

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS COORDINACIÓN DE POSGRADO PROGRAMA DE POSGRADO: MAESTRÍA EN SANIDAD ANIMAL COHORTE 2023

Tema: Presencia de genes de resistencia a los antibióticos en *Shigella* spp. aislada de carne de pollo que se expende en el cantón de Ambato.

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del Título de Cuarto Nivel de Magister en Sanidad Animal

Modalidad del Trabajo de Titulación: **Proyecto de titulación con componentes de investigación aplicada y/o de desarrollo.**

Autor(a): Ing. Andrés Sebastián Pazmiño Orozco.

Director(a): Dra. Sandra Margarita Cruz Quintana, PhD

Cevallos – Ecuador

2024

A la Unidad Académica de Titulación de la Facultad/Centro

El Tribunal receptor del Trabajo de Titulación, presidido por Ing. Oscar Patricio Núñez Torres, PhD., e integrado por los señores: MVZ. Jenny Piedad Lozada Ortiz, Mg.; MVZ. Ana Rafaela Burgos Mayorga, Mg., designados por la Unidad Académica de Titulación del Centro de Posgrados de la Universidad Técnica de Ambato, para receptor el Trabajo de Titulación con el tema: “Presencia de genes de resistencia a los antibióticos en *Shigella* spp. aislada de carne de pollo que se expende en el cantón de Ambato” elaborado y presentado por el(la) señor(a) Ing. Andrés Sebastián Pazmiño Orozco, para optar por el Título de cuarto nivel de Magíster en Sanidad Animal una vez escuchada la defensa oral del Trabajo de Titulación, el Tribunal aprueba y remite el trabajo para uso y custodia en las bibliotecas de la UTA.

Ing. Oscar Patricio Núñez Torres, PhD.
Presidente y Miembro del Tribunal

MVZ. Jenny Piedad Lozada Ortiz, Mg.
Miembro del Tribunal

MVZ. Ana Rafaela Burgos Mayorga, Mg.
Miembro del Tribunal

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el Trabajo de Titulación presentado con el tema: Presencia de genes de resistencia a los antibióticos en *Shigella* spp. aislada de carne de pollo que se expende en el cantón de Ambato, le corresponde exclusivamente a: Ing. Andrés Sebastián Pazmiño Orozco, Autor(a) bajo la Dirección de Dra. Sandra Margarita Cruz Quintana, PhD, Director(a) del Trabajo de Titulación, y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.

Ing. Andrés Sebastián Pazmiño Orozco

c.c.: 1717708240

AUTOR(A)

Dra. Sandra Margarita Cruz Quintana, PhD

c.c. 1756730238

DIRECTOR(A)

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el Trabajo de Titulación, sirva como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi trabajo, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad.

Ing. Andrés Sebastián Pazmiño Orozco

c.c.: 1717708240

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

RESUMEN EJECUTIVO	10
ABSTRACT	11
CAPÍTULO I.....	12
1.1. Introducción.....	12
1.2. Justificación.....	12
1.3. Objetivos.....	13
1.3.1. General	13
1.3.2. Específicos	13
CAPITULO II	14
MARCO TEORICO	14
a) ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	14
b) FUNDAMENTACIÓN CIENTIFICA	15
2.1. <i>Shigella</i> spp.....	15
2.1.1. Taxonomía.....	16
2.1.2. Especies.....	17
2.1.3. Transmisión.....	17
2.2. Adquisición de resistencia y mecanismos de transferencia.....	18
2.3. Mecanismos de resistencia	18
2.4. Shigelosis.....	21
2.5. Carne de pollo.....	22
CAPITULO III	23
MARCO METODOLÓGICO	23
3.1. Tipo de investigación.....	23
3.2. Población o muestra.....	23
3.3. Prueba de Hipótesis - pregunta científica – idea a defender.....	23
3.4. Recolección de información	23
3.4.1. Ubicación	23
3.4.2. Características del lugar	23
3.4.3. Materiales y equipos.....	24
3.4.4. Factores de estudio	25

3.4.5.	Activar cepas de <i>Shigella</i> spp.....	25
3.4.7.	Tinción Gram	26
3.4.8.	Preparación de caldo cerebro-corazón (BHI broth) y siembra.....	26
3.4.9.	Extracción salina de ADN	27
3.4.10.	Determinación de pureza y concentración obtenida de ADN	28
3.4.11.	PCR de punto final o convencional.....	28
3.4.12.	Electroforesis en gel de agarosa.	29
3.4.13.	Revelación de resultados.....	29
CAPITULO IV.....		31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		31
4.1.	Evaluación de sensibilidad a los antibióticos	31
4.2.	Presencia de genes de resistencia a los antibióticos	35
4.2.1.	Gen <i>bla</i> _{TEM} (Resistencia a AMC)	35
4.2.2.	Resistencia a AMC debido a producción de BLEE.....	36
4.2.3.	Gen <i>gyrA</i> (Resistencia a CIP).....	39
4.2.4.	Resistencia a CIP por mutaciones específicas.....	39
4.2.5.	Resistencia a CIP por genes de resistencia mediados por plásmidos	41
CAPÍTULO V		42
CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES, BIBLIOGRAFÍA, ANEXOS.		42
5.1.	Conclusiones.....	42
5.2.	Recomendaciones	43
5.3.	Bibliografía.....	44
5.4.	Anexos	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Shigella</i>	16
Tabla 2. Características climatológicas del cantón Cevallos.....	23
Tabla 3. Materiales y equipos.....	24
Tabla 4. Genes de resistencia objetivo.....	25
Tabla 5. Condiciones PCR utilizadas.....	28
Tabla 6. Tamaño de halos de inhibición según la CLSI.....	29
Tabla 7. Clave de identificación de las cepas de <i>Shigella</i> spp.....	31
Tabla 8. Sensibilidad <i>in vitro</i> de cepas de <i>Shigella</i> spp. frente a cinco antibióticos evaluados (AZM, CRO, AMC, CIP y CN).....	32
Tabla 9. Resistencia por antibiótico y especie de <i>Shigella</i> spp.....	33
Tabla 10. Efectividad de CIP, AMC, CRO, CN y AZM en <i>Shigella</i> spp. mediante ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i>	34
Tabla 11. Frecuencia observada de presencia de <i>bla</i> _{TEM} por especie de <i>Shigella</i> spp.....	38

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Morfología y tinción Gram de <i>Shigella</i> spp.....	16
Imagen 2. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% para el gen <i>bla</i> _{TEM}	35
Imagen 3. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% para el gen <i>gyrA</i>	39

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Datos de concentración y pureza de ADN obtenidos.....	49
Anexo 2. Curvas de absorbancia (10 mm) vs longitud de onda (nm) obtenidas en espectrofotómetro NanoDrop 2000.....	50
Anexo 3. Cálculo de diluciones de ADN.....	50
Anexo 4. Trabajos realizados en preparación PCR y electroforesis.....	51
Anexo 5. Equipos utilizados en revelación de resultados y cuantificación de ADN.....	51
Anexo 6. Estadística empleada mediante Rstudio sobre la presencia del gen <i>bla</i> _{TEM} entre especies.....	52

AGRADECIMIENTO

A Dios, quién guía mis pasos, ilumina mi mente y me brinda la salud necesaria para lograr lo que me he propuesto.

A mi esposa, por no soltar mi mano aún en los momentos más difíciles, donde su apoyo incondicional ha sido vital para seguir adelante frente a los retos que la vida me pone al frente. Gracias por sacar siempre lo mejor de mí, gracias por hacerme día a día alguien mejor no solo en lo profesional, sino sobre todo en lo personal.

A mis padres, quienes con su esfuerzo y dedicación han sabido llevarme por el camino del bien, gracias por sus consejos y enseñanzas a lo largo de mi desarrollo, gracias por su trabajo y sacrificio incansable para brindarme las mejores condiciones para lograr mis sueños. A mi hermana quién con su apoyo y soporte ha sido fundamental para llegar hasta este momento.

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación lo dedico en primer lugar a Dios, que es quien me ha permitido llegar a este momento tan importante en lo que respecta a mi formación profesional, brindándome las oportunidades y sobre todo la salud para alcanzar los objetivos propuestos.

A mi esposa, Ivanna, quién durante mucho tiempo me ha brindado la fuerza y motivación para no desfallecer y seguir intentando hasta llegar al objetivo, quién además con su ejemplo ha sido una guía constante de superación y mejora no solo en lo profesional, sobre todo en lo personal.

A mi familia, donde mis padres Jeanneth y Carlos han sido pilares y ejemplo de superación y constancia frente a los retos que la vida nos pone en frente. A mi hermana quien con su apoyo incondicional ha puesto su granito de arena para empujarme hasta aquí.

RESUMEN EJECUTIVO

Shigella spp. es un agente causal común de enfermedades diarreicas alrededor del mundo, el tratamiento a elección para la shigelosis es mediante la administración de antibióticos, sin embargo, la resistencia que *Shigella* spp. ha desarrollado frente a estos, supone un reto importante frente a la necesidad de encontrar alternativas de tratamiento efectivas. La transmisión de *Shigella* spp. es por vía fecal-oral, sin embargo, la infección puede resultar de la ingesta de alimentos contaminados donde la falta de higiene durante la manipulación puede considerarse un factor de riesgo para la ocurrencia de enfermedad. Así mismo las condiciones no higiénicas durante el sacrificio de los animales, podría constituirse en una de las principales fuentes de contaminación de la carne para consumo humano. En esta investigación, partimos de estudios anteriores donde, a partir de muestras de carne de pollo tomadas de puntos de venta y camales en Ambato, se aislaron e identificaron un total de 17 cepas de *Shigella* spp. y posteriormente se comprobó que algunas de las cepas encontradas, mostraron resistencia marcada principalmente a dos antibióticos: amoxicilina más ácido clavulánico (AMC) y ciprofloxacino (CIP). El objetivo de esta investigación fue comprobar la presencia de un gen de resistencia para cada uno de los antibióticos antes descritos. Para AMC, se buscó el gen *bla*_{TEM} que codifica para una BLEE (β -lactamasa de espectro extendido) de clase A, encontrándose una prevalencia del 23,53%, mientras que para CIP se buscó el gen *gyrA*, que codifica para las subunidades A de la ADN girasa, encontrándose una prevalencia del 100%. Uno de los mecanismos de resistencia para AMC sería la producción de BLEE tipo TEM, mientras que, mutaciones específicas en una pequeña región cerca del inicio del gen *gyrA*, denominada región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR), se ha relacionado ampliamente con la resistencia a CIP en *Enterobacteriaceae*.

Palabras clave: antibióticos, amoxicilina más ácido clavulánico, ciprofloxacino, resistencia, *Shigella* spp.

ABSTRACT

Shigella spp. is a common causal agent of diarrheal diseases around the world. The treatment of choice for shigellosis is the administration of antibiotics. However, the resistance that *Shigella* spp. has developed to these molecules poses a major challenge in the need to find effective treatment alternatives. Transmission of *Shigella* spp. is via the fecal-oral route, however, infection can result from the ingestion of contaminated food where poor hygiene during handling can be considered a risk factor for the occurrence of disease. Likewise, unhygienic conditions during the slaughter of animals could constitute one of the main sources of contamination of meat for human consumption. In this research, we start from previous studies where, from samples of chicken meat taken from points of sale and slaughterhouses in Ambato, 17 strains of *Shigella* spp. were isolated and molecularly identified and some of them, showed marked resistance mainly to two antibiotics: amoxicillin-clavulanate (AMC) and ciprofloxacin (CIP). The aim of this investigation was to verify the presence of a resistance gene for each of the antibiotics described above. For AMC, the *bla*_{TEM} gene was searched for, which encodes for class A ESBL (extended spectrum β -lactamases), finding a prevalence of 23.53%, while for CIP, the *gyrA* gene was searched for, which encodes for the A subunits of DNA gyrase, finding a prevalence of 100%. One of the resistance mechanisms for AMC would be the production of TEM-like ESBLs, while specific mutations in a small region near the start of the *gyrA* gene, called the quinolone resistance determining region (QRDR), have been widely linked to CIP resistance in *Enterobacteriaceae*.

Keywords: antibiotics, amoxicillin plus clavulanic acid, ciprofloxacin, resistance, *Shigella* spp.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Introducción

El concepto de Una Sola Salud se reconoce cada vez más como un enfoque fundamental para abordar aspectos complejos relacionados con la interdependencia entre la salud humana, animal y ambiental. Para proteger la salud humana, la salud y el bienestar animal y la salud ecológica, es importante comprender cómo interactúan los patógenos con genes de resistencia a antibióticos en la interfaz humano-animal (Zinsstag et al., 2005). Una gran cantidad de microorganismos y sus productos se intercambian con frecuencia entre humanos y animales, lo que a su vez puede aumentar la posibilidad de transmisión de patógenos entre especies, genes resistentes a los antibióticos, genes de virulencia, etc. (Qian et al., 2022).

