



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**Identificación de genes de virulencia (ipaH) en *Shigella* spp aisladas
de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato**

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MÉDICO VETERINARIO**

AUTOR:

Elizabeth Fernanda Toapaxi Chiquito

TUTOR:

Dra. Sandra Cruz Quintana. PhD

CEVALLOS, 2025

“Identificación de genes de virulencia (ipaH) en *Shigella* spp aisladas de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato”

REVISADO POR:



.....
Dra. Sandra Cruz Quintana. PhD

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

Fecha



Ing. Pedro Pablo Pomboza, PhD.

PRESIDENTE DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....
12/02/2025



Dr. Mg. Kelly Alvear Gerardo Enrique

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....
12/02/2025



Mvz. Mg. Burgos Mayorga Ana Rafaela

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....
12/02/2025

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, **ELIZABETH FERNANDA TOAPAXI CHIQUITO**, portador de cédula de ciudadanía número: **0504457458**, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: **Identificación de genes de virulencia (ipaH) en *Shigella* spp aisladas de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato** es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



ELIZABETH FERNANDA TOAPAXI CHIQUITO

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “**Identificación de genes de virulencia (ipaH) en *Shigella* spp aisladas de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato**” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



ELIZABETH FERNANDA TOAPAXI CHIQUITO

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a mi padre Dios y Virgen del Cisne por brindarme salud y fuerzas día a día para no desistir, que con su bendición hoy puedo estar culminando esta grandiosa carrera. Con profundo respeto y gratitud, coloco mi vida, mi trabajo y mis sueños en sus manos, con la certeza de que siempre estaré bajo su amparo y protección.

A mis padres, Hortensia y Juan, por ser la base de todo lo que soy. Su amor, apoyo y sacrificio han sido la fuerza que me ha impulsado a alcanzar este logro. Gracias por siempre estar a mi lado, por creer en mí incluso cuando las dudas me vencían, y por brindarme no solo su apoyo emocional, sino también la seguridad de que todo esfuerzo tiene su recompensa. Su ejemplo de trabajo, constancia y amor incondicional ha sido mi mayor inspiración y la razón de este éxito.

A mis hermanos, por ser mis consejeros, cómplices y grandes aliados a lo largo de mi vida. Gracias por estar siempre ahí con sus ocurrencias, por sacarme miles de sonrisas y por hacer que la vida nunca fuera monótona. Su apoyo, alegría y cercanía han sido esenciales para superar cada desafío y han hecho de este camino algo mucho más llevadero. Los llevo en mi corazón y agradezco profundamente tenerlos a mi lado en cada paso de esta aventura.

A mi tutora, Dra. Sandrita Cruz, por ser una persona excepcional y una docente ejemplar. Gracias por su generosidad al compartir sus conocimientos y por guiarme con su sabiduría en la realización de este trabajo. Aprecio profundamente su confianza en mí, así como la paciencia y el apoyo que me brindó en cada paso del proceso. Su dedicación y compromiso fueron clave para alcanzar este logro. Estoy muy agradecido por haber tenido la oportunidad de aprender de usted.

Y por último me la dedico a mí, por finalizar una etapa más de mi vida. Elizabeth lo logramos, lo que un día lo veíamos lejano hoy finalmente se hizo realidad.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por ser mi guía y fortaleza en esta travesía. Su luz ha iluminado mi camino, dándome paz y coraje en los momentos difíciles. Gracias, Señor, por permitirme alcanzar este sueño, y en tus manos pongo mi futuro, confiando plenamente en que seguirás orientándome hacia el camino correcto. También quiero agradecer a la Virgen del Cisne, cuya protección y bendición me han acompañado en todo momento. Gracias por darme la fortaleza para superar los desafíos y por interceder siempre en mi favor.

Gracias, mamá y papá, por brindarme su apoyo emocional en todo momento, por estar siempre ahí para escucharme, aconsejarme y ofrecerme su consuelo. Y, de igual manera, por el respaldo económico que ha sido esencial para que pudiera avanzar en mis estudios sin distracciones, y para que pudiera concentrarme en este proyecto que hoy culmina con esta tesis. Por encima de todo, les agradezco por creer en mí, por tener fe en mis capacidades incluso cuando yo mismo dudaba de ellas. Este logro es tan suyo como mío, porque sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible. Los amo y siempre estaré agradecido por todo lo que han hecho y siguen haciendo por mí.

Agradezco profundamente a los docentes de esta Universidad por su dedicación, pasión y compromiso. Su conocimiento ha sido clave en mi formación académica y personal. Gracias a ustedes, he adquirido herramientas para mi futuro profesional y he crecido como persona.

A mis queridos amigos Naty, Elian, Jesse, Marce y al grupito de las ñañas y a todas las personitas que me acompañaron en esta aventura. Gracias por su apoyo, paciencia y por estar siempre a mi lado. Este viaje no hubiera sido el mismo sin su amistad, y siempre estaré agradecida por cada momento compartido. Los recuerdos y experiencias nos mantendrán unidos siempre.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I.....	13
INTRODUCCIÓN	13
MARCO TEÓRICO.....	15
1.1 <i>Antecedentes investigativos</i>	15
1.2 <i>Categorías fundamentales</i>	19
1.2.1 Características generales de <i>Shigella</i>	19
1.2.3 Factores de virulencia	21
1.2.7 Gen IpaH.....	24
1.2.8 Procesamiento de faenamiento de aves	25
1.2.9 Factores que influyen en la contaminación.....	28
1.3 <i>Objetivos</i>	28
1.3.1 Objetivo general.....	28
1.3.2 Objetivos específicos	28
CAPÍTULO II	30
METODOLOGÍA	30
2.1. <i>Ubicación del estudio</i>	30
2.2. <i>Caracterización del lugar.</i>	30
2.3. <i>Equipos y materiales</i>	31
2.3.1. Equipos.....	31
2.3.2. Materiales.....	31
2.3.3. Material de oficinas.....	31
2.3.4 Reactivos.....	32
2.4. <i>Factores de Estudio:</i>	32
2.5. <i>Manejo del experimento</i>	32
2.5.1 Tamaño de la muestra	32
2.5.2 Reacción en cadena polimerasa (PCR).....	33
2.5.3 Electroforesis en gel de agarosa.....	34
2.6. <i>Variables respuestas</i>	35
2.6.1 Cualitativa.....	35

CAPÍTULO III.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1. Descripción de los factores de virulencia presentes en <i>Shigella</i> spp.....	38
3.2 Detección mediante PCR del gen <i>ipaH</i> que promueve invasión a los tejidos relacionando las características, estructura y función de la proteína que codifica.	42
3.3 Relación de los factores de virulencia presentes en <i>Shigella</i> spp con la antibioresistencia y la procedencia de las muestras desde el punto de vista epidemiológico.	54
3.2. Comprobación de la hipótesis.....	59
CAPÍTULO IV.....	60
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	60
4.1. CONCLUSIONES.....	60
4.2. RECOMENDACIONES.....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS	70
Anexo 1. ADN puro de <i>Shigella</i> spp.	70
Anexo 2. Cálculo de dilución de ADN de <i>Shigella</i>	70
Anexo 3. Preparación de la Master Mix	70
Anexo 4. Rotulación de los <i>ependorfs</i> y tubos para PCR.....	71
Anexo 5. Centrifugación de las muestras en el termociclador.....	71
Anexo 6 .Pesaje del agar de tripticasa de soya.....	71
Anexo 7. Gel de agarosa	72
Anexo 8. Muestras corriendo a 100 voltios por una hora en las cámaras de electroforesis	72
Anexo 9. Programa instalado para el gradiente de temperatura	72
Anexo 10. Observación de los geles en el transiluminador de mesa	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Categoría taxonómica de Shigella</i>	20
Tabla 2. <i>Nomenclatura de Shigella</i>	21
Tabla 3. <i>Genes de virulencia conocidos y supuestos en los cromosomas de Shigella.</i>	22
Tabla 4. <i>Genes de virulencia conocidos y supuestos en los plásmidos de virulencia de Shigella</i>	23
Tabla 5. <i>Proteínas del gen de Shigella</i>	24
Tabla 6. <i>Condiciones meteorológicas</i>	30
Tabla 7. <i>Secuencia de los primers para amplificar el gen ipaH</i>	33
Tabla 8. <i>Master Mix para el gen ipaH</i>	34
Tabla 9. <i>Condiciones de la PCR para el gen ipaH</i>	34
Tabla 10. <i>Identificación de las especies y cepas de Shigella</i>	36
Tabla 11. <i>Shigella dysenteriae</i>	38
Tabla 12. <i>Shigella flexneri</i>	39
Tabla 13. <i>Shigella sonnei</i>	40
Tabla 14. <i>Condiciones de la PCR en gradientes de temperatura</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>PCR para amplificar gen ipaH con los primers forward y reverse.</i>	42
Figura 2. <i>PCR para amplificar gen ipaH modificado con los primers forward y reverse.</i>	43
Figura 3. <i>Ilustración de PCR en gradiente de temperatura.....</i>	47
Figura 4 <i>Características de las proteínas codificadas por el gen ipaH en las especies de Shigella spp.</i>	52
Figura 5. <i>Prevalencia de Shigelosis de acuerdo con la MSP en el año 2023.....</i>	54

RESUMEN

La infección por *Shigella* spp. generalmente se contrae al consumir alimentos contaminados, siendo la mala higiene en su manejo un riesgo clave. Asimismo, las condiciones insalubres en el sacrificio de animales pueden ser una fuente importante de contaminación de la carne. Este estudio se centró en la identificación de un gen de virulencia en *Shigella* spp. aisladas de carne de pollo comercializada en el cantón Ambato. De las 17 cepas de *Shigella* utilizadas fueron previamente aisladas e identificadas mediante técnicas moleculares en investigaciones anteriores y se conservaron en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato. En particular, se investigó el gen ipaH, un marcador clave de virulencia de esta bacteria. Para la detección y el análisis de este gen, se emplearon técnicas moleculares avanzadas, entre las cuales se incluyeron la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la electroforesis en gel de agarosa. En primer lugar, se utilizó ADN puro y diluido de *Shigella* spp, previamente extraído de las muestras de carne de pollo, para su posterior amplificación. En la fase de PCR, se empleó un cebador específico diseñado para amplificar la secuencia objetivo correspondiente al gen ipaH, con un tamaño de 423 pares de bases (pb). En conclusión, la revisión de la literatura reveló una notable diversidad de factores de virulencia, y en todas las referencias consultadas se incluye la presencia del gen ipaH. Sin embargo, los resultados obtenidos en la PCR no mostraron amplificación del gen, lo que reflejó un 0% de prevalencia del gen ipaH en los aislamientos de *Shigella* previamente obtenidos de la carne de pollo. Finalmente, según los datos epidemiológicos recopilados en los últimos cinco años, se ha registrado la presencia de shigelosis en Ecuador. En este sentido, es relevante señalar que, tanto en el año 2023 como en la investigación realizada en 2024, no se reporta la existencia de esta enfermedad en la provincia de Tungurahua, ni la presencia del gen relacionado en las cepas aisladas utilizadas para el estudio. No obstante, se observa que dichas cepas continúan circulando en las provincias vecinas.

Palabras clave: gen, virulencia, ipaH, *Shigella* spp, carne de pollo, contaminación alimenticia.

ABSTRACT

Shigella spp. infection is usually contracted by consuming contaminated food, with poor hygiene in handling it being a key risk. Likewise, unsanitary conditions in animal slaughter can be an important source of meat contamination. This study focused on the identification of a virulence gene in *Shigella* spp. isolated from chicken meat marketed in the Ambato canton. Of the 17 *Shigella* strains used, they were previously isolated and identified using molecular techniques in previous research and were kept in the Microbiology and Molecular Biology Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Ambato. In particular, the ipaH gene, a key virulence marker of this bacteria, was investigated. For the detection and analysis of this gene, advanced molecular techniques were used, including the Polymerase Chain Reaction (PCR) and agarose gel electrophoresis. First, pure and diluted *Shigella* spp DNA, previously extracted from chicken meat samples, was used for subsequent amplification. In the PCR phase, a specific primer designed to amplify the target sequence corresponding to the ipaH gene, with a size of 423 base pairs (bp), was used. In conclusion, the literature review revealed a remarkable diversity of virulence factors, and the presence of the ipaH gene is included in all the references consulted. However, the results obtained in the PCR did not show amplification of the gene, which reflected a 0% prevalence of the ipaH gene in *Shigella* isolates previously obtained from chicken meat. Finally, according to epidemiological data collected in the last five years, the presence of shigellosis has been recorded in Ecuador. In this regard, it is relevant to note that, both in 2023 and in the research carried out in 2024, the existence of this disease in the province of Tungurahua is not reported, nor is the presence of the related gene in the isolated strains used for the study. However, it is observed that these strains continue to circulate in neighboring provinces.

Keywords: gene, virulence, ipaH, *Shigella* spp, chicken meat, food contamination.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Actualmente, uno de los alimentos de mayor consumo es la carne de pollo, por su sabor apetecible y la versatilidad en sus diferentes preparaciones. Sin embargo, este alimento puede ser un vehículo de transmisión de infecciones, de ahí la importancia de que se lleven a cabo las buenas prácticas de producción, procesamiento, transporte y sobre todo, en los centros de expendio para su venta.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 600 millones de personas en el mundo se enferman al consumir alimentos contaminados; de estos, 420,000 fallecen por esta causa (OMS, 2024).

La contaminación de productos cárnicos crudos es muy común debido a la presencia de diferentes tipos de microorganismos, como virus, bacterias, hongos y parásitos, que pueden causar enfermedades. De estas, las bacterias son responsables de más del 90% de los casos confirmados de enfermedades transmitidas por alimentos (Zúñiga y Caro, 2017).

Las poblaciones bacterianas que pueden estar presentes en la carne de pollo provienen del tracto gastrointestinal del animal y las que se agregan durante el manejo del ave, desde su sacrificio hasta su venta al público (Vásquez y Tasayco, 2020). En este sentido, hablaremos de *Shigella* spp., una enterobacteria que cuenta con cuatro especies diferentes: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*. Cabe mencionar que cada especie contiene genes virulentos perjudiciales para el consumo humano y se transmite principalmente a través de la vía fecal-oral, siendo el agua de consumo una vía de transmisión significativa (ARCHIPIA, 2018). Tanto aves silvestres como urbanas, así como las moscas, pueden servir como reservorios de esta bacteria (Guerrero et al., 2007).

