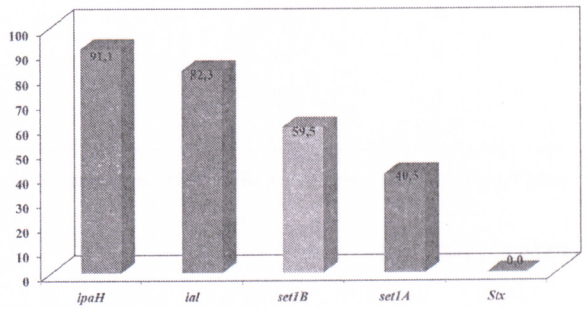


Figura 4. Porcentaje de presencia de los genes set1A, set1B, *ial*, *ipaH* y *Stx* en la población total de aislados de *Shigella* spp. N=79

Según el análisis estadístico 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 con las otras especies.

La presencia de los cuatro genes *ipaH, ial, set1A* y *set1B* en conjunto se encuentra exclusivamente 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*.

En la Tabla 2 se encuentran en detalle los patrones de virulencia en *Shigella*. *Shigella flexneri* tiene

principalmente el patrón de virulencia 1 con la presencia de los genes *ipaH, ial, set1A* y *set1B* con 28 aislados que indican la producción de la enterotoxina 1 (*set1A* y *set1B*), la producción de los genes de la invasión y colonización del epitelio intestinal (*ipaH*) y de la producción de adhesinas e invasinas que permiten la diseminación intercelular de la bacteria (*ial*). En esta especie todos los aislados presentaron el gen *ipaH* excepto 4 aislados que no tuvieron ningún gen. En la especie *S. sonnei* el patrón de virulencia prevalente fue el 4 con la presencia de los genes *ipaH, ial* y *set1B* en 11 aislados. En esta especie todos los aislados presentaron el gen *ipaH* excepto 2 aislados que no tuvieron ningún gen. Finalmente en la especie *S. boydii* se vio principalmente el patrón de virulencia *ipaH, set1B, ial* y el patrón *ipaH, ial*. Todos los aislados en esta especie tuvieron el gen *ial*.

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 serotipificación en los aislados de *Shigella* se obtuvo la presencia de las especies *S. flexneri, S. sonnei* y *S. boydii*. No se han registrado en revistas indexadas, hasta la fecha, cepas de *S. dysenteriae* en el Ecuador ni en 10 años de vigilancia de la resistencia (Zurita, 2012). En este estudio, mediante serología, no se identificó *S. dysenteriae*.

Estudios relativos a la identificación de especies dentro del género *Shigella* han determinado que

Tabla 2. Patrones de virulencia mostrados por los aislados de *Shigella* spp.

		Especies				
Genotipos de virulencia	Patrón	*S. flexneri*	*S. sonnei*	*S. boydii*	Total de cepas	%
1	ipaH,set1A,set1B, ial	28			28	35.4
2	ipaH, ial	7	7	2	16	20.3
3	ipaH, set1A, ial	1			1	1.3
4	ipaH, set1B, ial	6	11	2	19	24.1
5	ipaH, set1A	2	1		3	3.8
6	ipaH	3	2		5	6.3
7	ial			1	1	1.3
8	ninguno	4	2		6	7.6
Total		51	23	5	79	100.0

ipaH, invasión plasmid antigen H; *ial*, invasión-associated locus; *set1A*, enterotoxina 1-subunidad A; *set1B*, enterotoxina 1-subunidad B.

DISCUSIÓN

Las enfermedades diarreicas a nivel mundial han sido atribuidas a diferentes agentes infecciosos y uno de los más comunes es *Shigella*. Mundialmente se producen unos dos mil millones de casos de diarrea cada año y se consideran como la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años (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). Al ser las enfermedades transmitidas por alimentos 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).

en países en vías de desarrollo la circulación prevalente es de *S. flexneri* y *S. dysenteriae*; mientras que, *S. sonnei* y *S. boydii* son característicos en países industrializados.

En el presente estudio se observó que la especie más común es *S. flexneri* con un 64.6 %, seguida por *S. sonnei* con un 29.1 %, *S. boydii* con un 6.3 % y no se reportó *S. dysenteriae*. Estos datos concuerdan 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* es similar (Mota *et al.*, 2005; Merino *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008).

Durante años las enfermedades diarreicas como la shigelosis han sido tratadas mundialmente con el uso de antibióticos como trimetoprima/sulfametoxazol, ampicilina, ciprofloxacino 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 de este es 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 con 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 trimetoprima/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 Zurita (2012) el porcentaje de resistencia en *Shigella flexnerii* a ampicilina, tetraciclina, trimetoprima/sulfametoxazol y cloranfenicol sobrepasa el 60 %. Durante la vigilancia del año 2000 al 2010 no se han detectado aislamientos de *Shigella* resistentes a cefalosporinas de tercera generación y quinolonas. Las otras especies de *Shigella* como *S. boydii* y *S. sonnei* se aíslan en bajo número por lo que, no permiten sacar conclusiones de porcentaje resistencia. No se han detectado aislamientos de *S. dysenteriae* durante estos diez años de vigilancia.

En este estudio se observó una alta resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina y trimetoprima/sulfametoxazol lo que concuerda con los datos reportados a nivel mundial y especialmente en Latinoamérica (Bassa *et al.*, 2010; Zurita, 2012).