A nivel mundial, la creciente prevalencia de resistencia a los antibióticos en una amplia gama de microorganismos amenaza la salud humana y animal (Wu-Wu et al., 2023), constituyéndose en una preocupación en los campos de la medicina y veterinaria, así como también en la industria alimentaria, debido a que puede verse comprometida la calidad e inocuidad de los alimentos dentro de la cadena de suministro (Nji et al., 2021).

La resistencia a los antibióticos en *Shigella* spp., puede estar mediada por varios mecanismos como: cambios en la permeabilidad de la membrana celular, activación sistémica de bombas de eflujo, degradación de antibióticos por procesos enzimáticos o cambios en proteínas diana resultado de mutaciones específicas (Ranjbar & Farahani, 2019), (Kaur et al., 2024).

1.2. Justificación

El aumento mundial de la población de aves de corral y ganado desde la revolución industrial ha estado estrechamente asociado con un aumento en la prevalencia de infecciones zoonóticas en humanos (Reperant et al., 2012). En Ecuador, la producción de carne de pollo tuvo un leve aumento (3,14%), al pasar de 255 millones de pollos en el 2021 a 263 millones de pollos en el 2022, debido a que la carne de pollo es la fuente de proteína de origen animal más consumida en el país, con un promedio de consumo de 27,31 kilogramos/persona/año donde además se prevé que en 2023 este consumo pueda llegar a 30 kilogramos/persona/año como lo fue en 2019 previo a la pandemia del COVID-19 (CONAVE, 2022). La Shigelosis, causada por *Shigella* spp., se caracteriza por la invasión de las células epiteliales que recubren el colon y el recto y

se constituye en una de las causas más críticas de mortalidad y morbilidad relacionadas con diarrea en todo el mundo (Pakbin, 2021). *Shigella* spp., como agente causante de la disentería bacilar, ha estado implicada en varios brotes transmitidos por los alimentos y el agua (Kotloff et al., 2018). La infección por *Shigella* spp. es en su mayoría una enfermedad autolimitada, se recomiendan antibióticos para reducir el curso clínico de la enfermedad y prevenir la transmisión, sin embargo, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una preocupación emergente en *Shigella* spp. (Sethuvel, 2019). La aparición de *Shigella* spp. multirresistente es una amenaza importante para la salud pública mundial y limitados estudios han investigado la incidencia, la susceptibilidad a los antimicrobianos y la diversidad genética de *Shigella* spp. aislada de productos alimenticios (Pakbin, 2021).

1.3. **Objetivos**

1.3.1. **General**

- Evaluar la antibioresistencia de 17 cepas de *Shigella* spp. y la presencia de genes de resistencia a antibióticos.

1.3.2. **Específicos**

- Evaluar la antibioresistencia a diferentes antibióticos por el método de difusión en agar de 17 cepas de *Shigella* spp. aisladas de carne de pollo que se expende en Ambato.
- Demostrar la presencia de genes de resistencia a los antibióticos en las 17 cepas de *Shigella* spp.
- Identificar los mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos en *Shigella* spp.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

a) ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

La aparición de *Shigella* spp. multirresistente a antibióticos es una amenaza importante para la salud pública. Ahmed y Shimamoto (2014) en su estudio indican haber realizado el primer informe de caracterización molecular sobre resistencia a los antibióticos en *Shigella* spp. aislada de alimentos, donde de un total 1600 muestras (800 productos cárnicos y 800 productos lácteos) recolectadas de diferentes vendedores ambulantes, carnicerías, mercados minoristas y mataderos en Egipto, aislaron 27 cepas de *Shigella* spp de las cuales 24 cepas (88,9%) mostraron fenotipos de resistencia al menos a tres clases de antimicrobianos: estreptomicina (100,0%), kanamicina (95,8%), ácido nalidíxico (95,8%), tetraciclina (95,8%), espectinomicina (93,6%), ampicilina (87,5%) y sulfametoxazol/trimetoprima (87,5%).

Mientras que, Pakbin et al. (2021) realizan un estudio en muestras de alimentos como: ensalada de verduras, carne molida y leche cruda de vaca, donde en un total de 405 muestras obtuvieron una tasa de prevalencia de *Shigella* spp. del 4,44%. En este estudio demostraron que los aislados de *Shigella* spp. eran resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima (83,3%), amoxicilina (66,6%), estreptomicina (66,6%), tetraciclina (61,1%), ampicilina (50%), amoxicilina-ácido clavulánico (50%), azitromicina (50%) y cloranfenicol (50%).

Shahin et al. (2021), evaluaron un total de 1400 muestras de alimentos recolectados en diferentes supermercados, tiendas de vegetales, vendedores ambulantes, carnicerías y camales en Irán (100 alimentos listos para comer, 150 carnes frescas, 150 carnes congeladas, 100 de leche cruda de vaca, 100 quesos nacionales y 650 verduras). Se recuperaron un total de 19 aislados (1,4%) de *Shigella* spp. en los que encontraron resistencia a estreptomicina (100%), tetraciclina (98,5%), amoxicilina (78,9%), cefalotina (68,4%), cefuroxima (52,6%) y ácido nalidíxico (52,6%).

Así mismo, Elkenany et al. (2022), evaluaron un total de 600 productos lácteos (200 muestras de leche cruda, 200 muestras de queso y 200 muestras de yogurt) tomadas de varios supermercados y tiendas de Egipto, donde obtuvieron un total de cuarenta y dos (7%) aislados de *Shigella* spp. En las pruebas de sensibilidad, observaron que el 71,4% de los aislados mostraron patrones de resistencia a tres o más antibióticos. Los autores destacan la resistencia marcada a tetraciclinas (100%), amoxicilina-ácido clavulánico (90,5%) y cefaclor (66,7%).

Salleh et al. (2022), realizan un metaanálisis al respecto de la prevalencia de *Shigella* spp. multirresistente a antibióticos, en este estudio se recopila información durante los años 2010 a 2022 con 63 estudios publicados en distintas bases de datos como Pubmed, Scopus y ScienceDirect. En promedio detallan que la prevalencia de resistencia más alta fue para ciprofloxacina (29,8%) y azitromicina (29,2%), seguidas de ceftriaxona (23,8%), a pesar de su importancia como tratamientos de primera y segunda línea para la shigelosis. Por el contrario, la resistencia a los carbapenémicos, como ertapenem (0,0%), imipenem (0,1%) y meropenem (0,0%), fue casi inexistente entre los 49 antibióticos analizados. La estimación de prevalencia significativamente alta sugiere que *Shigella* spp. multirresistente es una amenaza para la salud pública que merece intervenciones.

Finalmente, en Ecuador, un estudio realizado por Vinueza (2016), se enfocó en el aislamiento de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* a partir de muestras de pollos a edad de sacrificio, sin embargo, no se encuentran estudios realizados en *Shigella* spp.

b) FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA

2.1. *Shigella* spp.

En el año de 1896, Kyoshi Shiga aisló a partir de muestras de heces fecales una bacteria que mostró en ese momento una reacción de aglutinación positiva frente a suero sanguíneo de pacientes que se recuperaban de disentería aguda, a este aislado lo nombró como *Bacillus dysentericus* en el año de 1897 y un año después este nombre cambió por *Bacillus dysenteriae* (Yabuuchi, 2002). En el año 1930 aparece oficialmente por primera vez el nombre del género *Shigella* en el manual de bacteriología determinativa de Bargey (Ahamed y Giri, 2021).

Shigella spp. es el agente etiológico de shigelosis, entre sus principales características se destaca que es un bacilo no formador de esporas, Gram negativo, no móvil, anaerobio facultativo y perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Aslam et al. 2024).

Imagen 1. Morfología y tinción Gram de *Shigella* spp.



Fuente: (Elaboración propia).

Shigella spp. es el tercer patógeno bacteriano más notificado en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Pakbin et al., 2021). Las especies de *Shigella* spp. están estrechamente relacionadas con *E. coli* debido a su homología de ADN (Bacon & Sofos, 2003). Según Ahamed & Giri (2021) *Shigella* spp. y *E. coli* comparten una estructura común de ADN de aproximadamente 3,9 Mb. Adicionalmente, comparten algunas características bioquímicas, así como reactividad cruzada a ciertos anticuerpos específicos, sin embargo, su diferenciación es clínicamente significativa basada en los síntomas expresados por los individuos infectados (Bacon & Sofos, 2003). La relación con *E. coli* es tan estrecha que según Lefèvre et al. (2023) las especies de *Shigella* son linajes especializados de *Escherichia coli* con el potencial de causar infecciones intestinales invasivas en humanos.

2.1.1. Taxonomía

Tabla 1. Taxonomía de *Shigella*

Superreino	Bacteria
Filo	Pseudomonadota
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacterales
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Shigella</i>

Especies	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i> <i>Shigella flexneri</i>
----------	---

2.1.2. Especies

El género *Shigella* se conforma de 4 especies, cada especie representa uno de 4 serogrupos (Aslam et al. 2024), (Pakbin et al. 2021). Cada serogrupo comprende a su vez 1 o más serotipos que muestran características bioquímicas y de virulencia específicas:

- Serogrupo A (*S. dysenteriae*, 12 serotipos)
- Serogrupo B (*S. flexneri*, 6 serotipos)
- serogrupo C (*S. boydii*, 23 serotipos)
- serogrupo D (*S. sonnei*, 1 serotipo)

En países en vías de desarrollo la shigelosis endémica es causada principalmente por *S. flexneri*, mientras que en países industrializados *S. sonnei* se detecta con mayor frecuencia (Aslam et al., 2024). *S. dysenteriae* tipo 1 puede causar disentería bacilar epidémica y pandémica con una forma grave de enfermedad, además es capaz de generar complicaciones potencialmente letales debido a la producción de toxina Shiga (Ahamed & Giri, 2021).

2.1.3. Transmisión

En países desarrollados, la transmisión de *Shigella* spp. se produce principalmente por vía fecal-oral o por contacto directo de persona a persona (Aslam et al., 2024), mientras que en países en vías de desarrollo o poco desarrollados, la transmisión por vía fecal-oral se produce con mayor frecuencia a través de la ingesta de alimentos o agua contaminados (Niyogi, 2005). Según Shi et al. (2014), en aves de corral la transmisión de *Shigella* spp. también se da principalmente por la vía fecal-oral.

Bacterias zoonóticas como *Shigella* spp. se transmiten a los seres humanos a través de la cadena alimentaria (Kaur et al., 2024). Los brotes de *Shigella* spp. transmitidos por los alimentos ocurren principalmente cuando los alimentos se someten a preparación o procesamiento con las manos, se exponen a un proceso térmico insuficiente o si estos se sirven crudos a los consumidores (Pakbin et al., 2021).

2.2. Adquisición de resistencia y mecanismos de transferencia

En bacterias la resistencia a los antibióticos puede ser intrínseca si los genes de resistencia se encuentran en su genoma o puede ser extrínseca cuando estos genes se adquieren desde una fuente externa a través del intercambio genético (Wu-Wu et al., 2023).

Las dos vías principales de transferencia de genes son la transferencia vertical, que se realiza desde células madre a células hijas a través de la replicación, y la transferencia horizontal, que es la transferencia de genes entre diferentes células a través de elementos móviles (Lorenzo-Díaz et al., 2017).

Existen tres mecanismos de transferencia horizontal de genes: transformación, transducción y conjugación (Lorenzo-Díaz et al., 2017). La transformación implica la importación e incorporación de ADN exógeno al genoma a través de recombinación homóloga, la transducción es la introducción de ADN extraño por un vector viral (bacteriófago) que infecta la célula bacteriana y la conjugación implica el contacto físico entre células donadoras y receptoras, este mecanismo permite la transmisión de ADN de gran tamaño y se considera el principal mecanismo de transmisión de genes de resistencia (Wu-Wu et al., 2023).

La transferencia de genes de resistencia es comúnmente mediada por plásmidos (Wu-Wu et al., 2023), sin embargo, también pueden transmitirse por elementos transponibles o propagarse por integrones (Hall, 2007). Los elementos transponibles son secuencias móviles que pueden insertarse en varios sitios del genoma y causar mutaciones o deleciones, mientras que los integrones son elementos genéticos ubicados en casetes de genes que pueden reorganizarse en diferentes marcos de lectura abiertos (Wu-Wu et al., 2023).

2.3. Mecanismos de resistencia

Los cuatro mecanismos principales de resistencia en *Shigella* spp son: 1) limitación de la absorción del fármaco debido a cambios en la permeabilidad de membrana, 2) modificación del objetivo del fármaco debido a mutaciones específicas, 3) inactivación del fármaco debido a la sobreexpresión de enzimas y 4) extrusión del fármaco por medio de bombas de eflujo activas (Wu-Wu et al., 2023), (Ranjbar & Farahani, 2019).