La presencia de *Shigella* spp. en la carne de pollo plantea una preocupación significativa para la salud pública, dado que puede causar shigelosis, una enfermedad

Infecciosa que se manifiesta con síntomas como diarrea, fiebre, dolor abdominal y, en casos graves, complicaciones serias (Cabral, 2010). Según el **Ministerio de Salud Pública (2022)**, en Ecuador se reportaron 44 casos confirmados de shigelosis en 2022, siendo los niños de 5 a 9 años la población más afectada. Mientras que en 2023, se observó un incremento en la aparición de la enfermedad, con 153 casos; el sexo más afectado fueron los hombres de entre 20 y 49 años (**Ministerio de Salud Pública, 2023**).

Tomando en cuenta lo descrito previamente, la investigación tuvo como propósito identificar los genes de virulencia en *Shigella* spp. aisladas de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato, con el fin de contribuir a la prevención de la salud pública.

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

Se llevó a cabo un estudio que analizó la sensibilidad a los antimicrobianos y la detección de genes de virulencia en cepas clínicas de *Shigella* spp, utilizando un total de 79 muestras recolectadas de Zurita & Zurita Laboratorios y del hospital Vozandes. Mediante serotipificación, se identificaron tres tipos principales: *S. flexneri* (64.6 %), *S. sonnei* (29.1 %) y *S. boydii* (6.3 %). La detección de genes de virulencia se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), encontrando una alta prevalencia de los genes ipaH (91.1 %) e ial (82.3 %), mientras que los genes que codifican la enterotoxina 1 (set1A y set1B) estuvieron presentes en un 35.4 %. Estos resultados indican cepas altamente virulentas (Villacrés et al., 2015).

El propósito de este estudio es detectar la presencia de *Shigella* spp. en carne de pollo comercializada en Ambato a través de diferentes establecimientos. Se recolectaron 135 muestras, distribuidas equitativamente entre locales con licencia de funcionamiento, establecimientos de venta informal y camales que abastecen la ciudad. Se emplearon técnicas fenotípicas para la identificación, incluyendo siembra en medios selectivos, tinción de Gram y TSI. Las muestras sospechosas de contener *Shigella* spp. fueron sometidas a identificación molecular mediante la amplificación de la región 16S del ADN ribosomal, lo que reveló la presencia de *Shigella sonnei* (10 muestras), *Shigella flexneri* (5 muestras) y *Shigella dysenteriae* (2 muestras); no se detectó *Shigella boydii* en ninguna muestra. En conclusión, se identificaron tres especies de *Shigella*, destacándose *S. sonnei* como la más prevalente, especialmente en camales y puntos de venta informales, lo que plantea un potencial problema de salud pública (Peñafiel et al., 2023).

El objetivo de este estudio fue analizar 75 cultivos de *Shigella* spp. aislados de casos de infecciones intestinales, identificados mediante pruebas bioquímicas y serológicas para determinar su serogrupo y serotipo mediante aglutinación en placa. De los 75 cultivos de *Shigella*, 54 fueron de *Shigella flexneri* (72%) y 21 de *Shigella sonnei*

(28%). Dentro de los 54 cultivos de *Shigella flexneri*, el 48,15% correspondió al serotipo 2a, seguido por los serotipos 1b y 6 con el 12,96% cada uno, luego el serotipo 3a con el 11,11%, y finalmente los serotipos 1a, 4b y 2b, con el 5,56%, 5,56% y 3,70% respectivamente. Los serotipos más frecuentes de *Shigella flexneri* encontrados en infecciones intestinales en Lima fueron 2a, 1b, 6, 3a, 1a, 4b y 2b, siendo el 2a el más prevalente, seguido por el 1b y el 6. **(Guerreo et al., 2012).**

El objetivo de este estudio es investigar la distribución de las toxinas ShET1 y ShET2 en dos especies de *Shigella*, *S. flexneri* y *S. sonnei*, aisladas de niños con síntomas de diarrea durante un periodo estival entre 1999 y 2002. Durante este periodo se recolectaron 170 muestras, de las cuales se analizaron 104 cepas (51 de *S. flexneri* y 53 de *S. sonnei*). Se evaluó la presencia de los genes que codifican para las enterotoxinas utilizando la técnica molecular de PCR con cebadores específicos. De las cepas analizadas, 52 (50 %) mostraron la presencia de uno o ambos genes relacionados con estas toxinas. En el caso de *S. flexneri*, 7 cepas (6,7 %) tenían el gen ShET1, 25 cepas (23,9 %) tenían el gen ShET2, y 20 cepas (19,2 %) presentaban ambos genes. En cuanto a *S. sonnei*, 16 cepas (15,3 %) mostraron el gen ShET2 **(Lorca, 2004).**

En este estudio se realizó el aislamiento mediante coprocultivo e identificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Salmonella* y *Shigella* en niños menores de cinco años, además de correlacionar la infección con los factores de riesgo correspondientes. El análisis de las muestras se llevó a cabo en el departamento de Bacteriología del Hospital La Paz. Se recolectaron 50 muestras de materia fecal en recipientes proporcionados por el hospital, de pacientes menores de cinco años seleccionados según síntomas clínicos que sugirieran infecciones bacterianas. Los resultados obtenidos en este estudio confirmaron la presencia de *Shigella* spp. (10%) y *Salmonella* spp. (13%) aisladas de las heces de niños con diarrea mediante cultivo bacteriano. Además, la presencia de estas bacterias se confirmó mediante PCR, encontrando *Shigella* spp. (12%) y *Salmonella* spp. (16%). No se detectaron evidencias de infecciones mixtas entre ambas bacterias **(Calle, 2006).**

El objetivo de esta investigación fue determinar la frecuencia de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. entre los individuos que manipulan alimentos en Huancayo. Para esto, se llevó a cabo un estudio observacional de naturaleza básica, prospectivo y transversal, con un enfoque descriptivo. Se analizaron un total de 24 muestras de superficies de manos y 24 muestras de heces de manipuladores de alimentos pertenecientes a la Asociación de Comerciantes del Mercado "Raez Patiño" (Huancayo), seleccionados mediante un muestreo no probabilístico intencional. Se utilizaron técnicas microbiológicas como el hisopado y la siembra en placas para aislar e identificar enterobacterias a partir de las muestras de superficies corporales y heces. Los datos recopilados para cada tipo de muestra fueron registrados y organizados en un formulario de recolección de datos. Al término del estudio, se encontró una prevalencia promedio del 25,0% para *Salmonella* spp. y del 4,17% para *Shigella* spp., con una distribución similar entre las muestras de manos y heces (Mallma, 2019).

El estudio se realizó con una muestra de 98 habitantes de la comunidad Cerro Real en el Departamento de la Cordillera, Paraguay. Este incluyó la aplicación de una encuesta sobre las condiciones ambientales y los hábitos de las 13 familias participantes, además del análisis microbiológico de posibles fuentes de infección como el agua potable y las excretas. Se identificaron 23 casos de diarrea disintérica, resultando en una tasa de incidencia del 23%. La frecuencia de casos secundarios dentro de las familias de los casos iniciales fue en promedio del 53%. Se observó que el riesgo de padecer diarrea fue significativamente mayor en el grupo de niños menores de 15 años, con una tasa de incidencia del 43%, en comparación con los mayores de esta edad, que presentaron un 6% ($p < 0,01$). En siete de ocho cultivos de heces de los casos de diarrea se detectó la presencia de *Shigella*, perteneciente a los serogrupos *flexneri* (cuatro casos) y *Sonnei* (tres casos). Aunque cada serogrupo mostró un perfil de resistencia diferente, se encontró un patrón similar en todos ellos, lo que sugiere la circulación simultánea de ambos serogrupos en la comunidad. Al investigar la fuente de la epidemia, no se encontraron pruebas de contaminación por *Shigella* en el agua potable ni en las excretas de aves domésticas. No obstante, el 10% de las moscas domésticas analizadas resultaron portadoras de *Shigella flexneri* (Basualdo et al., 1999).

El objetivo de este estudio fue investigar la frecuencia de *Shigella* spp. y determinar los factores relacionados en niños en edad escolar de una comunidad tanto urbana como rural en el departamento de Cajamarca, Perú. Se incluyeron niños de 4 a 14 años inscritos en el colegio Andrés Avelino Cáceres (Baños del Inca) y en el colegio San José de Las Vizcachas (San Pablo). Para la detección de *Shigella* spp., se utilizó la técnica de PCR en tiempo real. La prevalencia de *Shigella* spp. fue del 9.1% en la comunidad rural y del 3.6% en la comunidad urbana. En San Pablo, se encontró que el consumo de ensaladas estaba asociado ($p=0.24$), mientras que en Baños del Inca se asoció con el lavado de manos antes de comer ($p=0.008$). Este estudio destacó una prevalencia más alta de *Shigella* spp. en la comunidad rural, sugiriendo la implementación de medidas preventivas contra esta bacteria y otros agentes patógenos (Rodríguez y Rosa, 2022).

El objetivo de este estudio fue investigar los cambios en la epidemiología de *Shigella* spp. en los últimos cinco años entre la población infantil de Getafe, así como identificar el tipo de *Shigella* spp que conlleva a hospitalización, sus complicaciones y el tratamiento asociado. Se llevó a cabo un estudio descriptivo y retrospectivo mediante la revisión de historias clínicas de pacientes menores de 15 años afectados por shigelosis entre los años 2001 y 2006. Estos pacientes fueron identificados a partir del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Getafe. De los 19 pacientes identificados, solo 4 necesitaron ser hospitalizados. Se identificaron las subespecies de *Shigella* spp. como *S. sonnei* y *S. flexneri*. Los síntomas más frecuentes incluyeron diarrea acompañada de vómitos, dolor abdominal tipo cólico y fiebre elevada. Solo uno de los pacientes presentó complicaciones de deshidratación hiponatrémica. El tratamiento consistió principalmente en medidas sintomáticas, aunque los pacientes hospitalizados recibieron fluidoterapia intravenosa y antibioticoterapia, lo que resultó en la recuperación de la enfermedad (Colmenero et al., 2008).

Se estudiaron 40 cepas de *Plesiomonas shigelloides* procedentes de diversas especies de animales domésticos y de compañía, remitidas a un laboratorio. Mediante el esquema internacional de serotipificación, se identificaron los siguientes tipos serológicos: O94, O84, O35, O29, O34, O23, O22, O17, O11, O9, O3. Se investigaron varios factores de virulencia en las cepas estudiadas, incluyendo la capacidad de

adherencia a hidrocarburos, actividad hemolítica, presencia de exopolisacárido y agregación salina. Se observó que el 62,5% de las cepas mostraban los cuatro factores de virulencia analizados. Al estudiar la relación entre estos factores y los tipos serológicos, se encontró que los más patógenos fueron O94, O23y O84. Se detallan los tipos serológicos que presentan reacciones cruzadas con el género *Shigella*. Se subraya la importancia de que los animales domésticos y de compañía pueden actuar como portadores de *Plesiomonas shigelloides*, lo que podría dar lugar a una zoonosis (Fariñas et al., 2005).

1.2 Categorías fundamentales

1.2.1 Características generales de *Shigella*

El género *Shigella* está incluida en la familia *Enterobacteriaceae*, por ende, es una bacteria gramnegativa. Comparte entre el 70 y el 75% de su ADN con la *E. coli*. Sus dimensiones son aproximadamente 0.7 µm x 3 µm; de igual forma, son estáticas, no generan esporas ni cuentan con cápsula (Mallma, 2019).

La bacteria exhibe una marcada sensibilidad a las condiciones del entorno y se desintegra fácilmente, careciendo de la capacidad para soportar la aplicación de calor y para prosperar en temperaturas de refrigeración (<7°C). No obstante, *Shigella* puede proliferar en circunstancias especiales, como cuando los alimentos se exponen a temperaturas elevadas y una humedad relativa baja durante su almacenamiento o transporte. En cambio, muestra una considerable resistencia a niveles bajos de pH, pudiendo subsistir en alimentos con una acidez notable, como ciertas frutas y verduras, así como en productos envasados al vacío o bajo atmósfera modificada. Además, posee la capacidad de sobrevivir en el agua (ARCHIPIA, 2018).

- **Taxonomía**

Tabla 1. *Categoría taxonómica de Shigella*

Superreino	Bacteria
Filo	<i>Pseudomonadota (proteobacteria)</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria(g-proteobacteria)</i>
Orden	<i>Enterobacterales</i>
Familia	<i>Enterobacteria</i>
Género	<i>Shigella</i>
Especies	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i> <i>Shigella flexneri</i>

Fuente: (NCBI, 2024)

- **Etiología**

En esta clasificación se encuentran cuatro géneros: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, identificadas como serogrupos A, B, C y D, respectivamente. Exceptuando a *S. sonnei*, cada variante comprende diversos serotipos. *S. sonnei* y *S. boydii* generalmente causan afecciones leves, mientras que *S. flexneri* es el agente predominante de la shigelosis endémica en naciones en desarrollo. El serotipo 1 de *S. dysenteriae* (SD1) conlleva enfermedades más severas y prolongadas, ocasionalmente con elevadas tasas de mortalidad (ARCHIPIA, 2018).

Tabla 2. *Nomenclatura de Shigella*

SEROGRUPO	ESPECIES	SEROTIPOS
A	<i>Shigella dysenteriae</i>	15
B	<i>Shigella flexneri</i>	8
C	<i>Shigella boydii</i>	19
D	<i>Shigella sonnei</i>	1

Fuente:(Cabral, 2010).

- **Patogenia**

El género *Shigella* muestra el siguiente proceso patogénico: se une a las células M del colon, donde inicialmente son captadas por las células presentadoras de antígenos y luego invaden los enterocitos. Después de ingresar, se liberan del fagosoma, se reproducen en el citoplasma y se extienden a células adyacentes. El sistema de secreción tipo III, una ruta de translocación de proteínas está diseñado específicamente para las bacterias patógenas gramnegativas (Mallma, 2019).

- **Vías de transmisión**

La infección causada por *Shigella* se transmite por vía oral-fecal. La contaminación de los alimentos ocurre al estar en contacto con heces humanas a través de manos, superficies, utensilios o agua. Los animales domésticos y de granja no son portadores. Las moscas pueden transportar el microorganismo desde las heces hasta los alimentos sin protección adecuada (ACSA, 2017).