Debido a que en los niños no está indicado el uso de ciprofloxacino, se recomienda alternativamente utilizar el ácido nalidíxico (Replogle *et al.*, 2000), pero el inconveniente es que su uso genera rápidamente resistencia. La cefalosporina de tercera generación como ceftriaxona está indicada para lactantes que requieren hospitalización debido a la gravedad del cuadro clínico. En adultos y niños menores de 5 años está indicado ciprofloxacino como droga de primera elección y la azitromicina está indicada para los niños que pueden ser manejados en forma ambulatoria (Saurina *et al.*, 2000).

En este estudio 18 aislamientos provinieron de muestras de secreción vaginal aisladas en niñas menores de 9 años. La vulvovaginitis causada por *Shigella*, se debe a colonización de la zona perianal por un cuadro anterior de diarrea y que por la proximidad anatómica llega a la zona genital, causa un proceso inflamatorio de la vulva y vagina acompañado de sangrado. Esto se debe a que la fisiopatología de *Shigella* se manifiesta de igual manera que en el epitelio intestinal, en el epitelio vaginal que está exento de estrógenos (Ocampo *et al.*, 2014).

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 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 91.1 % 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 deleción 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). Siete aislados (8.9 %) no presentaron el gen *ipaH* de estos 6 (7.6 %) tampoco presentaron los otros genes de estudio.

Aunque el gen *ial* está encargado de permitir la invasión celular, en algunos casos no se observó la presencia de éste. 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 82.3 % y es el segundo gen presente dentro de los analizados en este trabajo.

En estudios anteriores autores describen que la presencia de los genes *set1A* y *set1B* juntos, únicamente se observan en la especie *S. flexneri*

concluyéndose que estos genes se encuentran altamente conservados en 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 35.4 % de presencia de estos genes juntos y dentro de este porcentaje el 100 % de los aislados positivos pertenecen a la especie *S. flexneri*, es decir que al presentarse en conjunto estos dos genes únicamente en la especie *S. flexneri* se podría afirmar que esta es la única especie productora de la enterotoxina ShET-1.

La 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 formaron patrones de virulencia según los genotipos encontrados en los aislados estudiados. El patrón de virulencia con mayor presencia es el número 1 (*ipaH, set1A, set1B, ial)* lo que 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.

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.

CONCLUSIONES

- La mayor prevalencia se determinó en la especie *S. flexneri* (64.6 %), seguida de la especie *S. sonnei* (29.1 %) y finalmente la especie *S. boydii* (6.3 %). No se identificaron aislados pertenecientes a la especie *S. dysenteriae*.

- Los aislados de *Shigella flexneri, S. sonnei* y *S. boydii* presentaron mayor resistencia a tetraciclina, seguido de ampicilina, trimetoprima/sulfametoxazol y finalmente, cloranfenicol. Mientras que presentaron una muy baja resistencia a nitroflurantoina. No se registraron aislados de *Shigella* con resistencia a ciprofloxacino, azitromicina ni a ceftriaxona.

- Los genes de virulencia se encuentran en alta proporción en los aislamientos de *Shigella* principalmente los genes *ipaH* e *ial*. Los genes *ipaH* permiten la invasión y colonización del epitelio intestinal y los genes *ial* la formación de adhesinas e invasinas y la diseminación intercelular de la bacteria.

- Los genes *set1A* y *set1B* productores de la enterotoxina 1 ShET-1 se encontraron exclusivamente en la especie *S. flexneri* que es la especie prevalente lo que contribuye a una mayor toxicidad.

- No se encontró *Shigella* toxin, esto se debe que esta toxina es producida en su mayoría para la especie *S. dysenteriae* y en el análisis no se identificó esta especie dentro de las muestras aisladas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas, PUCE, Quito, a todo el personal de Zurita & Zurita Laboratorios y del hospital Vozandes, Quito. Este estudio fue realizado con fondos del Proyecto "Diversidad Genómica y perfil de resistencia a antimicrobianos en bacterias entéricas" (Código de Proyecto G13019) y del proyecto "Genotipaje de la resistencia a antimicrobianos en bacterias entéricas" (Código G13034) financiados por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth. Informational Supplement, CLSI document. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA. 240 pp.

Difco. 2011. Manual Difco Shigella Antisera Poly O. Becton, Dickinson and Company. County Clare, Ireland. pp. 11-13.

Difco. 2003. Manual of Microbiological Culture Media. BD Diagnostic Systems. USA 696 pp.

Edwards P y Edwing W. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. Third edition. Burgers Publ. Co. Minneapolis, United States of America.

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.

Guerrant RL, Hughes JM 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.

Jiménez K y Achí R. 2009. Interacciones celulares en el proceso de invasión de *Shigella* spp. *Revista Panamericana de Infectología*, **11** (2):56-61.

Klotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sandonetti PJ, Adak GK y Levine MM. 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.

Lin Thong K, Ling Hoe S, Puthucheary 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 Altewegg 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.

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.

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

Ocampo D, Rahman, G, Giugno S, Risso P y Rubinstein A. Vulvovaginitis in a pediatric population: relationship among etiologic agents, age and Tanner staging of breast development. 2014. *Archivos argentinos de pediatría*, **112**(1):65-74.

Organización Panamericana de la Salud. 2009. Informe Anual de la Red de Monitoreo/ Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Basilia- Brasil.

Organización Panamericana de la Salud, 2010 http://www.who.int/topics/shigella/es/ [Consultado 6 de agosto de 2011].

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.

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

Saurina G, Quale JM y Manikal VM. 2000. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brooklyn, NY: epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, **45**:895-8.

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.

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.

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 antibmicrobial 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].

Zurita J. 2012. Datos de Resistencia Bacteriana en el Ecuador. En: Resistencia Bacteriana en el Ecuador. 49-78. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Centro de Publicaciones. Quito, Ecuador.