2.3.1. Cambios en la permeabilidad de la membrana

La membrana externa de las bacterias Gram negativas es muy eficaz en impedir el ingreso de antibióticos al interior celular debido a su composición por fosfolípidos y

polisacáridos que forman una bicapa lipídica asimétrica (Prajapati et al., 2021). Los lipopolisacáridos y lipooligosacáridos son responsables de la característica hidrófoba de la membrana y los antibióticos, así como las sales biliares pueden ser bloqueados, sin embargo, compuestos hidrófilos como la ampicilina o amoxicilina pueden cruzar la membrana gracias a proteínas transmembrana conocidas como canales de porina (Bertani & Ruiz, 2018). Se ha observado baja abundancia de canales de porina en *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenémicos (Fagoonee & Pellicano, 2019), así como en *Klebsiella pneumoniae* resistente a β -lactámicos y fluoroquinolonas (Kaur et al., 2024).

2.3.2. Modificación del objetivo mediante mutación

Las fluoroquinolonas actúan inhibiendo dos enzimas involucradas en la síntesis de ADN bacteriano: la ADN girasa y la topoisomerasa IV (Blondeau, 2004). La resistencia a las fluoroquinolonas se debe principalmente a mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes que codifican para las subunidades de la ADN girasa y topoisomerasa IV y es un mecanismo conservado entre varios patógenos entéricos como *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli* y *Campylobacter* (Wallace et al., 2020). Las subunidades correspondientes para la ADN girasa y la topoisomerasa IV son *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, codificadas por genes que se identifican con el mismo nombre, respectivamente (Ranjbar & Farahan, 2021). La mayoría de estas mutaciones se generan entre los codones 67 y 107 de *gyrA*, siendo más común según distintos estudios en los codones 83 y 87 (Ranjbar & Farahani, 2019). Las mutaciones en el gen *gyrA* son mucho más frecuentes que las mutaciones en el gen *gyrB* (Azmi, 2014).

2.3.3. Inactivación del antibiótico

Existen dos vías por las cuales las bacterias inactivan los antibióticos: la degradación directa del fármaco y la transferencia de un grupo químico al fármaco que altera su estructura y funcionalidad (Wu-Wu et al., 2023).

La degradación de los fármacos está mediada principalmente por enzimas como las β -lactamasas, que son responsables de la resistencia a los β -lactámicos. Estas enzimas impiden la interacción entre el objetivo y el antibiótico modificando los sitios de unión de este último (Blair et al., 2014).

La inactivación de antibióticos por transferencia de grupos químicos utiliza comúnmente grupos fosforilo, acetilo y adenilo a través de transferasas. Una de las modificaciones más comunes es la acetilación, que se utiliza contra aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptograminas y fluoroquinolonas (Wu-Wu et al., 2023). Otros mecanismos como la fosforilación y la adenilación se utilizan principalmente contra aminoglucósidos (Hall, 2007).

2.3.4. Extrusión por medio de bombas activas de eflujo

Las bombas de eflujo activas desempeñan un papel importante en la resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas y en la expulsión de compuestos tóxicos del interior celular (Ranjbar & Farahani, 2019). Las cinco superfamilias de transportadores de eflujo bacterianos son: la superfamilia de casetes de unión a ATP (ABC), la superfamilia de facilitadores principales (MFS), la superfamilia DMT que contiene la familia de resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR), la superfamilia de exportadores MOP (la familia de extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos (MATE)) y la superfamilia RND, que es responsable de la resistencia, la nodulación y la división celular (Kumar et al., 2020).

- Familia de transportadores ABC

La familia de eflujo ABC incluye sistemas de captación y eflujo. Esta familia transporta aminoácidos, fármacos, iones, polisacáridos, proteínas y azúcares utilizando ATP como fuente de energía y se han relacionado con la resistencia a las tetraciclinas y fluoroquinolonas (Van Bambeke et al., 2000).

- Familia de transportadores MATE

La familia de eflujo MATE utiliza gradientes de Na^+ como fuente de energía. La función principal de esta familia es mover colorantes catiónicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Reygaert, 2018).

- Familia de transportadores SMR

La familia de eflujo SMR utiliza la fuerza protón-motriz (H^+) como energía. Son hidrófobas y efluyen principalmente cationes lipofílicos. Esta familia se ha relacionado con la resistencia a los β -lactámicos y algunos aminoglucósidos (Van Bambeke et al., 2000).

- Familia de transportadores MFS

La familia de eflujo MFS está relacionada con el transporte de aniones, metabolitos y azúcares y se han considerado en el desarrollo de resistencia a la eritromicina,

cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas y trimetoprima (Reygaert, 2018).

- Familia de transporte RND

La familia de transporte RND cataliza el eflujo de sustratos que está ampliamente distribuido en bacterias gramnegativas, se ha involucrado en el eflujo de antibióticos, detergentes, colorantes, metales pesados, solventes y otros sustratos (Wu-Wu et al., 2023).

El sistema AcrAB-TolC es un complejo tripartito que comprende TolC (canal de membrana externa), AcrB (proteína transportadora de membrana interna) y AcrA periplásmica, que participa en el ensamblaje y mantenimiento de estas dos proteínas integrales de membrana, este complejo pertenece a la familia de transporte RND se ha asociado con el eflujo de quinolonas siendo uno de los factores responsables del desarrollo de resistencia en *Shigella* spp. (Ranjbar & Farahani, 2019).

2.4. Shigelosis

La enfermedad se caracteriza por colitis inflamatoria aguda y diarrea sanguinolenta (Killackey et al., 2016). Las manifestaciones clínicas de la shigelosis suelen comenzar entre 1 y 4 días después de la exposición (Aslam et al. 2024).

Shigella spp. puede sobrevivir en condiciones ácidas, de esta manera puede pasar por el estómago y llegar al intestino. Posteriormente multiplicarse en el intestino delgado y entrar al colon, donde la mucosa colónica es el sitio elegido para el desarrollo de la enfermedad (Aslam et al. 2024).

Las especies de *Shigella* spp. pueden producir hasta 3 enterotoxinas diferentes que pueden agravar el curso de la enfermedad: ShET1, ShET2 y la toxina Shiga (Stx). ShET1 es producida con mayor frecuencia por *S. flexneri* y es codificada cromosómicamente, mientras que ShET2 puede encontrarse en cualquier especie y es codificada por plásmido de virulencia. La toxina Shiga es el principal factor de virulencia producido por *S. dysenteriae* tipo 1 (Aslam et al. 2024).

La shigelosis se ha constituido en una de las causas más críticas de mortalidad y morbilidad relacionadas con diarrea a nivel mundial, se estima que anualmente 55.000 muertes y 110.000 hospitalizaciones se atribuyen a esta enfermedad en niños menores de cinco años, niños mayores y adultos en todo el mundo (Bennish y Ahmed, 2020). Según colaboradores GBD (2018), la shigelosis en 2016 se constituyó en la segunda causa principal de muerte por diarrea en todo el mundo, con más de 200.000 muertes

al año, siendo superada únicamente por la enfermedad causada por rotavirus.

En los Estados Unidos, la shigelosis es la causa más común de gastroenteritis bacteriana y causa 500.000 casos, 100.000 hospitalizaciones y 500 muertes al año, donde el 77% de los casos son causados por *S. sonnei* (Hines et al. 2018). Los brotes de shigelosis no se han asociado con algún alimento en específico, se ha documentado de brotes a partir del consumo de leche, ensaladas, carne de pollo, mariscos y otros productos (ICMSF, 1996).

2.5. Carne de pollo

Los animales de producción como las aves de corral son un reservorio importante de patógenos zoonóticos, aunque normalmente la carne proveniente de animales sanos contiene muy pocos o ningún microorganismo, esta puede contaminarse durante el sacrificio de los animales si existe contacto directo de la carne con el contenido intestinal, durante su procesamiento por medio de manipuladores infectados o con higiene deficiente y durante su transporte y/o distribución (Moawad et al., 2018), (Bantawa et al., 2019), (Nataro et al., 2011).

En Ecuador, la carne de pollo es la proteína de origen animal más consumida, durante el 2023 cada persona consumió en promedio un total de 30,14 kilogramos al año, siendo este registro el más cercano al observado en el año 2019 (30,62 kg/persona/año) previo a la pandemia del COVID-19 (CONAVE, 2024).

Debido a la preferencia en Ecuador de consumo de esta proteína, según CONAVE (2024) en el año 2023 se registró el valor más alto de producción de pollos de engorde (292 millones) así como carne de pollo producida (549 toneladas métricas) desde el año 2016, lo que evidencia un crecimiento sostenido en cuanto a demanda y consumo de carne de pollo en el Ecuador.

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de investigación

Esta investigación es de tipo experimental con enfoque cualitativo.

3.2. Población o muestra

Un total de 17 aislados de *Shigella* spp. identificados molecularmente y conservados en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

3.3. Prueba de Hipótesis - pregunta científica – idea a defender

H0: No existe presencia de genes de resistencia a los antibióticos en cepas de *Shigella* spp. aisladas en carne de pollo que se expende en Ambato.

H1: Si existe presencia de genes de resistencia a los antibióticos en cepas de *Shigella* spp. aisladas en carne de pollo que se expende en Ambato.

3.4. Recolección de información

3.4.1. Ubicación

La presente investigación se realizó en el laboratorio de biología molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicado en el cantón Cevallos de la provincia de Tungurahua, campus Querochaca, latitud 1° 24' 0" S, longitud 78° 35' 0" W y altitud de 2940 m.s.n.m.

3.4.2. Características del lugar

Tabla 2. Características climatológicas del cantón Cevallos

Parámetro	Valor/Descripción
Clima	Ecuatorial mesotérmico seco
Temperatura anual promedio, °C	12 a 20
Precipitación media anual, mm	500 a 750
Velocidad promedio viento, km/h	2

Fuente: (GAD Municipal Cevallos, 2016).

3.4.3. Materiales y equipos

Tabla 3. Materiales y equipos

Materiales de laboratorio	
Probeta de 500 ml	Frascos autoclavables con tapa
Probeta de 100 ml	Portaobjetos
Cajas Petri	Cubreobjetos
Tubos Falcon 15 ml	Papel kraft
Papel aluminio	Guantes de nitrilo
Tijeras	Cofias
Tubos de ensayo	Mandil
Gradilla tubos ensayo	Mascarilla
Gradilla tubos Eppendorf	Asas de siembra
Mechero Bunsen	Papel toalla
Puntas de micropipeta 20-200 µl	Tubos Eppendorf
Puntas de micropipeta con filtro 0,5-10 µl	Tubos PCR
Puntas de micropipeta 100-1000 µl	Molde y peine de gel agarosa
Equipos	
Autoclave	Balanza semianalítica
Plancha magnética de calentamiento	Termociclador
Centrífuga para tubos Falcon 10000 RPM	Transiluminador
Microcentrífuga para Eppendorf 20000 RPM	Cámara de electroforesis
Baño maría	Fuente de poder
Micropipeta de 0,5 a 10 µl	Microscopio óptico
Micropipeta de 20-200 µl	Incubadora
Micropipeta de 100-1000 µl	Refrigerador
Termobloque	Congelador
Vórtex	Espectrofotómetro NanoDrop 2000
Horno microondas	Computador
Reactivos	
Agua destilada	Etanol absoluto 200 proof (Fisher BioReagents)
Agua ultrapura libre de nucleasas	GoTaq® Green Máster Mix (Promega)
Agarosa (TopVision, Thermo Scientific)	Marcador de peso molecular (Applied Biological

	Materials Inc, Cat. No. G016)
Agar Tripticaseína de Soya (TSA) (Condalab)	Primers específicos (Macrogen)
Caldo infusión cerebro corazón (BHI broth) (TM media)	Safeview Classic (Applied Biological Materials Inc, Cat. No. G108)
Proteinasa K 20 mg/ml (Zymo Research)	Ultrapure Buffer TAE 10X (Invitrogen)
Solución SDS 20%	Solución saturada NaCl 6M
Solución de Cristal violeta	Solución de Lugol
Solución de alcohol-cetona	Solución de safranina

3.4.4. Factores de estudio

Tabla 4. Genes de resistencia objetivo

Fármaco	Simbología	Gen de resistencia	Descripción gen de resistencia	Mecanismo de resistencia
Amoxicilina + ácido clavulánico	AMC	<i>bla_{TEM}</i>	Codifica para BLEE (β -lactamasas de espectro extendido, clase A), enzimas capaces de hidrolizar antibióticos β -lactámicos	Inactivación del antibiótico
Ciprofloxacina	CIP	<i>gyrA</i>	Codifica para las subunidades A de la ADN girasa, objetivo de acción de fluoroquinolonas	Modificación del objetivo mediante mutación

3.4.5. Activar cepas de *Shigella* spp.

Las 17 cepas de *Shigella* spp. se encontraron conservadas en tubos Eppendorf con glicerol al 15% en una temperatura de -20°C. Las cepas que ya fueron identificadas molecularmente requieren activarse para las siguientes etapas de esta investigación.