1.2.3 Factores de virulencia

El género *Shigella* principalmente provoca enfermedades diarreicas que pueden resultar en complicaciones graves, ya que las distintas especies dentro de este género

poseen factores de virulencia como genes de invasión celular, enterotoxinas y exotoxinas, los cuales afectan de manera significativa al paciente. En casos severos, estas complicaciones pueden desembocar en la muerte (**Villacrés et al., 2015**).

Tabla 3. *Genes de virulencia conocidos y supuestos en los cromosomas de Shigella.*

Gen	Función
stxAB	N-glicosidasa, bloquear la proteína síntesis
set1A, set1B	Secreción de iones
senB	Secreción de iones
pic	Mucínasa
sigA	Secreción de iones
iutA, iucABCD	Adquisición de hierro
iroN, iroBCDE	Adquisición de hierro
sitABCD	Adquisición de hierro
shuA, shuS, shuTWXYUV	Adquisición de hierro
ipaH	
yadA-like	Desconocido
clp-like	Desconocido
IcmF-like	Desconocido
RTX-like	Desconocido
gspC-M	Desconocido

Fuente:(Yang et al., 2005)

Tabla 4. *Genes de virulencia conocidos y supuestos en los plásmidos de virulencia de Shigella*

Gen	Función
mxi-spa	Invasión e internalización
ial	Facilita la internalización e invasión del tejido "blanco" mediante la producción de adhesinas e invasinas, permite la diseminación intercelular de la bacteria, la transferencia y secreción de diversos factores de virulencia
ipaA	Despolimerización de actina
ipaB	Inducir la apoptosis
ipaC	Polimerización de actina, activación de Cdc42 y Rac
ipaD	Formando un complejo con IpaB, controla el flujo de proteínas a través de la secreción tipo III
ipgD	Inositol 4-fosfatasa, ampollas en la membrana
icsB	Camuflar IcsA del sistema de defensa autofágico del huésped
virA	Desestabilización de microtúbulos, erizado de membranas.
ospF/mkaD	Desconocida
ipaH7.8	Facilitar el escape de las bacterias de los fagocitos. vacuola de macrófagos
ipaH9.8	Transportado al núcleo, función desconocida.
ipaH4.5	Desconocida
ipgB	Desconocida
ospG	Desconocida
senA	Secreción de iones
senB	Homólogas de ShET2
icsP/sopA	Escisión de IcsA
sepA	Invasión de tejidos
msbB	Modificación de acilo graso del antígeno O
apy	ATP-difosfohidrolasa
phoN-Sf	Fosfatasa ácida no específica
rfbU	Biosíntesis del antígeno O

Tabla 4. Continuación

ushA	UDP-azúcar hidrolasa (50 nucleotidasa)
virF	Activación de la transcripción de virB e icsA.
virK	Regulación postranscripcional de la expresión de icsA.
virB	Activación de los operones ipa, spa y mxi
icsA/virG	Nucleación de filamentos de actina.

Fuente: (Yang et al., 2005; Villacrés et al., 2015)

1.2.7 Gen IpaH

También conocido como "antígeno H plasmídico de invasión", ha sido encontrado en el 99% de las muestras de *Shigella*, siendo considerado el marcador genético más confiable de detectar debido a su presencia en el cromosoma y en múltiples copias en el ADN plasmídico. El gen tiene 423 pares de bases y codifica una proteína con un peso molecular de 65,3 kDa. La estructura de esta proteína muestra propiedades hidrofílicas y exhibe una región hidrofóbica en un extremo de su superficie, la cual está compuesta por residuos de leucina espaciados (Villacrés et al., 2015).

Tabla 5. Proteínas del gen de *Shigella*

Cromosoma	Plásmido
ipaH0722	ipaH1.4
ipaH0887	ipaH2.5
ipaH1383	ipaH4.5
ipaH1880	ipaH7.8
ipaH2022	ipaH9.8
ipaH2202	
ipaH2610	

Fuente: (Ashida et al., 2007)

- **Estructura**

- Estiramiento N-terminal de 60 a 70 aminoácidos
- Una región repetida rica en leucina (LRR) implicadas en la interacción proteína-proteína.
- Una región intermedia entre corchetes por los LRRs
- La región C-terminal (CTR) conservado restante de 260 residuos de aminoácidos, pero variable (Yang et al., 2005; Ashida et al., 2007)

1.2.8 Procesamiento de faenamiento de aves

- **Recepción de aves**

En el centro de faenamiento, los vehículos que transportan aves son desinfectados y las aves, transportadas en jaulas de plástico, pasan por una inspección ante-mortem. Se espera hasta dos horas para reducir el estrés y asegurar un desangrado óptimo, mientras se controla la temperatura y humedad (Zulma et al., 2018). Los animales con riesgos para el consumo se sacrifican fuera de la línea normal y se les hace seguimiento post-mortem. Las aves en mal estado o en condiciones especiales requieren un faenamiento de emergencia, y está prohibida la matanza de animales enfermos, en mal estado o hembras gestantes (CEER, 2020).

- **Sacrificio y desangrado**

Una vez descargadas de las jaulas, las aves se colocan cabeza abajo en una línea transportadora y se sumergen en un canal de agua con electricidad de voltaje reducido para el aturdimiento (Agrocalidad, 2020). Este proceso debe realizarse en menos de un minuto. En mataderos pequeños, se usa una pistola con perno cautivo para aturdir instantáneamente a las aves. Luego, durante el desangrado, se degüellan las aves sin

quitarles la cabeza y la sangre se recoge en un canal o recipientes especiales (**CEER, 2020**).

- **Escaldado**

Las aves se sumergen en agua caliente, a una temperatura de entre 50° y 60°C, durante 3 minutos para dilatar los folículos de la piel y facilitar la extracción de las plumas en el proceso posterior (**Zulma et al., 2018; CEER, 2020**).

- **Desplumado**

Las plumas de aves se extraen manualmente, recogiendo las plumas en recipientes, o automáticamente con una desplumadora que usa cepillos para arrojarlas a un contenedor. Después del desplumado, se lava el cuerpo del ave para reducir la carga bacteriana (**Zulma et al., 2018**). Para aves acuáticas como patos y gansos, se usa parafina caliente para adherir las plumas, que se retiran manualmente una vez enfriada. Finalmente, se cortan cabezas y patas, que se destinan al consumo humano tras eliminar las partes no comestibles mediante calor y tratamientos mecánicos (**CEER, 2020**).

- **Evisceración**

Sea de forma mecánica o manual, este proceso consiste en la extracción de órganos internos se realiza con una pistola, cortando la cloaca y parte del intestino, que se extraen con cuidado. Los órganos comestibles (mollejas, hígado, corazón, cuello) se limpian y refrigeran, mientras que las patas y cabezas se comercializan según su destino. Los órganos no comestibles (pulmón, páncreas, vesícula biliar, intestino) se utilizan para fabricar harinas (**Zulma et al., 2018; CEER, 2020**).

- **Lavado y enfriamiento**

Las aves faenadas se lavan, desinfectan y escurren junto con el descenso de la temperatura de esta a no más de 7 °C en no más de 90 minutos. **(Zulma et al., 2018)**. El descenso de temperatura se puede lograr colocando las carcasas en un recipiente que las cubra totalmente con agua fría. Los residuos deben ser eliminados inmediatamente luego de terminado el proceso ya que constituyen focos de atracción de los insectos vectores y roedores **(CEER, 2020)**

- **Empaquetado**

Las aves faenadas se almacenan en fundas plásticas de polietileno, con o sin menudencias, y se pesan y etiquetan según las especificaciones comerciales **(CEER, 2020)**.

- **Refrigeración y almacenamiento**

Las aves empacadas se clasifican por peso y se almacenan en gavetas plásticas en cámaras de refrigeración o congelación a menos de 2°C hasta sus distribuciones **(Zulma et al., 2018)**.

- **Limpieza y mantenimiento de las instalaciones**

Al finalizar el faenamiento, se debe limpiar y desinfectar todas las áreas, equipos y herramientas utilizados para asegurar su inocuidad **(CEER, 2020)**.

1.2.9 Factores que influyen en la contaminación

Según CEER (2020) menciona los siguientes puntos de contaminación dentro del proceso de faenamiento de aves:

- **Calidad del agua utilizada:** el agua empleada en los procesos de lavado y enfriamiento debe ser de buena calidad y tratada para evitar la proliferación de microorganismos.
- **Higiene del personal:** en el matadero es fundamental para prevenir la contaminación de las aves con bacterias provenientes de las manos, la ropa o el cabello.
- **Mantenimiento de las instalaciones:** las instalaciones deben estar diseñadas y mantenidas de manera que faciliten la limpieza y la desinfección, y reduzcan al mínimo los puntos de acumulación de suciedad y bacterias.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Identificar genes de virulencia de *Shigella* spp (ipaH) aisladas de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato.

1.3.2 Objetivos específicos

- Describir factores de virulencia presentes en *Shigella* spp.
- Detectar mediante PCR el gen ipaH que promueve invasión a los tejidos relacionando las características, estructura y función de la proteína que codifica.

- Relacionar de forma descriptiva los factores de virulencia presentes en *Shigella* spp con la antibiorresistencia y la procedencia de las muestras desde el punto de vista epidemiológico.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular, que se encuentra en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, en la provincia de Tungurahua. Esta región tiene una extensión de 19,000 kilómetros cuadrados, con coordenadas de latitud 1°21'0", una altitud de 2,885 metros sobre el nivel del mar, y una longitud de 78° 37 '0" (Getamap, 2024).

2.2. Caracterización del lugar.

Tabla 6. *Condiciones meteorológicas*

Indicadores	Parámetros
Temperatura	19-24 °C
Humedad relativa, %	75 %
Altitud, msnm	2865 msnm
Velocidad del Viento Anual	3km/h
Precipitación anual	571.2 mm

Fuente: (Red hidrometereológica de Tungurahua, 2024)

2.3. Equipos y materiales

2.3.1. Equipos

- Termociclador
- Cámaras de electroforesis
- Transiluminador
- Autoclave
- Transformador
- Balanza de precisión
- Cámara de flujo laminar
- Nevera
- Vórtex
- Microondas

2.3.2. Materiales

- Mandil
- Mascarillas
- Mechero Bunsen
- Tubos de PCR 0,2ml
- Papel aluminio
- Juego de micropipetas
- Guantes de nitrilo
- Microtubos volumen 1,5 ml
- Cajas de almacenamiento para Eppendorf
- Gradillas
- Puntas azules, amarillas, blancas

2.3.3. Material de oficinas

- Computadora

- Esferos
- Cinta adhesiva
- Impresora
- Cámara fotográfica
- Cuaderno de apuntes
- Rotulador

2.3.4 Reactivos

- Alcohol
- Primer (fervor y reverso)
- Agarosa
- Buffer TAE
- ADN de *Shigella*
- Marcador peso molecular 100 pares de base
- Sybr safe
- Gotaq master mix de 100 reacciones

2.4. Factores de Estudio:

Genes de virulencia (ipaH) en *Shigella* spp aisladas de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato.

2.5. Manejo del experimento

2.5.1 Tamaño de la muestra

El presente estudio incluyó un total de 17 aislados de *Shigella* spp, los cuales están clasificados en especies siendo estas la *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*. Las mismas fueron colectadas por **Peñafiel et al. (2023)**. Las muestras

provinieron de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato de locales de venta informal y en camales.

2.5.2 Reacción en cadena polimerasa (PCR)

Es una técnica enzimática *in vitro* que permite amplificar de manera masiva una secuencia específica de ADN, mediante ciclos repetidos. Utiliza la enzima ADN polimerasa, que tiene la capacidad de sintetizar ADN en las células. La PCR consta de tres etapas: desnaturalización, anillamiento y extensión. El proceso se realiza en termocicladores, que regulan con precisión la temperatura y el tiempo en cada ciclo. Al concluir, se analizan los productos (amplicones) en geles de agarosa para confirmar el éxito de la amplificación (Tamay et al., 2023).

Tabla 7. *Secuencia de los primers para amplificar el gen ipaH*

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño de pares de base (bp)
ipaH	ipaH –forward	TGGAAAACTCAGTGCCTCT	423
	ipaH – reverse	CCAGTCCGTAAATTCATTCT	

Fuente:(Gu et al., 2019)

1. Reconstituir los primers a un volumen de 600 µl.
2. Diluir los primers 1 en 10 en dos tubos de eppendorf.

Volumen: 45 µl H₂O – 5 µl primer

Total: 50 µl

Tabla 8. Master Mix para el gen *ipaH*

Reactivos	ADN	Go Taq Green	Primer Forward	Primer Reverse	H2O	Volumen final
Volumen	3 µl	0.75 µl	075.µl	12.5 µl	8 µl	25 µl

3. Distribuir 22 µl Master Mix en cada tubo PCR.
4. Añadir 3 µl de ADN en las 17 muestras de *Shigella*.
Control (+): 22 µl
Control (-): 22 µl
5. Vortéx a todas las muestras.
6. Centrifugar la muestra.
7. Utilizar el termociclador con la temperatura y el tiempo adecuado con las condiciones del ADN y del primer utilizado.

Tabla 9. Condiciones de la PCR para el gen *ipaH*

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	30
Desnaturalización	95 °C	50 seg	
Anillamiento	55 °C	45 seg	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	7 min	

Fuente: (Gu et al., 2019)

2.5.3 Electroforesis en gel de agarosa

1. En la balanza analítica de Hous se pesó 1.5 gr de agarosa, esto se incorporó en dos vasos de precipitación con la misma medida.

2. Para la preparación de TAE que se utilizó, se añadió 100 ml 10X conjuntamente con agua destilada hasta completar 1 litro.
3. Una vez la agarosa en los vasos de precipitación, se mezcló con 100 ml de TAE.
4. Con la ayuda del microondas se disolvió el gel esto en un tiempo de 30 a 45 segundos.
5. Diluida la agarosa se debe añadir 10 µl de safe green.
6. Se sello las cubetas con cinta masking para que el gel no se corra por las orillas, previo a esto se añadió en la cubeta, junto con los peines y se dejó que se solidifique a temperatura ambiente.
7. Cuando el gel se solidificó, se desprende los peines y se introduce el gel en las cámaras de electroforesis, dichas cámaras deben estar cubiertas de solución TAE 1X.
8. Con una pipeta, se debe colocar 5 µl del marcador de peso molecular, tanto en los extremos de los pocillos de la cubeta, es decir el primer y último pocillo.
9. Además, en los pocillos restantes con ayuda de la pipeta, se debe colocar 10 µl de cada una de las muestras con un total de 18, es necesario mencionar que se debe cambiar las puntas para que no se dé la contaminación de estas.
10. Se coloca la tapa de la cámara, hay que programar la fuente de energía de acuerdo con el parámetro, en este caso se utilizó 100 volt los mismos que se corrieron por 1 hora.
11. Terminado el tiempo se pasó el gel al transiluminador, esto para visualizar si la banda del ADN se amplificó al tamaño programado de 423 pb.

2.6. Variables respuestas

2.6.1 Cualitativa

Esta investigación es de carácter descriptivo debido a que se describieron los genes de virulencia presentes en cada especie de *Shigella* spp clasificadas en *S. dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. sonnei*. Además de la detección del gen ipaH con la presencia de la banda de 423 pb y relacionarlo con la estructura y función de la proteína que codifica.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de *Shigella* spp. fueron organizadas y enlistadas según su especie y cepa específica, tal como se detalla en la tabla 10. Cada muestra fue identificada con precisión para garantizar un análisis adecuado. La clasificación por especie y cepa permitió un análisis más ordenado y sistemático de los resultados obtenidos durante el estudio.

Tabla 10. Identificación de las especies y cepas de *Shigella*

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>	ATCC 29903
S17	<i>S. sonnei</i>	ATCC 29930

Fuente: (Escobar, 2023)

En la Tabla 10 se presenta un listado de todas las especies de *Shigella* que han sido identificadas en investigaciones anteriores y que, por lo tanto, fueron seleccionadas para ser utilizadas en el presente estudio. De acuerdo con los resultados obtenidos, la especie más predominante en los análisis fue *Shigella sonnei* y en cuanto a la cepa esta correspondió a la ATCC 29930. Sin embargo, es necesario mencionar la no

identificación de la especie *Shigella boydii*, la cual, aunque se había considerado en fases iniciales, no fue detectada en las muestras analizadas.

En la investigación realizada por **Sabour et al. (2022)**, se identificaron un total de 49 aislamientos de *Shigella* a partir de muestras fecales. De estos, 42 correspondieron a *S. sonnei*, 5 a *S. flexneri* y 2 a *S. dysenteriae*. Es importante señalar que en ningún caso se detectó la presencia de *S. boydii* en las muestras analizadas. Asimismo, en el estudio de **Casabonne et al. (2016)** se aislaron 100 cepas de *Shigella*. Entre estas *S. flexneri* se destacó como la más predominante, con un total de 74 casos, mientras que de la *S. sonnei* se presentó con 26 casos. Por otro lado, en el estudio descrito por **Lokamar Nyanga et al. (2017)**, procedieron a aislar 14 aislamientos de *Shigella*, de los cuales 3 resultaron ser *S. boydii*, 2 *S. dysenteriae*, 6 *S. flexneri* y 3 *S. sonnei*. Además, en el estudio de **Sheikh et al. (2019)** obtuvieron 69 aislamientos positivos para *Shigella* spp., de los cuales se identificaron 34 serotipos correspondientes a *S. flexneri*, 22 serotipos fueron identificados como *S. sonnei*, 9 como *S. boydii* y 4 como *S. dysenteriae*.

3.1. Descripción de los factores de virulencia presentes en *Shigella* spp

Tabla 11. *Shigella dysenteriae*

Gen	Peso molecular	Función
IpaD	78 KDa	Formando un complejo con IpaB, controla el flujo de Proteínas a través de la secreción tipo III.
IpaA	38 KDa	Despolimerización de actina
IpaB	62 KDa	Inducir la apoptosis
IpaC	43 KDa	Polimerización de actina, activación de Cdc42 y Rac.
IpaGD	90 KDa	Inositol 4-fosfatasa, ampollas en la membrana
IpaH	30 KDa	Facilita el escape de shigella de la vacuola endocítica
VirG (IcsA)	120 KDa	Nucleación de filamentos de actina
VirA	53 KDa	Desestabilización de microtúbulos, erización de membranas.
Enterotoxina I-II	20 KDa	También conocida como shiga, esta toxina forma parte de un grupo de genes encargados de producir toxinas. La enterotoxina I-II es una citotoxina, lo que significa que daña las células del huésped y desencadena una respuesta inflamatoria.
Toxina shiga	70 KDa	Se libera durante lisis celular (no es secretada por la bacteria se une a un receptor globotriaosil (Gb3) expresado en endotelio intestinal y renal Citotóxica tiende a inactivar a ribosoma 60S y esta causa necrosis celular seguido de ulceración de mucosa intestinal

Fuente: (Mattock y Blocker, 2017)

Tabla 12. *Shigella flexneri*

Gen	Peso molecular	Función
virF	30 KDa	Activación de la transcripción de virB e icsA.
inva (mxiB)	38 KDa	Invasión e internalización
mxiA	76 KDa	Invasión e internalización
ippI	18 KDa	Invasion
ipaB	62 KDa	Inducir la apoptosis
ipaC	43 KDa	Polimerización de actina, activación de Cdc42 y Rac.
ipaA	38 KDa	Despolimerización de actina
ipaD	78 KDa	Formando un complejo con IpaB, controla el flujo de proteínas a través de la secreción tipo III.
virB	33 KDa	Activación de los operones ipa, spa y mxi
virG (icsA)	120 KDa	Nucleación de filamentos de actina
IpaH	60 KDa	Posee 5 alelos. La proteína IpaH facilita el escape de <i>shigella</i> de la vacuola endocítica
ShET2	60 KDa	Enterotoxina ShET2

Fuente: (Vivas, 2013)

Tabla 13. *Shigella sonnei*

Gen	Peso molecular	Función
IpaH	67 KDa	Posee 5 alelos. La proteína IpaH facilita el escape de <i>shigella</i> de la vacuola endocítica.
ial	50 KDa	Este plásmido facilita la internalización e invasión del tejido "blanco" mediante la producción de adhesinas e invasinas; además, permite la diseminación intercelular de la bacteria y la transferencia y secreción de diversos factores de virulencia.
virB	33 KDa	Activación de los operones ipa, spa y mxi
virF	30 KDa	Activación de la transcripción de virB e icsA.
sigA	56 KDa	Actividad citopática Actividad enterotóxica
sepa	60 KDa	Invasión de tejidos
Pic	53 KDa	Mucinasas
Sat	52 KDa	auto transportador secretado toxina induce la muerte celular (apoptosis)
Set1A	20KDa	Secreción de iones
Set1B	16 KDa	Secreción de iones
Sen	58 KDa	Funciona de manera similar a ShET1 al unirse a los receptores de guanilato ciclasa (GC) presentes en las células epiteliales del intestino, lo que activa esta enzima. Esto provoca un incremento en la producción de GMPc y, como resultado, aumenta la secreción de líquidos

Fuente: (Gu et al., 2019)

En las tablas 12, 13 y 14 se presentan los factores de virulencia de las tres especies de *Shigella* incluidas en nuestro estudio. Cabe destacar que se utilizó el gen ipaH, ya que este se encuentra presente en todas las especies analizadas.

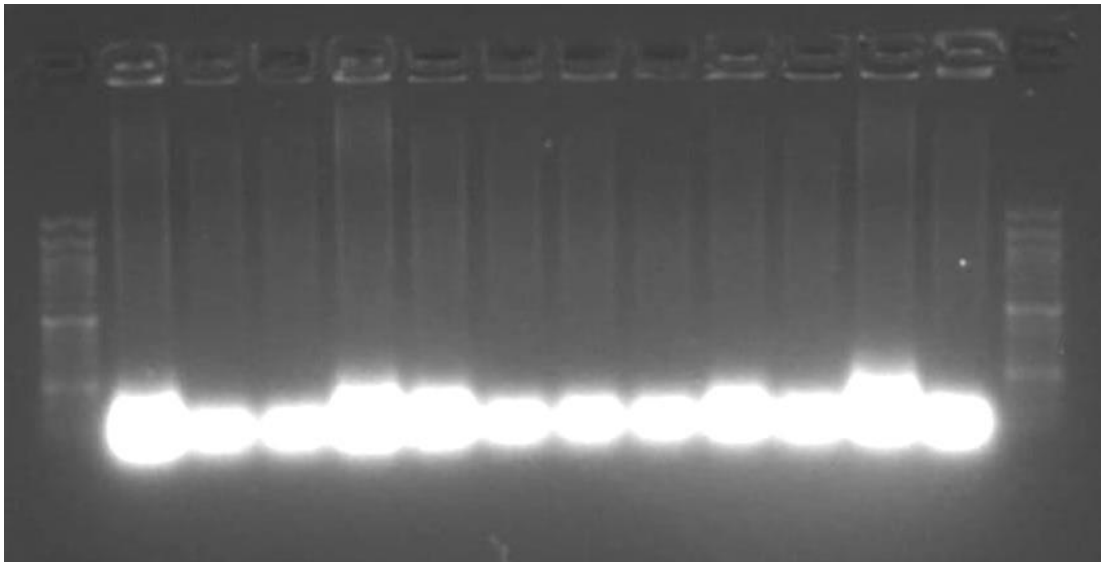
En el estudio de **Mattock y Blocker (2017)**, mencionan que la *Shigella* libera factores de virulencia que provocan una inflamación intensa y son responsables de los efectos enterotóxicos en el colon, lo que genera la diarrea acuosa típica en las personas que se observa al inicio de la infección. En segundo lugar de acuerdo a lo que manifiesta **Cardenas et al. (2014)** la *Shigella* introduce efectores de virulencia en las células epiteliales mediante su Sistema de Secreción Tipo III, lo que altera la estructura y función de las células del huésped. Esto facilita la invasión de las células epiteliales, creando un entorno favorable para la replicación y causando daño descontrolado al epitelio colónico. Además **Vivas (2013)** indica que la *Shigella* produce efectores que reducen la inflamación y modulan la respuesta inmune innata, lo que favorece la propagación de la infección y limita la respuesta inmune adaptativa, haciendo que el huésped siga siendo parcialmente vulnerable a futuras infecciones. La interacción de estos factores de virulencia puede explicar la variabilidad de los síntomas y las capacidades infecciosas de las diferentes especies de *Shigella*, así como los distintos modos de transmisión.

Barrantes y Achí (2009) mencionan que la enterobacteria *Shigella* utiliza los mecanismos celulares y de defensa de su hospedero, así como diferentes tipos de efectores bacterianos (proteínas ipa BCDA, ipgD, icsA-virG, virA, entre otras) secretados por medio del Sistema de Secreción tipo III (SSTT) que promueven su ingreso y sobrevivencia dentro de la célula hospedera, así como su replicación y diseminación intra e intercelular. A la vez **Ashida et al. (2007)** manifiestan que los operones mxi, spa e ipa, que codifican para el SSTT y las proteínas ipa, se encuentran codificados en el plásmido de invasión de *Shigella* y se transcriben al contacto de la bacteria con el enterocito. Existen además otros factores de virulencia, como el lipopolisacárido (LPS) y toxinas como la toxina Shiga, que cumplen un papel importante en este proceso infeccioso.

Adicionalmente **Jomehzadeh et al. (2021)** indica que el antígeno plasmídico de invasión (ipaH) está presente en múltiples copias ubicadas tanto en un plásmido como en el cromosoma son responsables de la diseminación en las células epiteliales.

3.2 Detección mediante PCR del gen ipaH que promueve invasión a los tejidos relacionando las características, estructura y función de la proteína que codifica.

Figura 1. *PCR para amplificar gen ipaH con los primers forward y reverse. Según Gu et al. (2019)*



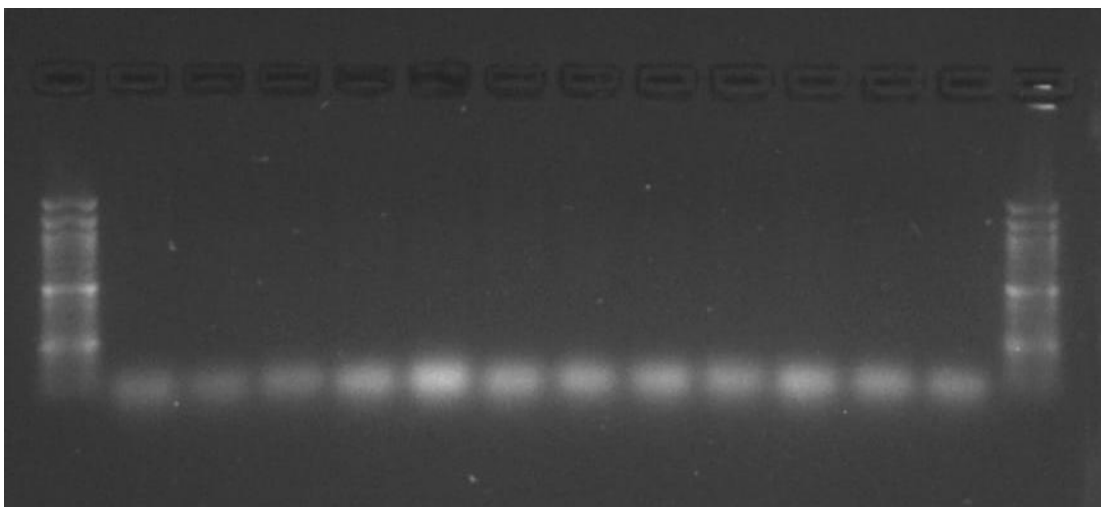
En la Figura 1 se muestra el resultado de la PCR. En la imagen se puede observar que no se evidenció la amplificación del ADN de cada una de las muestras. Sin embargo, se puede notar una intensa concentración de los mismos. Para su realización se siguió el estudio de **Gu et al. (2019)** del cual se preparó una mezcla Master Mix que contenía 0.75 µl de primers, 8 µl de agua libre de endonucleasas y 3 µl de ADN puro de más de 2.000 ng/ml. Posteriormente, se realizó la PCR en el termociclador con una banda de 423 pares de base y los primers forward TGGAAAACTCAGTGCCTCT y reverse CCAGTCCGTAAATTCATTCT, siguiendo el siguiente protocolo desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos que consistieron en una

desnaturalización a 95 °C por 50 segundos, un anillamiento a 55 °C por 45 segundos y una extensión a 72 °C durante 1 minuto. El proceso culminó con una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Inicialmente, nuestro estudio se basó en lo descrito por **Gu et al. (2019)**, utilizando la misma secuencia de los primers para el gen ipaH. En dicho estudio, se amplificó a 423 pb bajo las mismas condiciones para la reacción de PCR. No obstante, a diferencia de ese trabajo, se emplearon 166 muestras de *Shigella*, obteniendo una prevalencia del 100% para la amplificación del gen ipaH en las cepas analizadas.