3.4.6. Preparación de agar tripticaseína de soya (TSA) y siembra

El agar TSA es un medio de cultivo de uso general, utilizado para el cultivo y aislamiento de microorganismos fastidiosos y no fastidiosos. Como fuente de nitrógeno utiliza dos peptonas obtenidas a partir de hidrólisis de proteínas de soya y caseína, además, la inclusión de cloruro de sodio en su formulación tiene el fin de suministrar los electrolitos esenciales para el equilibrio osmótico bacteriano.

La preparación se realizó siguiendo los pasos a continuación:

- Todos los materiales se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
- Se pesaron 40 gramos de medio de cultivo por cada litro de solución a preparar.
- Se esterilizó el medio de cultivo hidratado durante 15 minutos a 121 °C.
- Se dispensó un aproximado de 25 ml del medio de cultivo por cada caja Petri estéril.
- Se dejó enfriar hasta que solidifique.
- Se envolvió en papel aluminio y se refrigeró hasta el momento de la siembra.

(Condalab, 2022)

La siembra se realizó por estriado de cada una de las 17 cepas de *Shigella* spp. tomando con asa estéril un aproximado de 10 µl de inóculo. Las cajas Petri inoculadas se incuban boca abajo a 37°C por 24 horas.

3.4.7. Tinción Gram

- Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomó con asa estéril una pequeña cantidad de cultivo a partir de cada caja Petri.
- Se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos limpio y sobre esta se realizó una extensión del cultivo tomado con el asa de siembra.
- Se dejó secar por aproximadamente 5 minutos.
- Se cubrió durante 1 minuto con solución cristal violeta, posteriormente se lavó con agua destilada el exceso.
- Se cubrió durante 1 minuto con solución de Lugol, posteriormente se lavó con agua destilada el exceso.
- Se cubrió durante 10 segundos con solución de alcohol cetona, posteriormente se lavó con agua destilada el exceso.
- Se cubrió durante 1 minuto con solución de safranina, posteriormente se lavó con agua destilada el exceso.
- Se dejó secar y finalmente se observó al microscopio.

3.4.8. Preparación de caldo cerebro-corazón (BHI broth) y siembra

El caldo infusión cerebro corazón es un medio de cultivo altamente nutritivo y tamponado que favorece el crecimiento de microorganismos exigentes y no exigentes, incluidas bacterias aeróbicas y anaeróbicas (TM media, 2014).

La preparación se realizó siguiendo los pasos a continuación:

- Todos los materiales necesarios se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.
- Se pesaron 37 gramos de medio de cultivo por cada litro de solución a preparar.
- Se esterilizó el medio de cultivo hidratado durante 15 minutos a 121 °C.
- Se dispensaron 12 ml de medio de cultivo en tubos Falcon previamente esterilizados.
- Se dejó enfriar hasta el uso.

(TM media, 2014)

Una vez listo el caldo de cultivo, se siembra con ayuda de asa estéril cada cepa desde la caja Petri correspondiente. Posteriormente los tubos Falcon se incubaron por 24 horas a 37 °C.

3.4.9. Extracción salina de ADN

Se utilizó el protocolo de extracción adaptado de Aljanabi y Martinez (1997), mismo que se describe a continuación:

- Una vez transcurrido el tiempo de incubación del paso anterior, los tubos Falcon con cultivo enriquecido se sometieron a centrifugación por 15 minutos a 3000 RPM.
- Se eliminó el sobrenadante.
- Se re suspendió el pellet con 500 µl de caldo infusión cerebro corazón estéril.
- Se homogenizó bien y se trasladó cada dilución a tubos Eppendorf estériles.
- Se agregaron 40 µl de solución de SDS 20% en cada tubo Eppendorf.
- Se añadieron 8 µl de solución de proteinasa K en concentración de 20 mg/ml en cada tubo Eppendorf.
- Se homogenizaron bien todos los tubos y se llevaron a incubación por una hora a 65°C en termo bloque.
- Posteriormente se añadieron 300 µl de solución saturada de cloruro de sodio (NaCl 6M).
- Se llevó a centrifugación por 30 minutos a 10000 RPM.
- Se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos Eppendorf estériles.
- Se añadió un volumen 2,5 veces superior de etanol absoluto (200 proof) al volumen obtenido en cada tubo Eppendorf.
- Se homogenizaron bien los tubos y se llevaron a incubación durante toda la noche a -20°C.

- Una vez transcurrido el tiempo detallado, se centrifugaron los tubos a 10000 RPM durante 20 minutos.
- Se realizó un lavado adicional en el que se añadieron 300 µl de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 10000 RPM por 20 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- Finalmente, se re suspendió el pellet obtenido en 300 µl de agua ultrapura libre de endonucleasas.
- Los tubos re suspendidos fueron bien homogenizados y se almacenaron en congelación a -20°C hasta su uso.

3.4.10. Determinación de pureza y concentración obtenida de ADN

La determinación de pureza y concentración de ADN obtenida en cada uno de los tubos Eppendorf se realizó por mediciones en espectrofotómetro NanoDrop 2000.

Para esta determinación, se tomaron 4 µl de cada tubo Eppendorf previamente homogenizado y se colocó en el pocillo de lectura del equipo. Posteriormente, se obtienen los valores por medio del software propio del equipo que funciona en un computador conectado a este. Los valores obtenidos se detallan en el Anexo 1.

3.4.11. PCR de punto final o convencional.

Las condiciones de PCR utilizadas, así como sus referencias se detallan a continuación:

Tabla 5. Condiciones PCR utilizadas

Gen	Primers	Amplicón (pb)	D. Prim.	Amplificación (35 ciclos)			Ext. final	Referencia
				D. Sec.	Alineamiento	Ext.		
<i>bla_{TEM}</i>	F-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA R-GACAGTTACCAATGCTTAATC	1080	94°C 10 min	94°C 30 seg	50°C 30 seg	72°C 1 min	72°C 10 min	Ahmed y Shimamoto (2015)
<i>gyrA</i>	F-TGGATTATGCGATGTCGGTCAT R-TTTTGGCGTCAACTCCACTTC	696	95°C 3 min	95°C 45 seg	56°C 45 seg	72°C 90 seg	72°C 10 min	Das et al. (2023)

Ambas amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, el contenido por reacción se detalla a continuación:

- 12,5 µl de GoTaq® Green Master Mix (400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM MgCl₂) (Promega)
- 1 µl de cada primer (10 pmol/µl)
- 1,5 µl de MgCl₂ (10 mM)
- 7 µl de agua ultrapura libre de endonucleasas

- 2 µl de ADN (200 ng/µl)

3.4.12. Electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de PCR obtenidos en ambos genes se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE. Las condiciones de la fuente de poder fueron de 80V durante aproximadamente de 45 minutos.

En el gel de agarosa al 1,5% se incorporó 10 µl de SafeView Classic (10.000 X) por cada 100 ml de gel reconstituido como agente intercalante para la visualización de bandas en transiluminador.

3.4.13. Revelación de resultados

Los resultados se visualizaron en un transiluminador BIORAD Gel Doc XR+, las imágenes se obtuvieron a partir del software del equipo conectado a un computador.

3.5. Procesamiento de la información y análisis estadístico:

Fase 1: Determinación de sensibilidad de cada cepa de *Shigella* spp. a azitromicina (AZM), ceftriaxona (CRO), amoxicilina + ácido clavulánico (AMC), ciprofloxacina (CIP) y gentamicina (CN), donde la Sensibilidad (S) o Resistencia (R) será la variable de respuesta, acorde a lo especificado por la CLSI.

Tabla 6. Tamaño de halos de inhibición según la CLSI

Antibiótico	Halos de inhibición (mm)		
	Sensible (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)
Amoxicilina + ácido clavulánico (20/10 µg)	≥ 18	14-17	≤ 13
Azitromicina (15 µg)	≥ 16	11-15	≤ 10
Ceftriaxona (30 µg)	≥ 23	20-22	≤ 19
Ciprofloxacina (5 µg)	≥ 26	22-25	≤ 21
Gentamicina (10 µg)	≥ 18	15-17	≤ 14

Fuente: (CLSI, 2023)

Estos datos al ser cualitativos, se los analiza por medio de pruebas no paramétricas como Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney, considerando un nivel de significancia del 95%, utilizando el paquete SPSS 26.0.

Fase 2: Demostración de presencia de genes de resistencia frente a los antibióticos a los que más resistencia se determinó en la fase 1: amoxicilina + ácido clavulánico

(AMC) y ciprofloxacina (CIP).

Estos datos al ser de naturaleza nominal binaria (presencia/ausencia) se sometieron a un análisis no paramétrico sobre el gen *bla*_{TEM}. Se utilizó una prueba Chi cuadrado complementada con el test exacto de Fisher con el objetivo de encontrar diferencias significativas en cuanto a la presencia de este gen entre las 3 especies de *Shigella* spp. utilizando programación en RStudio.

Adicionalmente se realiza el cálculo del porcentaje de prevalencia de cada gen en los 17 aislados de *Shigella* spp. utilizando Microsoft Excel.

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se realiza la interpretación de los resultados obtenidos en las dos fases de la investigación. A continuación, se detalla la clave de identificación de cada cepa.

Tabla 7. Clave de identificación de las cepas de *Shigella* spp.

ID muestra	Especie	Cepa
S1	<i>S. flexneri</i>	ATCC 29903
S2	<i>S. sonnei</i>	Uyi_30
S3	<i>S. sonnei</i>	Uyi_30
S4	<i>S. sonnei</i>	Uyi_30
S5	<i>S. sonnei</i>	Uyi_30
S6	<i>S. sonnei</i>	SE6-1
S7	<i>S. sonnei</i>	Uyi_30
S8	<i>S. dysenteriae</i>	1657
S9	<i>S. sonnei</i>	ATCC 29930
S10	<i>S. sonnei</i>	ATCC 29930
S11	<i>S. dysenteriae</i>	1657
S12	<i>S. flexneri</i>	ATCC 29903
S13	<i>S. sonnei</i>	ATCC 29930
S14	<i>S. flexneri</i>	ATCC 29903
S15	<i>S. flexneri</i>	ATCC 29903
S16	<i>S. flexneri</i>	T87
S17	<i>S. sonnei</i>	1915

Según un estudio realizado por Karimi-Yazdi et al. (2020) en Irán, la especie más prevalente en ser aislada tanto de muestras clínicas como de alimentos es *S. sonnei*, esta característica coincide con la prevalencia del 58,82% de *S. sonnei* frente a las otras dos especies aisladas: *S. flexneri* (29,41%) y *S. dysenteriae* (11,77%). Sin embargo, las prevalencias observadas por especie en este estudio difieren completamente de lo obtenido por Elkenany et al. (2022), donde a partir de muestras de leche cruda y productos lácteos, la especie más prevalente fue *S. dysenteriae*, seguido de *S. flexneri* y la menos prevalente fue *S. sonnei*. Así mismo, la prevalencia por especie del presente estudio difiere de lo observado por Ahmed y Shimamoto (2015), donde la especie más prevalente fue *S. flexneri* y la menos prevalente fue *S. dysenteriae* a partir de muestras de alimentos cárnicos y lácteos en Egipto.

4.1. Evaluación de sensibilidad a los antibióticos

De la primera fase se detallan las mediciones de los halos de inhibición que permite la

clasificación de cada cepa de *Shigella* spp. como sensible, intermedia o resistente a los antibióticos ensayados, de acuerdo con los puntos de corte indicados por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2023) mediante el método de difusión en agar (Kirby Bauer).

Tabla 8. Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Shigella* spp. frente a cinco antibióticos evaluados (AZM, CRO, AMC, CIP y CN).