Por otro lado, el estudio realizado por **Fan et al. (2017)** utilizó 545 aislamientos que fueron confirmados como *Shigella flexneri*. La amplificación del gen ipaH se llevó a cabo mediante PCR múltiple utilizando el mismo protocolo de nuestro estudio. En el presente estudio, se observó una amplificación de 423 pb, y la prevalencia del gen ipaH alcanzó una frecuencia del 100%, lo que indica que todas las cepas de *S. flexneri* analizadas contenían este gen de virulencia.

Figura 2. PCR para amplificar gen ipaH modificado con los primers forward y reverse. Según **Vargas et al. (1999)**



En la figura 2 se puede observar que no se evidencio la amplificación de ningún ADN ,que bajo las condiciones anteriores no se obtuvo la banda esperada que es de 423pb ni su amplificación, se decidió incrementar el tiempo de anillamiento a 1.5 minutos debido a esto se empleó con las siguientes condiciones para la PCR.

La modificacion se realizó de la siguiente manera, la máster Mix, contenía, 1µl de primers diluidos , 8.5 µl agua libre de endonucleasas y 2 µl de ADN diluido. En cambio para la PCR se siguió el mismo protocolo de **Vargas et al. (1999)** con una banda de 423pb y primers forward TGGAAAACTCAGTGCCTCT y reverse CCAGTCCGTAAATTCATTCT ,iniciando con una desnaturalización inicial de 95 ° C con un tiempo de 5 minutos, seguido de 95 ° C por 50 segundos, se utilizó 30 ciclos, para el anillamiento se usó 55 ° C por 1.5 min, extensión de 72 ° C durante 1 minuto, terminando con una extensión final de 7 minutos.

Es preciso señalar que en el estudio descrito por **Vargas et al. (1999)**, se analizaron varias cepas de *Shigella* mediante PCR para detectar genes de virulencia. Entre ellos, el gen ipaH, asociado con la capacidad invasiva de la bacteria, fue amplificado en todas las cepas analizadas, obteniendo un producto de 423 pb. Por ende fue un marcador clave, ya que todas resultaron positivas para este gen con un total de 51cepas.

Por otro lado, el estudio realizado por **Zhang et al. (2014)** tuvo como objetivo determinar las características de virulencia de cepas de *Shigella*. En dicho estudio, se recolectaron 356 aislamientos, observándose que más del 99,0 % de los aislados resistentes a cefalosporinas contenían los genes de virulencia ial, ipaH, virA y sen. En el presente trabajo, se utilizó el mismo protocolo y condiciones para la PCR de nuestro estudio, con una amplificación de 423 pb. Como resultado, se obtuvieron 198 muestras positivas para el gen ipaH correspondientes a las especies *S. flexneri* y *S. sonnei*.

Finalmente, al visualizar los resultados anteriores y no identificar el gen ipaH se optó por realizar un gradiente de temperatura con ocho temperaturas diferentes en una PCR

convencional haciendo uso del termociclador con las mismas condiciones que indica la siguiente tabla, esto con la finalidad de encontrar la temperatura adecuada para la fase de anillamiento. Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

Tabla 14. *Condiciones de la PCR en gradientes de temperatura*

Fases	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	5 minutos
Desnaturalización	95	50 segundos
Anillamiento	A:63.0 B:62.4 C: 61.4 D:59.9 E:58.1 F:56.5 G:55.6 H:55.0	45 segundos
Extensión	72	1 minutos
Extensión final	72	7 minutos
Ciclos: 30		

Al explicarlo de manera detallada se menciona que para el hallazgo del gen ipaH se optó por emplear un gradiente de temperatura para las 17 muestras de *Shigella* y el control negativo, con el fin de determinar la temperatura de anillamiento óptima que favoreciera la amplificación específica del gen de interés. El uso de un gradiente de temperatura permite evaluar diversas condiciones térmicas en un solo ensayo, optimizando así el proceso de amplificación al identificar la temperatura más adecuada para la correcta unión de los cebadores al ADN objetivo (García y Live, 2013).

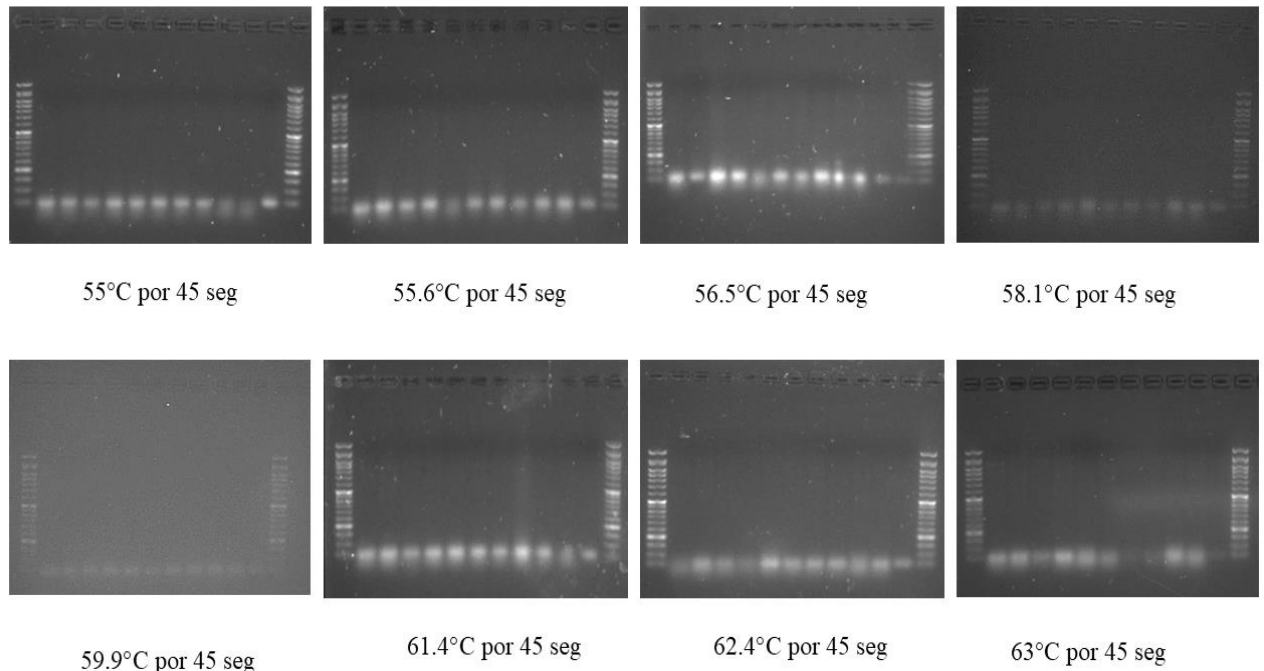
En la investigación realizada por **Kiura (2019)** se evaluó el efecto de la temperatura en la amplificación del gen 18S ARNr de dos microalgas a través de la PCR, para ello se utilizaron muestras aisladas. Las cepas utilizadas PM016 y PM017 fueron sometidas a evaluación de un gradiente de temperatura que va de 59°C a 64°C para la cepa PM016, mientras que para la cepa PM017 se aplicó de 55°C a 65°C. Se determinó que la temperatura óptima para la amplificación del gen 18S ARNr es de 65°C para la cepa PM017 y para la cepa PM016, es de 59°C.

En el trabajo investigativo de **Leza et al. (2022)** optimizó técnicas moleculares, como la PCR punto final y la PCR de tiempo real para detectar tifosis aviar y pullorosis. Al emplear el gradiente de temperatura se observó una amplificación positiva desde 56°C, 56,4, 57.1, 58.6, 59.9, 61.4, 63.0, 64.5, 66.1, 67.3, 68.0 hasta 68,4°C. Optaron por utilizar una temperatura de 59,0°C durante la etapa de anillamiento con el fin de mantener una alta especificidad durante las pruebas.

Así mismo en otro estudio el objetivo descrito por **Barboza et al. (2019)** fue optimizar la técnica de PCR multiplex para la identificación de *L. monocytogenes*. En las que se probaron distintas temperaturas de anillamiento para determinar cuál presentaba mayor especificidad, evitando las amplificaciones inespecíficas. En este caso el gradiente de temperatura inicio de 49°C, 51°C, 53°C, 55°C, 57°C y 59°C. Concluyendo que la temperatura óptima es la de 57°C.

Y en cuanto al estudio de **Hernández (2012)** tuvo como objetivo el determinar la prevalencia de Babesiosis bovina. Para ello inicialmente se estandarizó la técnica de biología molecular PCR convencional, seguido de la dilución de los primers BoF/BoR. Para la realización de este ensayo, se empleó un gradiente de temperatura compuesto por los siguientes valores: 56°C, 58°C, 61.6°C y 63.6°C. La temperatura de 58°C fue utilizada como referencia.

Figura 3. Ilustración de PCR en gradiente de temperatura



En la figura 3 se muestran las placas correspondientes a las diversas temperaturas de anillamiento utilizadas en la realización de la PCR para el estudio. En los resultados mostrados, se hace evidente la ausencia del gen ipaH en todas las placas analizadas, lo que indica que no se detectó la presencia de este gen bajo las condiciones experimentales establecidas.

En el estudio realizado por **Thiem et al. (2004)** propuso la detección de *Shigella* mediante un ensayo de PCR dirigido al gen ipaH, debido a la presencia de casos de shigelosis. Para ello, se utilizaron 60 muestras positivas a *Shigella*, de las cuales se detectaron 56 casos positivos para el gen mencionado. Los primers utilizados fueron: el forward 5' CCT TTT CCG CGT TCC TTG A 3' y el reverso 5' CGG AAT CCG GAG GTA TTG C 3'. El protocolo de PCR empleado fue similar a los anteriores, pero con una temperatura de anillamiento de 60 °C durante 1 minuto y un total de 40 ciclos.

En la investigación realizada por **Sabour et al. (2022)** tuvo como objetivo estudiar la distribución de *Shigella* productora de β -lactamasa de espectro extendido en cepas aisladas de pacientes con diarrea, con el fin de detectar la presencia de los genes ipaH, invC, wbgZ, rfpB y rfc. Se recolectaron 1280 muestras fecales de niños, en las cuales se identificaron un total de 49 casos positivos para el gen ipaH. Para la detección, se aplicó un ensayo de PCR multiplex, utilizando los primers forward 5' GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC3' y reverso 5' GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC 3' para el gen ipaH. El protocolo de PCR utilizado permitió la amplificación de un fragmento de 619 pb, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos, desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, anillamiento 55 °C a 45 segundos, extensión a 72 °C durante 40 segundos y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos, con un total de 32 ciclos.

En el estudio de **Gonzales et al. (2020)** se analizaron la frecuencia de 16 genes de virulencia, la diversidad genotípica y los perfiles de resistencia antimicrobiana de 130 cepas de *S. flexneri* aisladas en Brasil. El gen ipaH fue detectado en todas las 130 cepas. El amplicon utilizado para la amplificación fue de 629 pb, y los primers empleados para la amplificación del gen ipaH fueron: P.F 5'-GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C-3' y P.R 5'-GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC-3'. Las condiciones para la PCR incluyeron una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos que consistieron en una desnaturalización a 94 °C durante 45 seg, anillamiento a 60 °C durante 45 seg, extensión a 72 °C durante 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 15 min.

En el estudio descrito por **Sharma et al. (2023)** tuvo como objetivo dilucidar la importancia de *Escherichia coli* lactosa-fermentadora como causa de diarrea en adultos y niños, mediante la detección de varios patotipos de *E. coli* diarreogénica en muestras fecales de casos de gastroenteritis. Se incluyeron 3110 aislamientos, de los cuales 22 fueron positivos para el gen ipaH, con una amplificación de 437 pb y primer forward 5'GAAAACCCTCCTGGTCCATCAGG3' y reverso

5'GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC3'. Los parámetros de termociclado utilizados para la PCR fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, desnaturalización a 94 °C durante 30 seg ,35 ciclos, anillamiento a 58 °C durante 30 seg seguido del mismo tiempo y temperatura para la extensión de los anteriores estudios. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2%, y se visualizaron mediante un transiluminador UV.

El objetivo del estudio descrito por **Casabonne et al. (2016)** fue determinar la prevalencia y los factores de virulencia de especies de *Shigella* aisladas de pacientes con diarrea. Se realizaron aislamientos de *Shigella* a partir de 1022 muestras de heces recolectadas en diversos hospitales de la ciudad de Rosario, Argentina. Los aislamientos fueron caracterizados mediante pruebas fenotípicas, serotipificación y la determinación de los genes de virulencia mediante PCR. Posteriormente, se analizaron cepas clínicas de *Shigella* spp. para detectar los genes ipaH, virA, ial, sen y set. Para la amplificación de estos genes, se utilizaron los primers forward 5'GTTTCCTTGACCGCCTTTCCGTACCGTC3' y reverse 5'GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC3'. El producto de PCR del gen ipaH presentó un tamaño de 661 pb, siguiendo el mismo protocolo de nuestro estudio, pero con un anillamiento a 60 °C durante 45 segundos. Como resultado, se obtuvo la detección de 100 casos positivos para el gen ipaH en las especies *Shigella flexneri*.

El estudio realizado por **Bansal et al. (2023)** incluyó muestras de heces de 150 niños, de entre un mes y cinco años, con diarrea aguda de siete días de duración. El ADN extraído fue amplificado por PCR utilizando un cebador específico para el gen ipaH, con un tamaño de 424 pb. Los resultados fueron interpretados según el porcentaje de aislamiento de *Shigella* mediante PCR, microscopía y cultivo de heces. Se utilizaron los cebadores forward 5'-GCTGGAAAACTCAGTGCCT-3' y reverse 5'-CCAGTCCTGTAAATTCATTCT-3', con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, anillamiento a 56 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C durante 40

segundos y extensión final a 72 °C por 10 minutos. Se detectaron 13 casos positivos para *Shigella*.

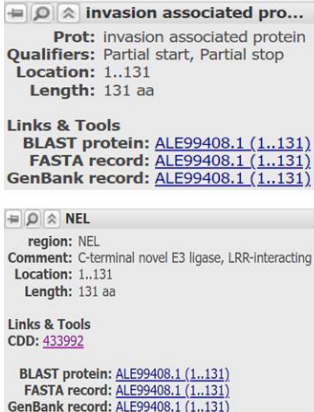
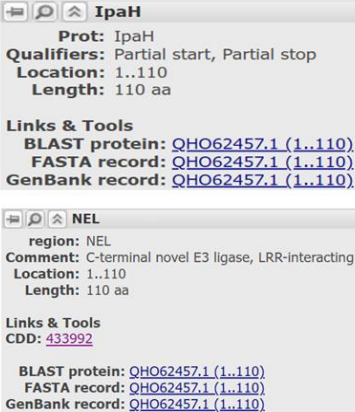
En el presente estudio **Løbersli et al. (2016)** se empleó la técnica de PCR en tiempo real para amplificar los genes que codifican la permeasa de la lactosa (*lacY*) y el antígeno del plásmido de invasión (*ipaH*), en un total de 121 aislamientos fenotípicamente clasificados como *Shigella* spp. Los cebadores utilizados fueron: Forward 5' GACGGACAACAGAATACACTCCATC 3' y Reverse 5' ATGTTCAAAAGCATGCCATATCTGT 3', generando un amplicón de 108 pb. El protocolo de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95 °C, seguida por desnaturalización a 94 °C durante 60 segundos, anillamiento y extensión a 58 °C durante 60 segundos. En este estudio, no se detectaron casos positivos para el gen *ipaH* en las muestras analizadas.

En la investigación de **Lokamar Nyanga et al. (2017)** se investigó la prevalencia de patotipos de *Escherichia Coli* y serogrupos de *Shigella*, así como sus perfiles antimicrobianos, en 354 niños menores de cinco años con diarrea en la ciudad de Nairobi, Kenia. Para ello, se recolectaron muestras de heces, las cuales fueron sometidas a cultivo bacteriano. El aislamiento y la identificación de las bacterias se realizaron mediante métodos microbiológicos convencionales. Para la detección de *E. coli* entero invasiva (EIEC) y especies de *Shigella*, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un amplicón de 600 pb. Los primers empleados fueron el primer forward 5'GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC3' y el primer reverso 5'GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC3', los cuales permitieron la amplificación del gen *ipaH*. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 1 minuto y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. El análisis de los resultados obtenidos reveló que la prevalencia del gen *ipaH* fue del 21.2%, ya que se identificaron 75 casos positivos en total.

Del estudio de **Sheikh et al. (2019)** llevaron a cabo una investigación cuyo objetivo principal fue identificar *Shigella* spp. aisladas de pacientes con diarrea utilizando pruebas bioquímicas convencionales, determinar los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de difusión en disco y detectar el gen ipaH mediante PCR. Se aislaron cepas de *Shigella* de 522 pacientes con diferentes tipos de diarrea, incluyendo diarrea sanguinolenta, mucoide con sangre, mucoide y acuosa. El protocolo de PCR se realizó con un amplicón de 500 pb, utilizando los primers forward 5'GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TA3' y reverse 5'GCC GGT CAG CCA CCC TA3'. Las condiciones de ciclado fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos con desnaturalización a 94 °C durante 60 segundos, anillamiento a 60 °C durante 90 segundos, extensión a 72 °C durante 60 segundos y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. De los 69 aislamientos positivos para *Shigella* spp., se detectó la presencia del gen ipaH.

En conclusión, según los estudios previamente mencionados, los cuales están relacionados con la identificación del gen ipaH y la realización de la PCR, se puede evidenciar que existen diferencias en varios aspectos, tales como la secuencia de los primers, el tamaño de los pares de bases, la cantidad de muestras utilizadas y, particularmente, en la fase de anillamiento, donde la temperatura varía en función de cada estudio

Figura 4 Características de las proteínas codificadas por el gen *ipaH* en las especies de *Shigella* spp.

<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella flexneri</i>
 Prot: invasion associated protein Qualifiers: Partial start, Partial stop Location: 1..131 Length: 131 aa Links & Tools BLAST protein: ALE99408.1 (1..131) FASTA record: ALE99408.1 (1..131) GenBank record: ALE99408.1 (1..131) NEL region: NEL Comment: C-terminal novel E3 ligase, LRR-interacting Location: 1..131 Length: 131 aa Links & Tools CDD: 433992 BLAST protein: ALE99408.1 (1..131) FASTA record: ALE99408.1 (1..131) GenBank record: ALE99408.1 (1..131)	 Prot: IpaH Qualifiers: Partial start, Partial stop Location: 1..110 Length: 110 aa Links & Tools BLAST protein: QHO62457.1 (1..110) FASTA record: QHO62457.1 (1..110) GenBank record: QHO62457.1 (1..110) NEL region: NEL Comment: C-terminal novel E3 ligase, LRR-interacting Location: 1..110 Length: 110 aa Links & Tools CDD: 433992 BLAST protein: QHO62457.1 (1..110) FASTA record: QHO62457.1 (1..110) GenBank record: QHO62457.1 (1..110)	 Prot: IpaH Qualifiers: Partial start, Partial stop Location: 1..139 Length: 139 aa Links & Tools BLAST protein: WPK42985.1 (1..139) FASTA record: WPK42985.1 (1..139) GenBank record: WPK42985.1 (1..139)

Fuente: (NCIB, 2024)

En la figura 4 se muestra las tres especies de *Shigella* que se identificaron, en la especie *S. dysenteriae* codifica una proteína de 131 aminoácidos (aa), *S. sonnei* de 110 aa y *S. flexneri* de 139 aa. Las proteínas son la composición de cientos o miles de aminoácidos los cuales al enlazarse forman largas cadenas (Zaragoza et al., 2021).

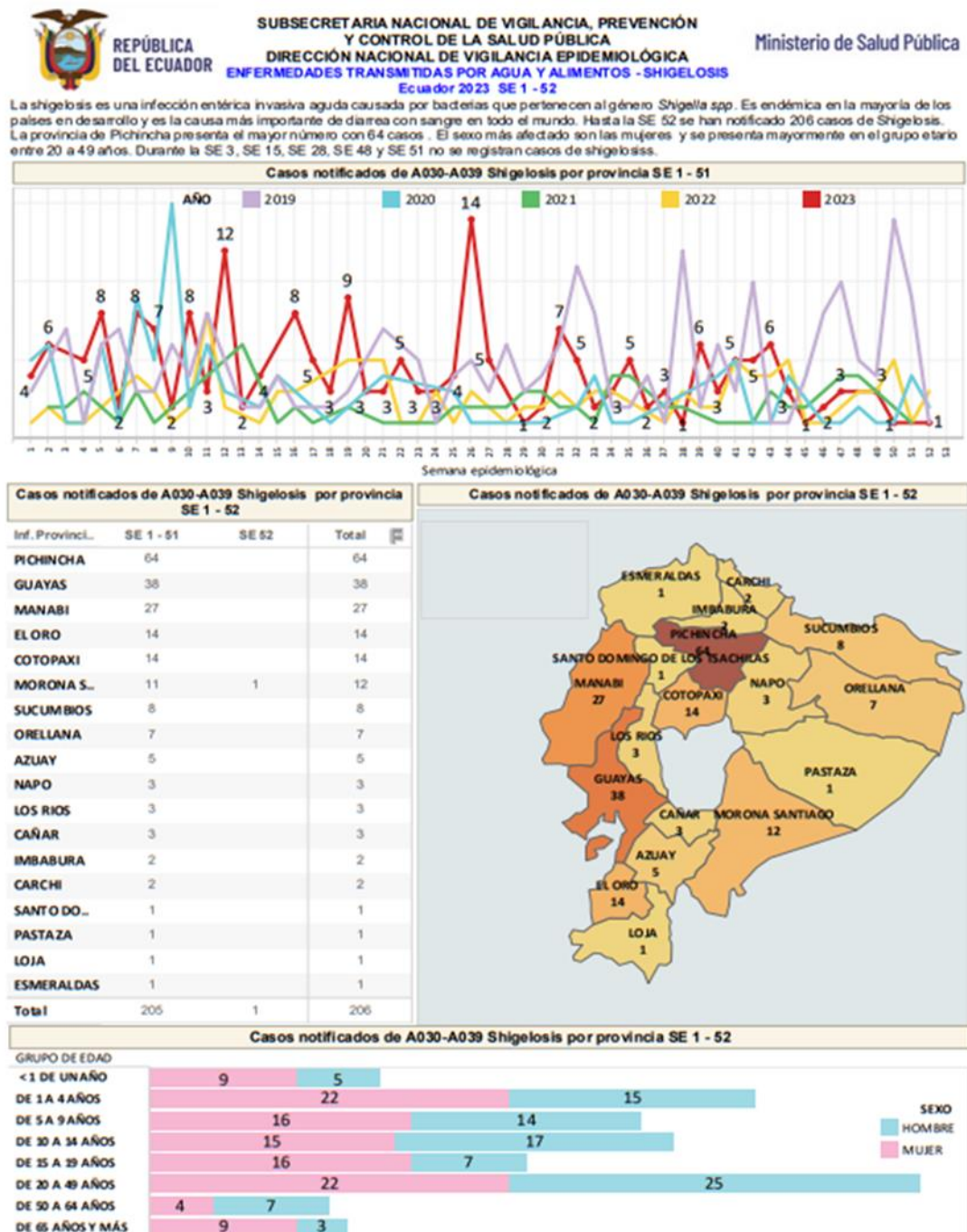
La estructura de las proteínas de la familia IpaH contienen repeticiones ricas en leucina N-terminal (LRR) y tienen actividad de ubiquitina ligasa E3 en sus regiones C-terminales conservadas. La ubiquitinación es una importante modificación postraducciona que regula varias funciones celulares, incluyendo la señalización celular, la degradación de proteínas, la transcripción y la endocitosis (Ashida y Sasakawa, 2016).

La proteína IpaH es secretada por la bacteria *Shigella* directamente hacia el interior de la célula huésped a través de un sistema de secreción tipo III. También se denomina nano jeringas o inyectisomas, se distingue por la capacidad de inyectar una proteína

virulenta de la célula bacteriana a la eucariota, algunas veces se compara con el cuerpo flagelar bacteriano actuando como una unidad motora y apéndice extracelular que está dada por demasiadas proteínas. Las bacterias patógenas sostienen un componente estructural considerado un apéndice proteico que facilita la inyección de la proteína en la célula hospedadora (**Boundless, 2022**). El SST3 forma un complejo de más de 20 proteínas que se encuentran en el interior de la membrana citoplasmática de la célula bacteriana. el proceso de inyección o denominada transferencia requiere una ATPasa asociada a la membrana. El inyectisoma se ha identificado en especies de *Bordetella*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Xanthomonas* y *Yersinia* (**Montelongo y Cocotl, 2022**). Al hablar de la enterobacteria *Shigella* tiene la capacidad de generar infección evadiendo el sistema inmunológico. Es decir que el movimiento entre las células vecinas y la evasión del sistema inmune, potencia su capacidad para inyectar su proteína secretora en la célula hospedadora (**Boundless, 2022**).

3.3 Relación de los factores de virulencia presentes en *Shigella* spp con la antibioresistencia y la procedencia de las muestras desde el punto de vista epidemiológico.

Figura 5. Prevalencia de Shigelosis de acuerdo con la MSP en el año 2023



Fuente: (Ministerio de Salud Pública, 2023)

En la figura 4 se evidencia que, según los datos proporcionados por el Ministerio de Salud Pública durante el año 2023, no se evidencia casos de Shigelosis en la provincia de Tungurahua, pero en Pichincha si, con un numero alto de contagios. Sin embargo, en los años 2021 y 2022 la prevalencia de la enfermedad fue baja, mientras que, en los años 2020, 2019 y 2023 se presentaron picos altos. Por otro lado, al realizar una comparación de las tres regiones con sus respectivas provincias se puede notar que existe una mayor prevalencia de la enfermedad en la región Sierra y con respecto a la edad aquellos de 22 a 49 años fueron más propensos a contagiarse, seguido de los que contaban con un intervalo de edad de 1 a 4 años donde la cantidad de afección de los sexos se vieron similares, es decir que puede transmitirse tanto a hombres como a mujeres.

De acuerdo al estudio de **Dirección General de Salud Pública (2023)** menciona que la shigelosis es endémica debido a que se presenta en climas tanto tropicales como templados en niños menores de 6 meses no es usual. En términos generales, las cepas *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. dysenteriae* son las que causan la mayoría de los aislamientos en los países en desarrollo, mientras que *S. sonnei* es más común en los países industrializados, donde la enfermedad suele ser menos severa.

En el estudio de **Monar et al. (2023)** analizó la prevalencia de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp asociada a un síndrome diarreico en la población infantil de entre 6 meses y 6 años con problemas gastrointestinales siendo útil las muestras fecales de los niños. Llegando a la conclusión que se evidencia la presencia de las dos enterobacterias en niños de 4 y 6 años de edad, esto debido a que su sistema inmunológico aún se encuentra en desarrollo.

Por otro lado, en la provincia de Cotopaxi según **Cañaveral (2016)** estudió la prevalencia de Shigelosis en niños de 2 a 12 años en una población socioeconómica baja de Salcedo. Para el estudio se tomó muestras de heces de los niños. En el que se concluyó que las niñas de 4 y 7 años son las propensas, además que la zona de

Papahurco es la más afectada por esta enfermedad, entendiéndose que es debido a las condiciones higiénicas en las que viven.

Además en la ciudad de Guayaquil dentro del estudio de **Vergara y Caleño (2019)** se determinó la prevalencia de enfermedades diarreicas en niños de 0 a 5 años atendidos en el área de emergencia de un hospital, en este estudio los pacientes tenían problemas diarreicos y la recolección de datos se realizó de manera indirecta. Concluyo con la presencia de *Shigella* conjuntamente de otras bacterias a la vez mencionan que la mayor afección se tornó en el sexo masculino a la edad de 1 año también se encontró que la mal higiene en los hogares influye notoriamente.

De igual manera en la ciudad de Shushufindi de acuerdo al estudio de **Reyes et al. (2019)** se evaluó la etiología de la diarrea infecciosa en niños. Para este estudio se recolectaron muestras fecales de ambos sexos que asistieron al laboratorio de un centro de salud. En este estudio se demostró la participación de un grupo pequeño de patógenos incluyendo la *Shigella* en niñas con un intervalo de edad de 0 a menos 2 años de edad.