ID muestra	Especie	Cepa	Media de escala	Sensibilidad <i>in vitro</i> Rangos promedio
S6	<i>S. sonnei</i>	SE6-1	2,6	182,3 ^a
S4	<i>S. sonnei</i>	Uyi_30	2,4	171,8 ^a
S5	<i>S. sonnei</i>	Uyi_30	2,4	171,8 ^a
S1	<i>S. flexneri</i>	ATCC 29903	2,2	155,6 ^{ab}
S8	<i>S. dysenteriae</i>	1657	2,2	155,6 ^{ab}
S12	<i>S. flexneri</i>	ATCC 29903	2	145,1 ^{ab}
S2	<i>S. sonnei</i>	Uyi_30	1,8	128,9 ^{abc}
S3	<i>S. sonnei</i>	Uyi_30	1,8	128,9 ^{abc}
S7	<i>S. sonnei</i>	Uyi_30	1,8	128,9 ^{abc}
S11	<i>S. dysenteriae</i>	1657	1,8	128,9 ^{bc}
S10	<i>S. sonnei</i>	ATCC 29930	1,6	118,4 ^{bc}
S9	<i>S. sonnei</i>	ATCC 29930	1,4	102,2 ^{bc}
S13	<i>S. sonnei</i>	ATCC 29930	1,4	102,2 ^{bc}
S14	<i>S. flexneri</i>	ATCC 29903	1,4	102,2 ^{bc}
S16	<i>S. flexneri</i>	T87	1,4	102,2 ^{bc}
S15	<i>S. flexneri</i>	ATCC 29903	1	75,5 ^c
S17	<i>S. sonnei</i>	1915	1	75,5 ^c

Los valores que comparten letras en la misma columna no difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis complementada con U de Mann Whitney considerando un intervalo de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$).

En la tabla 7 se detalla la media de escala donde aquellos valores cercanos a 3 indican resistencia mientras que los valores cercanos a 1 indican sensibilidad frente a los cinco antibióticos evaluados. La cepa más resistente frente a los cinco antibióticos evaluados es *S. sonnei* SE6-1 y la más sensible es *S. sonnei* 1915. Este resultado coincide con lo obtenido por Ahmed y Shimamoto (2015), donde de un total de 7 cepas de *S. sonnei* aisladas de productos lácteos y cárnicos, 5 presentaron resistencia a varios antibióticos mientras que 2 cepas resultaron sensibles. En ese mismo estudio, se detectó una mayor

prevalencia de *S. flexneri* donde todos los aislados mostraron patrones de resistencia al menos a 3 antibióticos, lo que difiere del resultado obtenido en este estudio ya que varias cepas de *S. flexneri* resultaron sensibles frente a los antibióticos ensayados.

Según el estudio realizado por Pakbin et al. (2021), no se encontraron aislados de *S. dysenteriae* en muestras de alimentos como ensaladas vegetales y carne picada, algo que difiere de los resultados de este estudio, donde se recuperaron 2 cepas de *S. dysenteriae* que además mostraron patrones fenotípicos de resistencia. Por otra parte, de acuerdo con el estudio realizado por Elkenany et al. (2022), *S. dysenteriae* fue la especie más observada partir de muestras de leche y productos lácteos, prevalencia que difiere de lo observado en la presente investigación.

La resistencia por especie y por antibiótico se detalla continuación:

Tabla 9. Resistencia por antibiótico y especie de *Shigella* spp.

<i>S. sonnei</i>	
<i>Antibiótico</i>	<i>Media de escala</i>
CIP	2,6
AMC	2,3
CN	1,6
CRO	1,4
AZM	1,2
<i>S. flexneri</i>	
<i>Antibiótico</i>	<i>Media de escala</i>
CIP	2,6
CRO	1,8
AMC	1,6
CN	1
AZM	1
<i>S. dysenteriae</i>	
<i>Antibiótico</i>	<i>Media de escala</i>
AMC	3
CIP	2
CRO	2
CN	2
AZM	1

En la tabla 9 se detalla de mayor a menor, la resistencia fenotípica observada para cada antibiótico por especie. Se puede observar que es común entre las 3 especies de *Shigella* spp. la resistencia frente a ciprofloxacina (CIP), donde valores de media de escala de 2,6 se observan tanto para *S. sonnei* como para *S. flexneri*. Mientras que el

máximo valor de resistencia (3) se observa para *S. dysenteriae* frente a amoxicilina más ácido clavulánico, seguido de ciprofloxacina con un valor intermedio de 2. Así mismo existe resistencia en *S. sonnei* frente a amoxicilina más ácido clavulánico con un valor medio de escala de 2,3.

Estos resultados difieren de lo observado por Elkenany et al. (2022) donde de un total de 42 aislados de *Shigella* solamente 4 aislados fueron resistentes a CIP, pero coinciden con la alta resistencia que se observó para AMC en *S. sonnei* y *S. dysenteriae*. Alta resistencia frente a AMC también se ha observado en el estudio de Pakbin et al. (2021) en *S. sonnei* y *S. flexneri*.

De acuerdo con Nisa et al. (2022) donde se analizaron muestras clínicas y no clínicas (agua de consumo y leche cruda) se observó una marcada resistencia en aislados de *S. flexneri* frente a AMC con el 88%, mientras que para CIP un 42%, algo que no coincide con lo observado en la presente investigación donde *S. flexneri* muestra alta resistencia frente a CIP y cierta sensibilidad frente a AMC.

Tabla 10. Efectividad de CIP, AMC, CRO, CN y AZM en *Shigella* spp. mediante ensayo de sensibilidad *in vitro*.

Antibiótico	Media de escala	Sensibilidad in vitro Rangos promedio
CIP	2,5	179,26 ^a
AMC	2,1	155,71 ^b
CRO	1,5	114,76 ^c
CN	1,4	106,91 ^c
AZM	1,1	83,35 ^d

Los valores que comparten letras en la misma columna no difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis complementada con U de Mann Whitney considerando un intervalo de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$).

Ahmed y Shimamoto (2015) no evidenciaron resistencia marcada frente a CIP ni AMC entre las 3 especies de *Shigella* spp. siendo una característica que difiere de la presente investigación donde son los dos antibióticos frente a los que más resistencia se observó con una media de escala de 2,5 para CIP y 2,1 para AMC.

Según Lefèvre et al. (2022), donde realizaron un análisis de antibiorresistencia en 7121 aislados de *S. sonnei* recolectadas durante los años 2005 al 2021 en Francia, se evidencia que existe un aumento considerable en cuanto a resistencia frente a

ciprofloxacina y azitromicina, una tendencia que se visualiza desde el año 2015. Esta tendencia concuerda con la alta resistencia que se evidencia para CIP donde la especie más prevalente en ser aislada fue *S. Sonnei* con el 58,82%. Por otra parte, este estudio discrepa en cuanto a la resistencia frente a AZM ya que fue la menor detectada entre los cinco antibióticos evaluados.

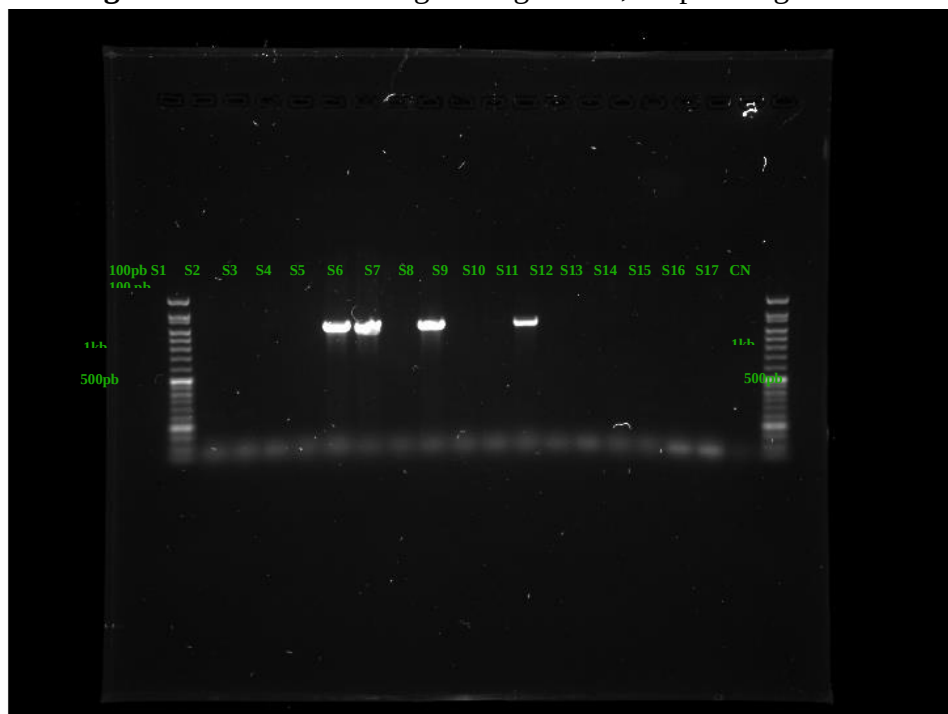
4.2. Presencia de genes de resistencia a los antibióticos

En la segunda fase de esta investigación se detalla la presencia o ausencia de genes de resistencia *bla*_{TEM} y *gyrA* en las 17 cepas de *Shigella* spp utilizadas, donde la visualización de bandas de tamaño esperado de acuerdo con la bibliografía adoptada como referencia, indica la presencia de los genes objetivo en cada cepa.

4.2.1. Gen *bla*_{TEM} (Resistencia a AMC)

Los resultados de la amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa del gen *bla*_{TEM} se muestran en la imagen 2, a continuación:

Imagen 2. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% para el gen *bla*_{TEM}.



En las columnas 1 y 20 se visualiza el marcador de peso molecular, las cepas de *Shigella* spp. se identifican según la clave (S1 a S17) en las columnas 2 a 18. En la columna 19 se incluye un control negativo. El agente intercalante utilizado fue SafeView Classic.

Según se puede observar en la imagen 2, existe presencia de bandas del tamaño

esperado (1080 pb) que corresponden al gen *bla*_{TEM} en las muestras S5 (*S. sonnei* cepa Uyi_30), S6 (*S. sonnei* cepa SE6-1), S8 y S11 (*S. dysenteriae* cepa 1657) (prevalencia del 23,53%) de acuerdo con las referencias adoptadas (Ahmed y Shimamoto, 2015), (Weill et al., 2004).

En el caso de las dos cepas de *S. dysenteriae* (S8 y S11) se obtuvieron los máximos valores de media de escala (3) en la evaluación fenotípica frente a AMC, lo que se correlaciona con la evaluación genotípica en donde ambas cepas de *S. dysenteriae* presentan un resultado positivo para el gen *bla*_{TEM}. Estos resultados coinciden con lo observado por Elkenany et al. (2022) donde de un total de 42 aislados, 38 (90,5%) mostraron patrones de resistencia fenotípica y genotípica frente a AMC observando la presencia del gen *bla*_{TEM} en el 100% en estos aislados.

Por otra parte, *S. sonnei* cepa SE6-1 (S6) tuvo el valor de media de escala más alto entre las 17 cepas utilizadas en esta investigación, seguida de *S. sonnei* Uyi_30 (S5) con una media de escala de 2,4, de esta manera también se correlacionan los resultados de evaluación fenotípica con la evaluación genotípica que muestra un resultado positivo frente a la presencia de *bla*_{TEM} en estas cepas. Según Elkenany et al. (2022), el 100% de aislados de *S. sonnei* proveniente de leche y productos lácteos, también tuvo la presencia de este gen. Los genes que codifican para BLEE presentes en *Shigella* podrían tener su origen a partir de transferencias desde aislados de *E. coli* (especialmente en *S. sonnei*), a través de conjugación en el intestino (Rashid et al., 2014).

4.2.2. Resistencia a AMC debido a producción de BLEE

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) pertenecen a la clase A de Ambler y pueden hidrolizar a las penicilinas. La aparición de BLEE en *Shigella* spp. es una importante amenaza para la salud mundial que afecta tanto a los países desarrollados como a los países en vías de desarrollo (Ranjbar y Farahani, 2019).

En este estudio se evidencia que cuatro cepas de *Shigella* spp. muestran un resultado positivo para *bla*_{TEM} (S5, S6, S8 y S11), por lo que la resistencia a AMC estaría mediada por mecanismos de inactivación del fármaco debido a la sobreproducción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que son enzimas codificadas por genes de las familias TEM, SHV y CTX-M en *Shigella* spp. (Ranjbar & Farahani, 2019). Según Di Conza et al. (2014), la resistencia a AMC parece estar asociada principalmente a la sobreproducción de enzimas TEM-1 (sobre todo en *E. coli*) o coexpresada con β -lactamasas tipo OXA-2 y/o SHV (como en *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*). Esta aseveración también se ha contrastado según Pérez-Moreno et al. (2004) donde además de la sobreproducción de β -lactamasas tipo TEM-1, TEM-2 y SHV-1, otros

mecanismos podrían estar inmersos en la resistencia a AMC como la producción de enzimas tipo OXA, sobre producción de cefalosporinasa *AmpC*, deficiencia de porinas *OmpF* y *OmpC* y producción de β -lactamasas TEM resistentes a inhibidores (IRT). Las β -lactamasas tipo TEM resistentes a inhibidores (IRT) surgen de sustituciones de uno o más residuos de aminoácidos en las posiciones 69, 130, 244, 275 y 276, lo que genera cambios estructurales en la β -lactamasa que afecta principalmente su afinidad a los inhibidores. A diferencia de las β -lactamasas de espectro extendido derivadas de TEM, las β -lactamasas IRT se han observado principalmente en aislados de *E. coli*, pero también se han detectado en *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Shigella sonnei* (Pérez-Moreno et al., 2004).