La creciente preocupación por la resistencia a los antibióticos ha demostrado una interrelación compleja entre este fenómeno y la virulencia bacteriana debido a su evolución de las infecciones bacterianas y su tratamiento. En este aspecto **Cardenas et al. (2014)** mencionan que la virulencia se refiere a la capacidad de una bacteria para causar daño al huésped, mientras que la resistencia tiene que ver con la capacidad de la bacteria para sobrevivir a las concentraciones terapéuticas utilizadas de un medicamento (**Camacho, 2023**).

Se tomo en consideración la investigación de **Soto (2024)** quien evaluó la antibiorresistencia de cepas de *Shigella* spp aisladas de carne de pollo en la ciudad de Ambato y trabajó con 17 cepas. En la primera fase, se utilizó el método fenotípico

Kirby Bauer (disco-placa) a un grupo de medicamentos que incluye Azitromicina, Gentamicina, Ceftriaxona, Amoxicilina + ácido clavulánico y Ciprofloxacina. Los resultados mostraron una notable resistencia ante las fluoroquinolonas, seguida de resistencia ante los betalactámicos y en menor medida ante los aminoglucósidos. Sin embargo, debido a los mecanismos de resistencia que poseen las cepas de *Shigella spp*, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diversos antibióticos utilizados en el estudio, se determinaron como superiores a la dosis recomendada esto se atribuye al rápido desarrollo y mejora de los mecanismos de resistencia de *Shigella spp*, especialmente debido al uso inapropiado de antibióticos.

El objetivo de la investigación realizada por **Pazmiño (2024)** fue comprobar la presencia de un gen de resistencia con dos antibióticos: amoxicilina más ácido clavulánico (AMC) y ciprofloxacino (CIP). En esta investigación, partieron con 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 buscó el gen blaTEM 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%.

De acuerdo al estudio de **Guerrero et al. (2013)** su objetivo fue determinar el patrón de resistencia a los antimicrobianos de los cultivos de *Shigella spp*. Se evaluaron 75 cultivos de aislados de infecciones intestinales, recolectados desde tres centros de salud de Lima, siendo 54 *Shigella flexneri* (72%) y 21 *Shigella sonnei* (28%). La resistencia antibiótica observada en los cultivos de *Shigella*, independientemente del serogrupo, fue muy frecuente para Sulfametoxazol Trimetoprim, ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina; además, algunos cultivos fueron resistentes a Aztreonam, Furazolidona y Amoxicilina-Acido Clavulánico.

El estudio de **Abreu et al. (2021)** caracterizó la resistencia antimicrobiana de cepas de *Shigella* aisladas en niños atendidos en el Hospital Pediátrico de la Ciudad de Santa Clara, Provincia de Villa Clara, se identificaron 25 cepas de las cuales *S. sonnei* fue la especie más aislada, con 19 cepas, en segundo lugar, se encontró *S. flexneri* con 5 y 1 correspondiente a *S. boydii*; no se aisló *S. dysenteriae*. *Shigella sonnei* mostró una marcada resistencia al ácido nalidíxico, con 18 cepas resistentes, para un 72% del total de aislamientos, seguido de la ampicilina y el sulfametoxazol-trimetoprim, con el 40% y el 32%, respectivamente, mientras que ninguna cepa fue resistente al ciprofloxacino, al cloranfenicol y a la amikacina. Se encontró un por ciento de resistencia bajo (4%) para la ceftriaxona.

El objetivo del estudio de **Villacrés et al. (2015)** fue establecer la sensibilidad antimicrobiana y detectar genes de virulencia ipaH, ial, Stx, set1A, 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. 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 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.

En el estudio de **Naranjo (2018)** pretendió determinar los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* spp. e identificar los serotipos más prevalentes de la misma. La identificación de las cepas dio un total de 117 cepas recuperadas de las diferentes casas de salud de la ciudad de Quito, donde se aislaron un total de 86 cepas de *S. flexneri*, 30 cepas de *S. sonnei* y una cepa de *S. boydii* siendo los mayores afectados con un 52.8% niños menores de 5 años, la mayoría de las cepas presentaron el siguiente

fenotipo resistencia a la ampicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y resistencia intermedia al amoxicilina-ácido clavulánico en un 83% .

3.2. Comprobación de la hipótesis

Los resultados obtenidos en el presente estudio descartan la hipótesis planteada, dado que no se detectó la presencia del gen ipaH en ninguna de las muestras analizadas. Este hallazgo indica que no existe virulencia asociada a este gen en los aislamientos bacterianos provenientes de carne de pollo en el cantón Ambato.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- Una vez realizada una revisión bibliográfica de las especies de *Shigella* involucradas en este estudio, se observó la existencia de una notable diversidad de factores de virulencia presentes en cada una de ellas. Es así que el gen ipaH se encuentra presente con mayor frecuencia entre las especies. Además, cabe mencionar que este gen relacionado con la virulencia juega un papel fundamental en la invasión celular y en la inducción de respuestas inflamatorias, convirtiéndolo en un marcador adecuado para el estudio de estas cepas patógenas.
- En cuestión de la elaboración de la PCR, no se demostró la presencia del gen ipaH en las cepas de *Shigella* spp analizadas al no detectar la banda de ADN de 423pb con las condiciones iniciales junto al gradiente de temperatura.
- De acuerdo a los datos epidemiológicos correspondientes a los últimos cinco años, se ha observado la presencia de la enfermedad conocida como shigelosis, cuya causa es la bacteria *Shigella*. En este sentido, es relevante señalar que, tanto en el año 2023 como en la investigación realizada en 2024, no se reporta la existencia de esta enfermedad en la provincia de Tungurahua, ni la presencia del gen relacionado en las cepas aisladas utilizadas para el estudio. No obstante, se observa que dichas cepas continúan circulando en las provincias vecinas.

4.2.RECOMENDACIONES

- Investigar otros genes que codifiquen factores de virulencia en las cepas de *Shigella* que son shigatoxigénicas, con el objetivo de identificar aquellos relacionados con la capacidad patogénica de estas bacterias.
- Ampliar el número de muestras de carne de pollo, ya que en los estudios previos se ha utilizado un número elevado de muestras, lo que podría proporcionar una mayor precisión y fiabilidad en los resultados obtenidos, permitiendo una mejor representación de la diversidad de las muestras.
- Realizar investigaciones en diferentes etapas de la cadena productiva de las aves, abarcando no solo los procesos de producción sino también la distribución, almacenamiento y comercialización de los productos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, R., Hernández, C., Mesa, Z., García, D., Bermúdez, R., y Meras, R. (2021, August 21). Resistencia antimicrobiana de cepas de *Shigella* aisladas en el Hospital Pediátrico Universitario “José Luis Miranda.” *Acta Médica Del Centro*, 15(2), 1–10.
- ACSA. (09 de agosto de 2017). Mapa de peligros alimentarios. <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/826/957>
- Agrocalidad. (16 de mayo de 2020). Bienestar animal faenamiento de animales de producción. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/ll3.pdf>
- ARCHIPIA. (2018). *Shigella* spp. Área de soporte de riesgos.09(01)1–9. <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/11/Ficha-Peligro-09-Shigella-spp-v01.pdf>
- Ashida, H., y Sasakawa, C. (2016). *Shigella* IpaH family effectors as a versatile model for studying pathogenic bacteria. *Journal Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(6),1-6.
- Ashida, H., Toyotome, T., Nagai, T., y Sasakawa, C. (2007). *Shigella* chromosomal IpaH proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors. *Journal Molecular Microbiology*, 63(3), 680–693.
- Bansal, P., Shah, D., Meena, R. K., Rai, G., Das, S., Narang, M., y Gupta, P. (2023). *Shigella* as a Cause of Diarrhea Hospitalization in Children Under Five: Evaluation by Conventional and Molecular Methods. *Journal Cureus*,15(12),1-10.
- Barrantes, K., y Achí, R. (2009). Interacciones celulares en el proceso de invasión de *Shigella* sp. *Reista Panam Infectol*, 11(2), 56–61.
- Basualdo, W., Allende, I., Cabrera, T., y Arbo - Sosa, A. (1999). Estudio de brote de diarrea disintérica por *Shigella* sp. en una comunidad rural. *Revista Scielo*, 2(6), 1–9.
- Boundless, A (2022). Microbiology. Ed. LibreTexts.1-1708.

Cabral, J. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. In *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>

Calle, E. (2006). Aislamiento por coprocultivo e identificación mediante reacción en cadena de la polimerasa de *salmonella* y *shigella* de niños menores de cinco años y correlación de la infección con los factores de riesgo. [Tesis de pregrado, Universidad Mayor de San Andrés. Repositorio institucional de la Universidad Mayor de San Andrés. <https://repositorio.SanAndrés.edu.es/servlet/tesis?codigo=45751>

Camacho, L. (2023). Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Revista Española de Salud Pública*, 97, 1–10. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10541255/pdf/1135-5727-resp-97-e202302013.pdf>

Cañaveral, M. (2016). “Prevalencia de Shigelosis en niños de 2 a 12 años en una población socioeconómica baja de Salcedo-Cotopaxi mediante el aislamiento microbiológico por el periodo enero-mayo del 2016.” [Título de pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Institucional Universidad Central del Ecuador <https://www.dspace.uce.edu.ec/entities/publication/c54d9ce2-44ee-42d5-9c01-15e4830894b3>

Cardenas, M. E., Cruz, O., Gándara, J., y Pérez, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la inteligencia de las bacterias. *Revista Elementos*, 94, 35–43.

Casabonne, C., González, A., Aquili, V., y Balagueá, C. (2016). Prevalence and virulence genes of *Shigella* spp. Isolated from patients with Diarrhea in Rosario, Argentina. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 69(6), 477–481.

CEER. (2020). Guía para el faenamiento de aves con resumen. *Revista Eco Business Fund*, 4(2-7) 1 58. https://www.ecobusiness.fund/fileadmin/user_upload/Sustainability_Academy/Rescursos/Guia_para_el_faenamiento_de_aves_con_resumen.pdf

Colmenero, A., Vila, A., Salcedo, E., Fernández, F., Sánchez, M., y Ramos, J. (2008). Infección por *Shigella* spp. en el Hospital de Getafe entre 2001 y 2006. *Revista Anales de Pediatría*, 68(6), 605–608.

Escobar, S. (2023). Identificación molecular de aislados bacterianos contaminantes de carne de pollo (*Gallus gallus*) expendida en puntos de venta del cantón Ambato [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato] Repositorio institucional Universidad Técnica de Ambato <https://repositorio.uta.edu.ec/items/d331b0d7-3722-4138-90cf-36c04a719245>

Fan, W., Qian, H., Shang, W., Ying, C., Zhang, X., Cheng, S., Gu, B., y Ma, P. (2017). Low distribution of genes encoding virulence factors in *Shigella flexneri* serotypes 1b clinical isolates from eastern Chinese populations. *Journal Gut Pathogens*, 9(76),1-9.

Fariñas, L., Noblet, D., García, M., y Fernández, A. (2005). Estudio de factores de virulencia en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de animales domésticos y afectivos. *Revista Electrónica de Veterinaria* VI (11),1-12.

García, J., y Live, J. (2013). Generación de energía eléctrica por gradiente de temperatura [Tesis de pregrado, Escuela Politécnica de Chimborazo]. Repositorio Digital Institucional de la Escuela Politécnica Nacional <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/6385>

Getamap. (16 de mayo de 2024). Obtenido de https://es.getamap.net/mapas/ecuador/tungurahua/_cevallos/

Gonzales, J. C., Seribelli, A. A., Gomes, C. N., Rodrigues, D., Campioni, F., Passaglia, J., Silva, P., y Falcão, J. P. (2020). A high number of multidrug-resistant and predominant genetically related cluster of *Shigella flexneri* strains isolated over 34 years in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 1563–1571.

Gu, B., Fan, W., Qin, T., Kong, X., Dong, C., Tan, Z., Chen, Y., Xu, N., Ma, P., Bao, C.-J., y Qian, H. (2019). Existence of virulence genes in clinical *Shigella sonnei* isolates from Jiangsu Province of China: a multicenter study. *Journal Annals of Translational Medicine*, 7(14), 305–305.

Guerreo, C., Guillén, A., Rojas, R., Bravo, N., y Muñoz, P. (2012). Serotipos y resistencia antibiótica en *Shigella* spp aisladas de infecciones intestinales. *Revista ECIPerú*, 10(1), 1–8.

Guerrero, Z., Duarte, P., y Toledo, B. (2007). Enterobacterias patógenas encontradas en carne de pollo para consumo humano. *Revista El Salvador Ciencia & Tecnología* 12(16), 1–4.

Jomehzadeh, N., Ahmadi, K., Javaherizadeh, H., y Afzali, M. (2021). Distribution of genes encoding virulence factors of *Shigella* strains isolated from children with diarrhea in southwest Iran. *Journal Molecular Biology Reports*, 48(2), 1645–1649.

Løbersli, I., Wester, A. L., Kristiansen, Å., y Brandal, L. T. (2016). Molecular differentiation of *Shigella* spp. from enteroinvasive *E. coli*. *European. Journal of Microbiology and Immunology*, 6(3), 197–205.

Lokamar Nyanga, P., Onyuka, J., Webale, M. K., Were, T., y Budambula, V. (2017). Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench.-groups in diarrheic children in Nairobi city. In Kenya. *Journal Gastroenterol Hepatol Bed Bench* (Vol. 10, Issue 3).

Lorca, M. (2004). Distribución de enterotoxinas shet1 y shet2 en cepas de *shigella flexneri* y *shigella sonnei* aisladas de niños chilenos con cuadro diarreico. Universidad de Chile [Tesis de pregrado, Universidad de Chile] Repositorio académico de la Universidad de Chile
<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/134199/Distribuci%C3%B3n-de-enterotoxinas-ShET1-y-ShET2-en-cepas-de-Shigella-flexneri-y-Shigella-sonnei-aisladas-de-ni%C3%B1os-chilenos-con-cuadro-diarreico.pdf>

Mallma, M. (2019). Prevalencia de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. en manipuladores de alimentos, Huancayo 2019 [Tesis de pregrado, Universidad Peruana los Andes]. Repositorio institución de UPLA
<https://repositorio.upla.edu.pe/handle/20.500.12848/1207>

Mattock, E., y Blocker, A. (2017). How do the virulence factors of *shigella* work together to cause disease? *Journal Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(64), 1-24.