El gen *bla_{OXA}* ha sido identificado en enterobacterias como *Escherichia coli*, *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. aisladas de muestras de origen humano y animal y se ha encontrado en asociación con otros genes que codifican para BLEE (Poirel et al., 2010). El gen *bla_{OXA}* codifica para BLEE clase D, que son enzimas más resistentes al ácido clavulánico que las BLEE clase A (Di conza et al., 2014), (Ranjbar y Farahani, 2019). Por esta razón una asociación de resistencia común frente a combinación de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas (como AMC) es la presencia y co-expresión de los genes *bla_{OXA}* y *bla_{CTX-M}* (Poirel et al., 2010). Este particular ha sido comprobado en estudios realizados en aislados resistentes a AMC (Di conza et al., 2014), (Ahmed y Shimamoto, 2015).

Los resultados de la presente investigación difieren de lo hallado por Pakbin et al. (2021), donde de un total de 9 aislados de *Shigella* spp. resistentes a AMC, no se identificó en ninguno la presencia del gen *bla_{TEM}*, pero en el 100% de los aislados se observó la presencia de *bla_{SHV}*, un gen que también codifica para BLEE clase A (Ranjbar y Farahani, 2019).

En la presente investigación la presencia del gen *bla_{TEM}* se ha comprobado en aislados de *S. Sonnei* y *S. dysenteriae*, mientras que, ningún aislado de *S. flexneri* mostró un resultado positivo, pese a ser la segunda especie más prevalente del total de 17 aislados después de *S. sonnei*. Cabe mencionar que en la evaluación fenotípica frente a la resistencia a AMC, *S. flexneri* mostró el menor valor de media de escala (1,6) en comparación con los valores de media de escala obtenidos para *S. sonnei* y *S. dysenteriae* (Tabla 8), esto indicaría que la presencia del gen *bla_{TEM}* otorga resistencia a AMC en los aislados de *Shigella* spp. evaluados.

Mediante prueba Chi-cuadrado complementada con la prueba exacta de Fisher y considerando un intervalo de confianza del 95%, en este estudio se ha comprobado diferencia significativa en cuanto a la presencia del gen *bla_{TEM}* entre *S. flexneri* y *S. dysenteriae* ($p < 0,05$), mientras que para las combinaciones *S. sonnei* – *S. dysenteriae*

y *S. sonnei* – *S. flexneri*, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Tabla 11. Frecuencia observada de presencia de *bla*_{TEM} por especie de *Shigella* spp.

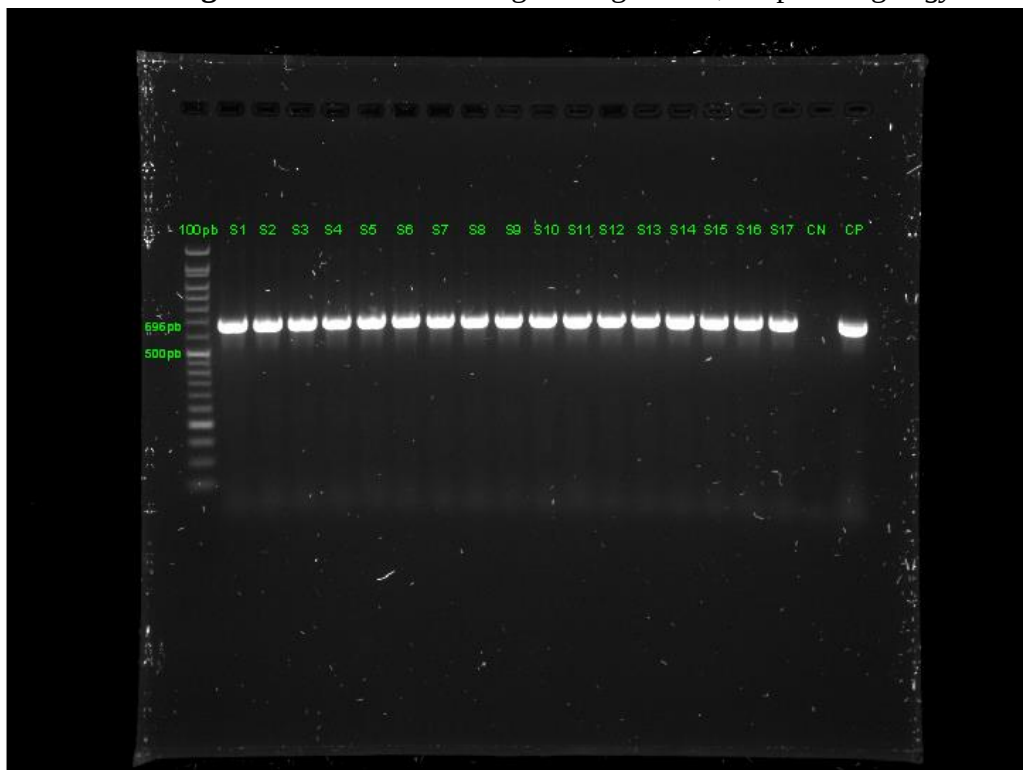
Especie <i>Shigella</i>	Total de aislados	Presencia <i>bla</i>_{TEM} (Frecuencia)
<i>S. dysenteriae</i>	2	2 ^a
<i>S. sonnei</i>	10	2 ^{a,b}
<i>S. flexneri</i>	5	0 ^{b,c}

Los valores que comparten letras en la misma columna no difieren estadísticamente según la prueba de chi cuadrado complementada con la prueba exacta de Fisher considerando un intervalo de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$).

4.2.3. Gen *gyrA* (Resistencia a CIP)

Los resultados de la amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa del gen *gyrA* se muestran en la imagen 3, a continuación:

Imagen 3. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% para el gen *gyrA*.



En la columna 1 se visualiza el marcador de peso molecular, las cepas de *Shigella* spp. se identifican según la clave (S1 a S17) en las columnas 2 a 18, en la columna 19 se incluye un control negativo y en la columna 20 un control positivo (*E. coli* cepa CVM N56338). El agente intercalante utilizado fue SafeView Classic.

Según se puede observar en la imagen 3, existe presencia de bandas del tamaño esperado (696 pb) que corresponden al gen *gyrA* en las 17 cepas de *Shigella* spp. (prevalencia del 100%) empleadas en este estudio, este resultado es esperado ya que el gen *gyrA* codifica para la ADN girasa que se encuentra implicada en el proceso de replicación de ADN durante la división celular en *E.coli* (Das et al., 2023). El uso de una cepa de *E. coli* como control positivo, muestra la homología que tiene este gen con *Shigella* spp., al observarse bandas del mismo tamaño en todos los aislados, indistintamente de la especie.

4.2.4. Resistencia a CIP por mutaciones específicas

La resistencia a las fluoroquinolonas se debe principalmente a mutaciones específicas

en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR), que se encuentra cerca del inicio del gen *gyrA*, entre el codón 67 y 107, algo que se ha evidenciado en varios estudios donde se ha encontrado que la mayor prevalencia de estas mutaciones se genera en los codones 83, 87 y 211 (Ranjbar y Farahani, 2019). Se cree que una simple mutación en el gen *gyrA* puede otorgar resistencia a las quinolonas, sin embargo, más de una mutación en *gyrA* y *parC* se requieren para otorgar resistencia a las fluoroquinolonas (Azmi et al., 2014). El gen *parC* codifica para las subunidades de la topoisomerasa IV donde la mutación más común se evidencia en el codón 80 según varios estudios en aislados de *Shigella* spp. y *E. coli* (Das et al., 2023) (Taneja et al., 2015) (Gu et al., 2017) (Sriyapai et al., 2022). Según Zhu et al. (2017) las tasas de resistencia a las fluoroquinolonas en aislados animales de *S. flexneri* eran más altas que en aislados de humanos.

Según Taneja et al. (2015), donde analizaron cepas de *S. flexneri* y *S. dysenteriae* aisladas de muestras clínicas de pacientes con disentería bacilar, mostraron mutaciones en el gen *gyrA* en los codones 83, donde el cambio más prevalente en el aminoácido codificado fue Ser → Leu, mientras que en el codón 87, el cambio de aminoácido más prevalente fue Asp → Asn, aunque también determinaron (en menor proporción) mutación en el codón 196 con el cambio de Val → Ala. Todos los aislados que expresaron estas mutaciones mostraron un perfil de alta resistencia fenotípica frente a CIP con una concentración mínima inhibitoria superior a 32 µg/ml.

Así mismo, según Lefèvre et al. (2023), en aislados de *S. sonnei* recolectados durante el período comprendido entre los años 2005 a 2021 en Francia, que revelaron perfiles de resistencia fenotípica frente a ciprofloxacina muestran en común la presencia de mutaciones específicas en *gyrA* en los codones 83 (Ser → Leu), 87 (Asp → Asn/Gly) y en *parC* 80 (Ser → Ile), sin embargo, también identificaron aislados que mostraron mutaciones en *gyrA* 83 (Ser → Ile) y 87 (Asp → Tyr). Esta observación entra en concordancia con lo observado por Gu et al. (2017), donde las mutaciones específicas en *gyrA* en los codones 83 (Ser → Leu) y 87 (Asp → Asn/Gly) fueron prevalentes en aislados de *S. sonnei*, resistente a fluoroquinolonas, acompañadas en ciertos aislados de mutaciones en *parC* en los codones 80 (Ser → Ile), 86 (Met → Trp) y 129 (Ser → Pro).

De acuerdo con Sriyapai et al. (2022), donde de un total de 253 aislados de *Shigella* spp. a partir de muestras clínicas recolectadas durante los años 2011 al 2018, 4 aislados resultaron resistentes a CIP de acuerdo con el perfil fenotípico observado mostraron mutaciones específicas en los codones 83 (Ser → Leu) y 87 (Asp → Tyr) del gen *gyrA*. En un solo aislado también se encontró mutación en el codón 80 (Ser → Ile) del gen *parC*.

Según Das et al. (2023), donde se analizaron 287 aislados de *E. coli* provenientes de pollos aparentemente sanos, humanos y medio ambiente que mostraron perfiles fenotípicos de resistencia a ciprofloxacina, mostraron mutaciones en la región QRDR específicamente en los codones 83 (Ser → Leu) y 87 (Asp → Asn/Gly), sin embargo, mutaciones en los codones 56, 57, 78, 80 y 84 del gen *parC* también se observaron.

4.2.5. Resistencia a CIP por genes de resistencia mediados por plásmidos

La presencia de genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (PMQR) como aquellos de la familia *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qep*, *aac[6']-lb-cr*), también se determinaron en aislados que mostraron únicamente una o dos mutaciones en la región QRDR del gen *gyrA*, lo que indicaría que la presencia de mutaciones acompañada de genes PMQR, confiere resistencia frente a ciprofloxacina. (Ranjbar y Farahani, 2019).

Los genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos podrían facilitar la selección de aislados que exhiben niveles más altos de resistencia a través de mecanismos codificados extra cromosómicamente y confieren una susceptibilidad reducida a las quinolonas y/o fluoroquinolonas (Zhu et al., 2017). Esta característica se ha observado en estudios en China donde los genes más prevalentes fueron *qnrS* y *aac[6']-lb-cr* en cepas de *S. flexneri* (Qin et al., 2017), (Pu et al., 2015). El gen *qnrS* se ha asociado con resistencia a fluoroquinolonas en *S. Sonnei* según estudios realizados por Zhang et al., 2019 y Lefèvre et al. (2023).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES, BIBLIOGRAFÍA, ANEXOS.

5.1. Conclusiones

- Se ha comprobado que varias cepas de *Shigella* spp. aisladas de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato muestran patrones de resistencia fenotípica a los antibióticos ensayados, destacándose la marcada resistencia observada frente a amoxicilina + ácido clavulánico y ciprofloxacina, además se ha comprobado la presencia de los genes de resistencia *bla*_{TEM} y *gyrA*.
- Varias cepas de *Shigella* spp. aisladas de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato muestran patrones de resistencia fenotípica frente a amoxicilina + ácido clavulánico y ciprofloxacina determinado por el método de difusión en agar y acorde a los valores especificados por la CLSI.
- Se ha demostrado la presencia de los genes *bla*_{TEM} y *gyrA* como determinantes de resistencia que estos otorgan frente a amoxicilina + ácido clavulánico y ciprofloxacina, respectivamente.
- Uno de los mecanismos moleculares de resistencia frente a AMC es la sobreproducción de β -lactamasas de espectro extendido clase A (BLEE) tipo TEM, enzimas que inactivan a los fármacos β -lactámicos por medio de reacciones de hidrólisis, mientras que uno de los mecanismos moleculares de resistencia a CIP sería la modificación del objetivo de las fluoroquinolonas debido a mutaciones específicas en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) en el gen *gyrA*, lo que impediría la acción del fármaco para evitar la replicación de ADN durante la división celular.