Ministerio de Salud Pública. (2 de febrero de 2022). Enfermedades transmitidas por agua y alimentos shigelosis. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/02/Gaceta-General-Etas-SE-2.pdf>

Ministerio de Salud Pública. (12 de julio de 2023). Enfermedades transmitidas por agua y alimentos shigelosis. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2023/03/ETAS-SE-10.pdf>

Monar Basantes, S. P., Cedeño Cajas, G. M., Vega Villacis, S. D., y González Ramírez, L. C. (2023). Síndrome diarreico asociado a *Salmonella* spp., y *Shigella* spp., en niños atendidos en un hospital pediátrico de la provincia de Chimborazo - Ecuador. *Revista Anatomía Digital*, 6(4.3), 650–666.

Montelongo, L., y Cocotl, M. (2022). Armas moleculares bacterianas: el sistema de secreción tipo 3. *Revista Digital Universitaria*, 23(4),1-8.

Naranjo, C. (2018). “*Shigella* spp., determinación de los serotipos y perfiles de susceptibilidad antimicrobiana en el periodo 2009 – 2016, Quito- Ecuador.” [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador] Repositorio Institucional Universidad Central del Ecuador. <https://www.dspace.uce.edu.ec/entities/publication/72e9ce5b-c2d9-4f6f-92e2-0a423a232e66>

NCBI. (2024). *Taxonomy Browser. Shigella*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=620>

NCIB. (8 de Enero de 2024). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ALE99408.1>

OMS. (2024). *Inocuidad de los alimentos* . Obtenido de https://www.who.int/es/health-topics/food-safety#tab=tab_1

Pazmiño, A. (2024). Presencia de genes de resistencia a los antibióticos en *Shigella* spp. aislada de carne de pollo que se expende en el cantón de Ambato [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato] Repositorio institucional UTA. <https://repositorio.uta.edu.ec/items/4778842a-b6d2-470d-84b4-f4a368c06dbf>

Peñañiel, D., Escobar, S., Gómez, J., y Manzanilla, C. (2023). Detección de *Shigella* spp. en muestras de carne de pollo que se expende en el cantón Ambato. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria Pentaciencias.*, 5(5), 644–655.

Red hidrometereológica de Tungurahua. (17 de mayo de 2024). Obtenido de <https://rrnn.tungurahua.gob.ec/red>

Reyes, J., González, M., Pibaque, M., y Ávila, J. (2019). Etiología de la diarrea infantil en Shushufindi, Ecuador. *Revista Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas Kasmera*, 47(1), 21–28.

Rodríguez, R., y Rosa, Y. (2022). Prevalencia de *Shigella* spp. y factores asociados en niños de edad escolar en una comunidad rural y urbana de Cajamarca. [Tesis de posgrado, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas] Repositorio académico UPC. <https://upc.aws.openrepository.com/handle/10757/667139>

Sabour, S., Teimourpour, A., Mohammadshahi, J., Peeridogaheh, H., Teimourpour, R., Azimi, T., y Hosseinali, Z. (2022). Molecular detection and characterization of *Shigella* spp. harboring extended-spectrum β -lactamase genes in children with diarrhea in northwest Iran. *Journal Molecular and Cellular Pediatrics*, 9(1), 5-19.

Sharma, B., Modgil, V., Mahindroo, J., Kumar, A., Kaur, V., Narayan, C., Verma, R., Mohan, B., y Taneja, N. (2023). Are non-lactose-fermenting *Escherichia coli* important diarrhoeal pathogens in children and adults? *Journal Access Microbiology*, 5(7), 1-17.

Sheikh, A. F., Moosavian, M., Abdi, M., Heidary, M., Shahi, F., Jomehzadeh, N., Seyed-Mohammadi, S., Saki, M., y Khoshnood, S. (2019). Prevalence and antimicrobial resistance of *shigella* species isolated from diarrheal patients in Ahvaz, Southwest Iran. *Journal Infection and Drug Resistance*, 12, 249–253.

Soto, J. (2024). Evaluación de antibiorresistencia de cepas de *Shigella* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua” [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato] Repositorio institucional UTA. https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/36415/simple-search?query=&sort_by=score&order=desc&rpp=10&filter_field_1=subject&filter_t

type_1>equals&filter_value_1=CARNE%20DE%20POLLO&etal=0&filtername=author&filterquery=Soto%20Villacis,%20Joselyn%20Anabel&filtertype>equals

Tamay, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2023). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Revista Medigraphic*, 2(2) 70–78.

Thiem, V. D., Sethabutr, O., Von, L., Van Tung, T., Canh, D. G., Chien, B. T., Tho, L. H., Lee, H., Houng, H. S., Hale, T. L., Clemens, J. D., Mason, C., y Trach, D. D. (2004). Detection of *Shigella* by a PCR Assay Targeting the ipaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2031–2035.

Vargas, M., Gascon, J., Jimenez, M. T., Anta, D. E., 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.

Vásquez, A., y Tasayco, W. (2020). Presence of pathogens in raw chicken meat in retail centers, Huánuco-Peru: A health problem. *Selva Andina. Journal Society*, 11(2), 130–141.

Vergara, G., y Caleño, C. (2019). Prevalencia de Enfermedades Diarreicas Agudas en niños de 0 a 5 años atendidos en el área de emergencia de un hospital de la ciudad de Guayaquil [Tesis de pregrado, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil]. Repositorio Digital UCSG <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/12572>

Villacrés, I., Alcocer, I., Zurita, J., y Rodríguez, M. (2015). Sensibilidad antimicrobiana y detección de genes de virulencia en aislados clínicos de *Shigella* spp. *Revista REMCB*, 36(2), 1–10.

Vivas, F. (2013). Estudio de la respuesta inmunológica mediada por IgA secretora contra *Shigella flexneri* en niños escolares expuestos a enfermedades intestinales. [Tesis de pregrado, Universidad Central de Venezuela]. Repositorio institucional UCV <http://saber.ucv.ve/handle/10872/15804>

Yang, F., Yang, J., Zhang, X., Chen, L., Jiang, Y., Yan, Y., Tang, X., Wang, J., Xiong, Z., Dong, J., Xue, Y., Zhu, Y., Xu, X., Sun, L., Chen, S., Nie, H., Peng, J., Xu, J.,

Wang, Y., y Jin, Q. (2005). Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Journal Nucleic Acids*, 33(19), 6445–6458.

Zaragoza, B., Carreto, S., y Almazan, C. (2021). Ingeniería de proteínas. *Journal Mens. Bioquím*, 45, 48–58.

Zhang, C. L., Liu, Q. Z., Wang, J., Chu, X., Shen, L. M., y Guo, Y. Y. (2014). Epidemic and virulence characteristic of *Shigella* spp. with extended-spectrum cephalosporin resistance in Xiaoshan District, Hangzhou, China. *Journal Bio Med Central Infectious Diseases*, 14(1),14-260.

Zulma, E., Cantaro, H., Almada, N., Ruiz, P., y Gange, J. (2018). Faena de Aves: Guía de buenas prácticas para el uso y construcción del faenador de aves. *Ed Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*.

Zúñiga, I., y Caro, J. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 37(3),95-104.

ANEXOS

Anexo 1. ADN puro de *Shigella* spp.



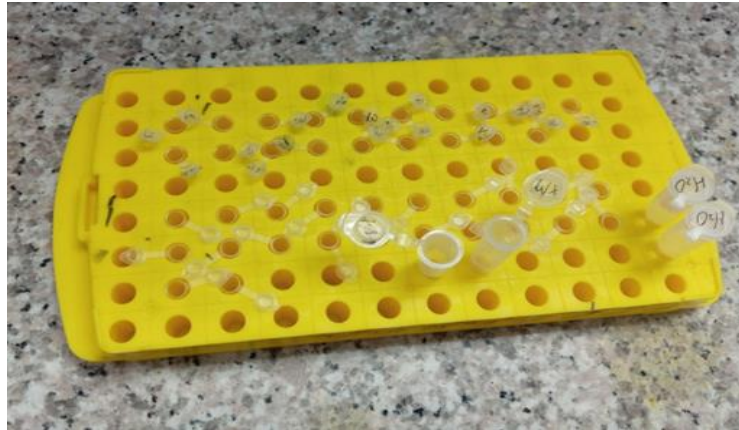
Anexo 2. Cálculo de dilución de ADN de *Shigella*

ID MUESTRA	ADN (μl)	AGUA (μl)
S1	8.4	91.6
S2	8.2	91.8
S3	10	90
S4	8.2	91.8
S5	7.8	92.2
S6	8.4	91.6
S7	9	91
S8	8.6	91.4
S9	6.2	93.8
S10	7.4	92.6
S11	8.2	91.8
S12	6.2	93.8
S13	7.6	92.4
S14	9.2	90.8
S15	9.4	90.6
S16	7.4	92.6
S17	8	92
Volumen final		100 μl

Anexo 3. Preparación de la Master Mix



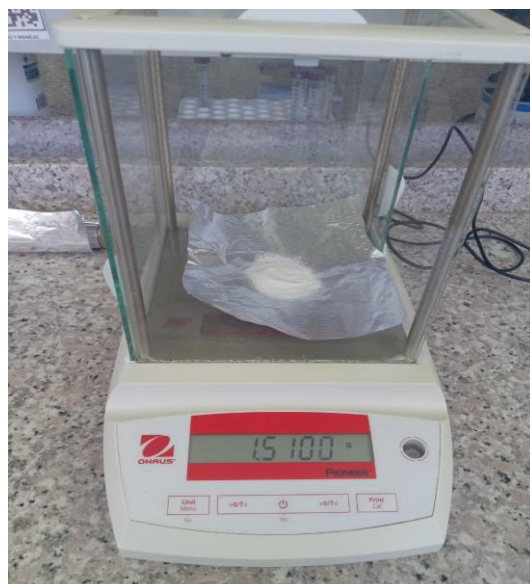
Anexo 4. Rotulación de los ependorfs y tubos para PCR



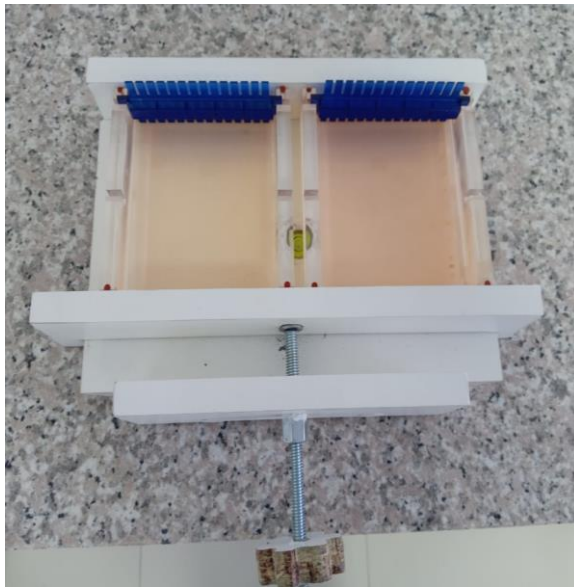
Anexo 5. Centrifugación de las muestras en el termociclador



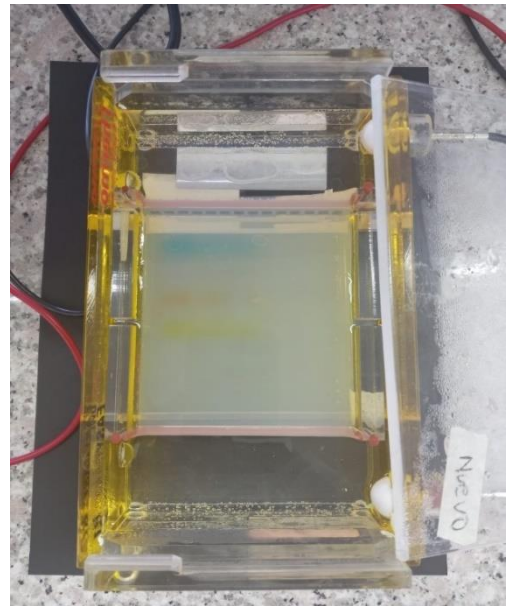
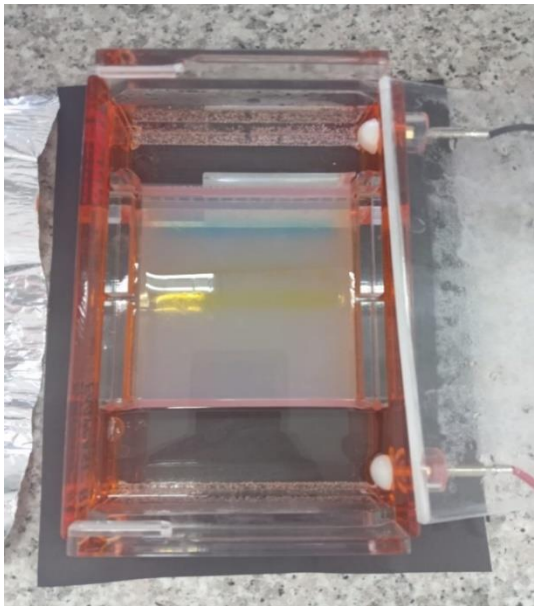
Anexo 6 . Pesaje del agar de tripticasa de soya



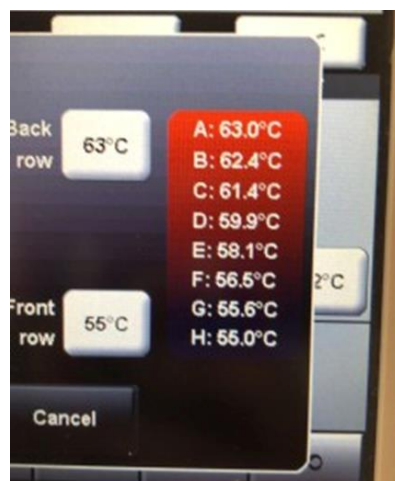
Anexo 7. Gel de agarosa



Anexo 8. Muestras corriendo a 100 voltios por una hora en las cámaras de electroforesis



Anexo 9. Programa instalado para el gradiente de temperatura



Anexo 10. Observación de los geles en el transiluminador de mesa