5.2. Recomendaciones

- Ampliar la búsqueda de otros genes relacionados con resistencia a AMC debido a la producción de β -lactamasas de espectro extendido como *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} y *bla*_{CTX-M}.
- Ampliar la búsqueda de genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos (PMQR) relacionados con la resistencia a CIP como *qnrS*, *qnrA*, *qnrB* y *aac(6')-Ib-cr* que facilitan la selección de aislados que expresan mutaciones en las regiones QRDR de los genes *gyrA* y *parC* principalmente.
- Secuenciar los amplificadores del gen *gyrA* de acuerdo con el protocolo de extracción y PCR detallado en esta investigación, con el objetivo de encontrar mutaciones específicas en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR).
- Ampliar la búsqueda de mutaciones en las regiones QRDR de otros genes como *parC* (principalmente), *gyrB* y *parE* que se han reportado en aislados de *Shigella* spp. resistentes a ciprofloxacina.
- Indagar sobre la o las fuentes de contaminación de la carne de pollo durante toda la cadena de suministro, con el objetivo de evitar que patógenos entéricos como *Shigella* spp. puedan causar enfermedades transmitidas por alimentos, algo que se constituye como un serio problema de salud pública debido al desarrollo de resistencia a los antibióticos.

5.3.Bibliografía

- Ahamed, S. K. T y Giri, N. (2021). Shigellosis and Development of Multiple Antimicrobial Resistance Mechanisms of *Shigella* Spp. *Biosci Biotech Res Asia*. 18(4).
- Ahmed, A. M., & Shimamoto, T. (2015). Molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* spp. of food origin. *International journal of food microbiology*, 194, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.013>
- Alewy Almashhadany, D. (2021). Meat Borne Diseases. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.97391
- Aljanabi, S.M, Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res*. 25(22), 4692-3. doi: 10.1093/nar/25.22.4692. PMID: 9358185; PMCID: PMC147078.
- Aslam, A., Hashmi, M. F., & Okafor, C. N. (2024). Shigellosis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Azmi, I. J., Khajanchi, B. K., Akter, F., Hasan, T. N., Shahnaiz, M., Akter, M., Banik, A., Sultana, H., Hossain, M. A., Ahmed, M. K., Faruque, S. M., & Talukder, K. A. (2014). Fluoroquinolone resistance mechanisms of *Shigella flexneri* isolated in Bangladesh. *PloS one*, 9(7), e102533.
- Bacon RT, Sofos JN (2003) Characteristics of Biological Hazards in Foods, In: Schmidt RH, Rodrick GE, Editors, *Food Safety Handbook*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 157–195.
- Bantawa, K., Sah, S. N., Subba Limbu, D., Subba, P., & Ghimire, A. (2019). Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Vibrio* isolated from chicken, pork, buffalo and goat meat in eastern Nepal. *BMC research notes*, 12(1), 766. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4798-7>
- Bertani, B., Ruiz, N. (2018). Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal* 8, 1–33. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0001-2018>.
- Blair, J. M., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future microbiology*, 9(10), 1165–1177. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.66>
- Christopher, J., Ikuta, L. K. S., Sharara, F., Swetschinski, L. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 33rd ed.
- Collaborators GBD. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet Infect Dis*. 18 (11):1211–1228. doi:10.1016/S1473-3099(18)30362-1.
- Condalab (2022). *Agar Soja y Trypticaseína (TSA)*. EP/USP/ISO <https://www.condalab.com/medios-de-cultivo-deshidratados/87-15462-agar-soja-y-trypticaseina-tsa-ep-usp-iso.html>.

- Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador CONAVE. (27 de agosto de 2024). *Estadísticas del sector avícola*. <https://conave.org/informacion-sector-avicola-publico/>.
- Das, T., Nath, C., Das, P., Ghosh, K., Logno, T. A., Debnath, P., Dash, S., Devnath, H. S., Das, S., & Islam, M. Z. (2023). High prevalence of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from chickens, humans and the environment: An emerging one health issue. *PloS one*, 18(11), e0294043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294043>
- Di Conza, J. A., Badaracco, A., Ayala, J., Rodríguez, C., Famiglietti, A., & Gutkind, G. O. (2014). β -lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant enterobacteria isolated in Buenos Aires, Argentina: a new *bla*_{TEM} gene. *Revista Argentina de microbiología*, 46(3), 210–217. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70075-6](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70075-6)
- Fagoonee, S., Pellicano, R. (2019). *Helicobacter pylori*: molecular basis for colonization and survival in gastric environment and resistance to antibiotics. A short review. *Infect. Dis. (Auckl.)*, 51, 399–408. <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1588472>.
- Founou, L. L., Founou, R. C., & Essack, S. Y. (2016). Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in microbiology*, 7, 1881. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>
- GAD Municipal Cevallos (17 noviembre 2016). *Plan de Ordenamiento y Desarrollo Territorial (PDOT)*. <https://www.cevallos.gob.ec/index.php/component/phocadownload/category/170-plan-de-#>
- Gu, B., Qin, T. T., Fan, W. T., Bi, R. R., Chen, Y., Li, Y., & Ma, P. (2017). Novel mutations in *gyrA* and *parC* among *Shigella sonnei* strains from Jiangsu Province of China, 2002-2011. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 59, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.023>
- Hall R. M. (1997). Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Foundation symposium*, 207, 192–205. <https://doi.org/10.1002/9780470515358.ch12>
- Hines, J. Z., Jagger, M. A., Jeanne, T. L., West, N., Winkvist, A., Robinson, B. F., Leman, R. F., & Hedberg, K. (2018). Heavy precipitation as a risk factor for shigellosis among homeless persons during an outbreak - Oregon, 2015-2016. *The Journal of infection*, 76(3), 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.11.010>
- ICMSF (1996) *Micro-organisms in Foods 5, Characteristics of Microbial Pathogens*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Karimi- Yazdi, M., Ghalavand, Z., Shabani, M., Houri, H., Sadredinamin, M., Taheri, M., & Eslami, G. (2020). High rates of antimicrobial resistance and virulence gene

distribution among *Shigella* spp. isolated from pediatric patients in Tehran, Iran. *Infection and Drug Resistance*, 13, 485.

- Kaur, K., Singh, S., Kaur, R. (2024). Impact of antibiotic usage in food-producing animals on food safety and possible antibiotic alternatives, *The Microbe*, 4, 100097, ISSN 2950-1946, <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100097>.
- Killackey, S. A., Sorbara, M. T., & Girardin, S. E. (2016). Cellular Aspects of *Shigella* Pathogenesis: Focus on the Manipulation of Host Cell Processes. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 38. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00038>
- Kotloff, K. L., Riddle, M. S., Platts-Mills, J. A., Pavlinac, P., & Zaidi, A. K. M. (2018). Shigellosis. *The Lancet* (London, England), 391(10122), 801–812. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33296-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33296-8)
- Kumar, S., Lekshmi, M., Parvathi, A., Ojha, M., Wenzel, N., Varela, M.F. (2020). Functional and structural roles of the major facilitator superfamily bacterial multidrug efflux pumps. *Microorganisms*, 8. <https://doi.org/10.3390/>
- Lefèvre, S., Njamkepo, E., Feldman, S., Ruckly, C., Carle, I., Lejay-Collin, M., Fabre, L., Yassine, I., Frézal, L., Pardos de la Gandara, M., Fontanet, A., & Weill, F. X. (2023). Rapid emergence of extensively drug-resistant *Shigella sonnei* in France. *Nature communications*, 14(1), 462. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36222-8>
- Lorenzo-Díaz, F., Fernández-López, C., Lurz, R., Bravo, A., & Espinosa, M. (2017). Crosstalk between vertical and horizontal gene transfer: plasmid replication control by a conjugative relaxase. *Nucleic acids research*, 45(13), 7774–7785. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx450>
- Moawad, A. A., Hotzel, H., Neubauer, H., Ehricht, R., Monecke, S., Tomaso, H., Hafez, H. M., Roesler, U., & El-Adawy, H. (2018). Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* from healthy broilers in Egypt: emergence of colistin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Gut pathogens*, 10, 39. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0266-5>
- Nisa, I., Haroon, M., Driessen, A., Nijland, J., Rahman, H., Yasin, N., Hussain, M., Khan, T. A., Ali, A., Khan, S. A., & Qasim, M. (2022). Antimicrobial Resistance of *Shigella flexneri* in Pakistani Pediatric Population Reveals an Increased Trend of Third-Generation Cephalosporin Resistance. *Current microbiology*, 79(4), 118. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02805-9>
- Niyogi S. K. (2005). Shigellosis. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 43(2), 133–143.
- Nji, E., Kazibwe, J., Hambridge, T., Joko, C. A., Larbi, A. A., Dampsey, L. A. O., Nkansa-Gyamfi, N. A., Stålsby Lundborg, C., & Lien, T. Q. (2021). High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. *Scientific reports*, 11(1), 3372. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82693-4>

- Pakbin, B., Amani, Z., Allahyari, S., Mousavi, S., Mahmoudi, R., Brück, W. M., & Peymani, A. (2021). Genetic diversity and antibiotic resistance of *Shigella* spp. isolates from food products. *Food science & nutrition*, 9(11), 6362–6371. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2603>
- Pérez-Moreno, M.O., Katargina, O., Pérez-Moreno, M., Carulla, M., Rubio, C., Jardí, A.M., Zaragoza, J. (2004). Mechanisms of reduced susceptibility to amoxycillin-clavulanic acid in *Escherichia coli* strains from the health region of Tortosa (Catalonia, Spain). *Clinical Microbiology and Infection*. 10(3), 234–241. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00766.x>
- Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 24–38. <https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>
- Prajapati, J. D., Kleinekathöfer, U., & Winterhalter, M. (2021). How to Enter a Bacterium: Bacterial Porins and the Permeation of Antibiotics. *Chemical reviews*, 121(9), 5158–5192. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01213>
- Pu, X. Y., Pan, J. C., Zhang, W., Zheng, W., Wang, H. Q., & Gu, Y. M. (2015). Quinolone resistance-determining region mutations and the plasmid-mediated quinolone resistance gene qnrS played important roles in decreased susceptibility to fluoroquinolones among *Shigella* isolates in southeast China between 1998 and 2013. *International journal of antimicrobial agents*, 45(4), 438–439. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.12.004>
- Qian, J., Wu, Z., Zhu, Y., & Liu, C. (2022). One Health: a holistic approach for food safety in livestock. *Science in One Health*, 1, 100015. <https://doi.org/10.1016/j.soh.2023.100015>
- Qin, T., Qian, H., Fan, W., Ma, P., Zhou, L., Dong, C., Gu, B., & Huo, X. (2017). Newest data on fluoroquinolone resistance mechanism of *Shigella flexneri* isolates in Jiangsu Province of China. *Antimicrobial resistance and infection control*, 6, 97. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0249-1>
- Rashid, H., & Rahman, M. (2015). Possible transfer of plasmid mediated third generation cephalosporin resistance between *Escherichia coli* and *Shigella sonnei* in the human gut. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 30, 15–18. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.023>
- Reperant, L.A., Cornaglia, G., Osterhaus, A.D. (2012). The Importance of Understanding the Human–Animal Interface. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 365. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/82_2012_269
- Reygaert W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, 4(3), 482–501.
- Salleh, M. Z., Nik Zuraina, N. M. N., Hajissa, K., Ilias, M. I., Banga Singh, K. K., & Deris, Z. Z. (2022). Prevalence of Multidrug-Resistant and Extended-Spectrum Beta-

- Lactamase-Producing *Shigella* Species in Asia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 11(11), 1653. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111653>
- Sethuvel, D. P. M., Perumalla, S., Anandan, S., Michael, J. S., Ragupathi, N. K. D., Gajendran, R., Walia, K., & Veeraraghavan, B. (2019). Antimicrobial resistance, virulence & plasmid profiles among clinical isolates of *Shigella* serogroups. *The Indian journal of medical research*, 149(2), 247–256. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2077_17
 - Shahin, K., Bouzari, M., Wang, R., & Yazdi, M. (2019). Prevalence and molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* species of food origins and their inactivation by specific lytic bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, 108252. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.10825
 - Shi, R., Yang, X., Chen, L., Chang, H. T., Liu, H. Y., Zhao, J., Wang, X. W., & Wang, C. Q. (2014). Pathogenicity of *Shigella* in chickens. *PloS one*, 9(6), e100264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100264>
 - Soto, J, A. (2024). *Evaluación de antibiorresistencia de cepas de Shigella spp. aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato].
 - Sriyapai, T., Pulsrikarn, C., Chansiri, K., & Sriyapai, P. (2022). Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporin and fluoroquinolone resistance genes in *Salmonella* and *Shigella* isolated from clinical specimens in Thailand. *Heliyon*, 8(12), e12383.
 - Taneja, N., Mishra, A., Kumar, A., Verma, G., & Sharma, M. (2015). Enhanced resistance to fluoroquinolones in laboratory-grown mutants & clinical isolates of *Shigella* due to synergism between efflux pump expression & mutations in quinolone resistance determining region. *The Indian journal of medical research*, 141(1), 81–89. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.154508>
 - Tillotson, G (2018). A crucial list of pathogens. *Lancet Infect Dis* 18(3):234–236
 - TM MEDIA. (2019a). Brain heart infusion broth. <https://www.tmmedia.in/wp>
 - Van Bambeke, F., Balzi, E., & Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic efflux pumps. *Biochemical pharmacology*, 60(4), 457–470.
 - [Vinueza, C. \(2017\)](#). *Salmonella and Campylobacter in broilers at slaughter age: a possible source for carcasses contamination in Ecuador*. [Tesis doctoral, Ghent University].
 - Weill, F. X., Demartin, M., Tandé, D., Espié, E., Rakotoarivony, I., & Grimont, P. A. (2004). SHV-12-like extended-spectrum-beta-lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *Journal of clinical microbiology*, 42(6), 2432–2437. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2432-2437.2004>
 - World Health Organization (27 de febrero de 2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*.

<https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

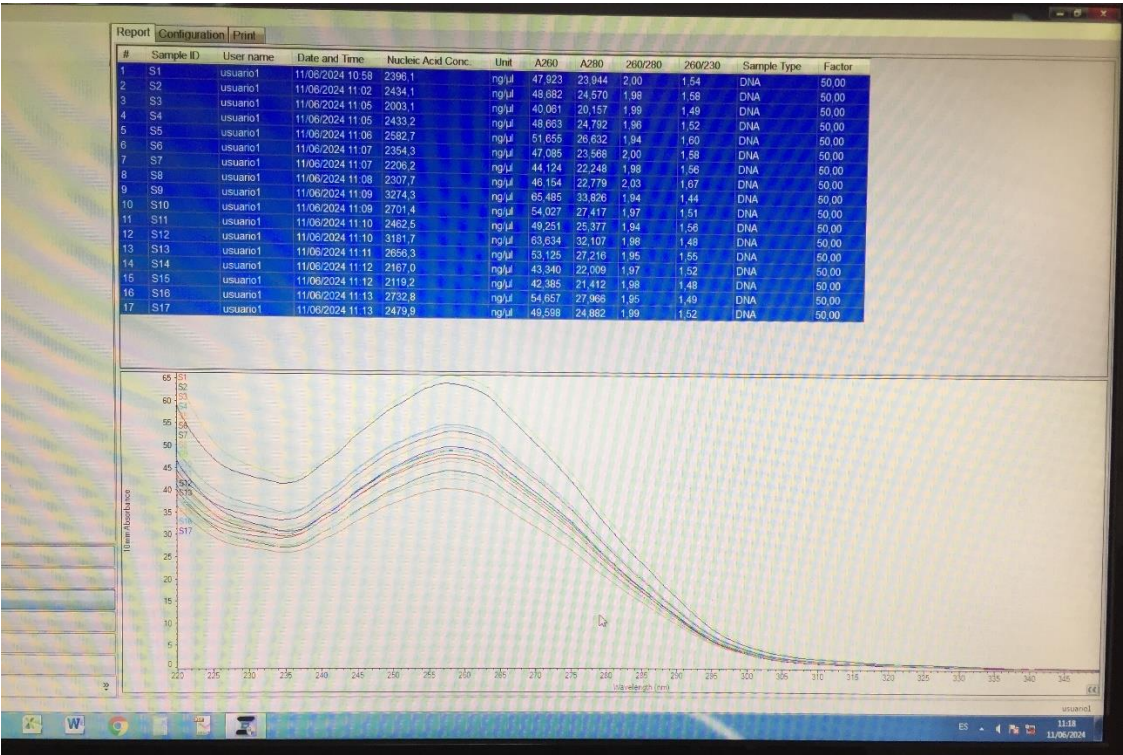
- World Health Organization. (1 de abril de 2014) *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>
- Wu-Wu, J. W. F., Guadamuz-Mayorga, C., Oviedo-Cerdas, D., & Zamora, W. J. (2023). Antibiotic Resistance and Food Safety: Perspectives on New Technologies and Molecules for Microbial Control in the Food Industry. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(3), 550.
- Yabuuchi E. (2002). *Bacillus dysentericus* (sic) 1897 was the first taxonomic rather than *Bacillus dysenteriae* 1898. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(Pt 3), 1041.
- Zhang, W. X., Chen, H. Y., Tu, L. H., Xi, M. F., Chen, M., & Zhang, J. (2019). Fluoroquinolone Resistance Mechanisms in *Shigella* Isolates in Shanghai, China, Between 2010 and 2015. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 25(2), 212–218. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0113>
- Zhu, Z., Cao, M., Zhou, X., Li, B., & Zhang, J. (2017). Epidemic characterization and molecular genotyping of *Shigella flexneri* isolated from calves with diarrhea in Northwest China. *Antimicrobial resistance and infection control*, 6, 92. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0252-6>
- Zinsstag, J., Schelling, E., Wyss, K., & Mahamat, M. B. (2005). Potential of cooperation between human and animal health to strengthen health systems. *Lancet (London, England)*, 366(9503), 2142–2145.

5.4. Anexos

Anexo 1. Datos de concentración y pureza de ADN obtenidos

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
2	1	S1	usuario1	11/06/2024 10:58:26	2396,1	ng/μl	47,923	23,944	2	1,54	DNA	50
3	2	S2	usuario1	11/06/2024 11:02:07	2434,1	ng/μl	48,682	24,57	1,98	1,58	DNA	50
4	3	S3	usuario1	11/06/2024 11:05:04	2003,1	ng/μl	40,061	20,157	1,99	1,49	DNA	50
5	4	S4	usuario1	11/06/2024 11:05:55	2433,2	ng/μl	48,663	24,792	1,96	1,52	DNA	50
6	5	S5	usuario1	11/06/2024 11:06:31	2582,7	ng/μl	51,655	26,632	1,94	1,6	DNA	50
7	6	S6	usuario1	11/06/2024 11:07:19	2354,3	ng/μl	47,085	23,568	2	1,58	DNA	50
8	7	S7	usuario1	11/06/2024 11:07:50	2206,2	ng/μl	44,124	22,248	1,98	1,56	DNA	50
9	8	S8	usuario1	11/06/2024 11:08:26	2307,7	ng/μl	46,154	22,779	2,03	1,67	DNA	50
10	9	S9	usuario1	11/06/2024 11:09:05	3274,3	ng/μl	65,485	33,826	1,94	1,44	DNA	50
11	10	S10	usuario1	11/06/2024 11:09:42	2701,4	ng/μl	54,027	27,417	1,97	1,51	DNA	50
12	11	S11	usuario1	11/06/2024 11:10:22	2462,5	ng/μl	49,251	25,377	1,94	1,56	DNA	50
13	12	S12	usuario1	11/06/2024 11:10:53	3181,7	ng/μl	63,634	32,107	1,98	1,48	DNA	50
14	13	S13	usuario1	11/06/2024 11:11:27	2656,3	ng/μl	53,125	27,216	1,95	1,55	DNA	50
15	14	S14	usuario1	11/06/2024 11:12:02	2167	ng/μl	43,34	22,009	1,97	1,52	DNA	50
16	15	S15	usuario1	11/06/2024 11:12:30	2119,2	ng/μl	42,385	21,412	1,98	1,48	DNA	50
17	16	S16	usuario1	11/06/2024 11:13:06	2732,8	ng/μl	54,657	27,966	1,95	1,49	DNA	50
18	17	S17	usuario1	11/06/2024 11:13:35	2479,9	ng/μl	49,598	24,882	1,99	1,52	DNA	50

Anexo 2. Curvas de absorbancia (10 mm) vs longitud de onda (nm) obtenidas en espectrofotómetro NanoDrop 2000



Anexo 3. Cálculo de diluciones de ADN

ID MUESTRA	Concentración (ng/μl)	ADN (μl)	AGUA (μl)
S1	2396,1	4,2	45,8
S2	2434,1	4,1	45,9
S3	2003,1	5,0	45,0
S4	2433,2	4,1	45,9
S5	2582,7	3,9	46,1
S6	2354,3	4,2	45,8
S7	2206,2	4,5	45,5
S8	2307,7	4,3	45,7
S9	3274,3	3,1	46,9
S10	2701,4	3,7	46,3
S11	2462,5	4,1	45,9
S12	3181,7	3,1	46,9
S13	2656,3	3,8	46,2
S14	2167	4,6	45,4
S15	2119,2	4,7	45,3
S16	2732,8	3,7	46,3
S17	2479,9	4,0	46,0
Volumen final		50 μl	

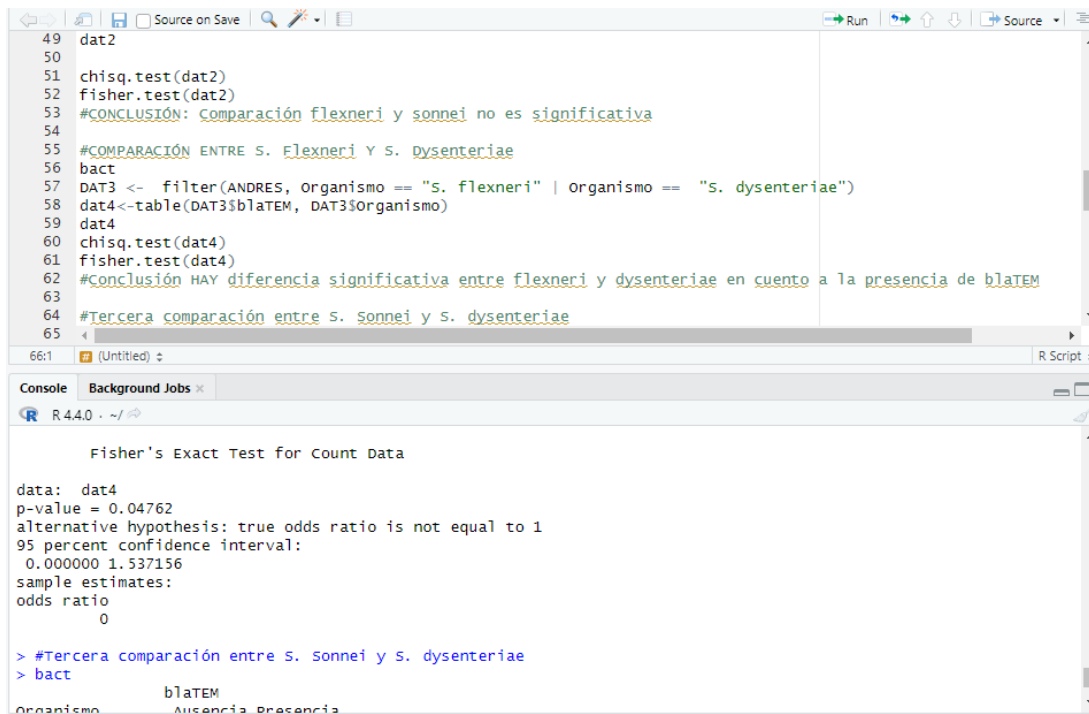
Anexo 4. Trabajos realizados en preparación PCR y electroforesis



Anexo 5. Equipos utilizados en revelación de resultados y cuantificación de ADN



Anexo 6. Estadística empleada mediante Rstudio sobre la presencia del gen *bla*_{TEM} entre especies



```
49 dat2
50
51 chisq.test(dat2)
52 fisher.test(dat2)
53 #CONCLUSIÓN: comparación flexneri y sonnei no es significativa
54
55 #COMPARACIÓN ENTRE S. Flexneri Y S. Dysenteriae
56 bact
57 DAT3 <- filter(ANDRES, Organismo == "S. flexneri" | Organismo == "S. dysenteriae")
58 dat4<-table(DAT3$blaTEM, DAT3$organismo)
59 dat4
60 chisq.test(dat4)
61 fisher.test(dat4)
62 #CONCLUSIÓN HAY diferencia significativa entre flexneri y dysenteriae en cuanto a la presencia de blaTEM
63
64 #Tercera comparación entre S. Sonnei y S. dysenteriae
65 <
```

66:1 (Untitled) R Script

Console Background Jobs

R 4.4.0 - ~/

Fisher's Exact Test for Count Data

data: dat4
p-value = 0.04762
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
0.000000 1.537156
sample estimates:
odds ratio
0

> #Tercera comparación entre S. Sonnei y S. dysenteriae
> bact

	blaTEM
Organismo	Ausencia Presencia