

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA



TEMA DE INVESTIGACIÓN

"Evaluación de antibiorresistencia de cepas de *Shigella* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua"

AUTORA:

JOSELYN ANABEL SOTO VILLACIS

TUTORA:

Dra. SANDRA CRUZ, PhD

CEVALLOS – ECUADOR

2024

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

El suscrito, Joselyn Anabel Soto Villacis, portador de cédula de identidad número: 1850040120, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “Evaluación de antibiorresistencia de cepas de *Shigella* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua” es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



.....

Joselyn Anabel Soto Villacis

DERECHOS DEL AUTOR

Al presentar este Informe Final del Trabajo de Titulación titulado “Evaluación de antibiorresistencia de cepas de *Shigella* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua” 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.



Joselyn Anabel Soto Villacis

“Evaluación de antibiorresistencia de cepas de *Shigella* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua”

REVISADO POR:



.....
Dra. Sandra Cruz, PhD.

TUTORA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

Fecha

06/02/2024



.....
Ing. Núñez Torres Oscar Patricio, PhD

PRESIDENTA DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

06/02/2024



.....
Mvz. Vela Chiriboga Andrea Carolina, PhD

MIEMBRO DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

06/02/2024



.....
Mvz. Mg. Burgos Mayorga Ana Rafaela

MIEMBRO DE TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado primeramente a Dios, por permitirme llegar a este momento tan importante en mi formación profesional y me ha dado fortaleza para continuar.

A mi familia, en especial a mis padres Javier Soto y Marlene Villacis por ser el pilar más importante y por haberme guiado por el camino del bien, inculcándome valores. Por ser un gran ejemplo, porque me han enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos. A mi hermano porque de igual forma he podido contar con su apoyo.

“Pon todo lo que hagas en manos del Señor, y tus planes tendrán éxito”

Proverbios 16:3

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiar mis pasos, por ser mi inspiración constante y mi roca inquebrantable, dándome sabiduría, inteligencia, inspiración y mucha fortaleza ante cada desafío.

A mis padres por su apoyo incondicional, por ser mis grandes consejeros. A través de este trabajo deseo honrar su dedicación, trabajo y sacrificio, lo cual me ha permitido llegar a ser una profesional, gracias por siempre creer en mí.

Seguiré trabajando arduamente, persiguiendo mis metas con pasión dedicación, y siempre recordare el apoyo incondicional que me han brindado. Una vez más quiero agradecer de todo corazón por su amor, comprensión, respaldo durante esta travesía académica. La culminación de mi carrera no hubiera sido posible sin ustedes. Los quiero profundamente y espero que se sientan orgullosos de mí.

A mi tutora Dra. Sandra Cruz quiero expresar mi profundo agradecimiento por su orientación. Su experiencia, paciencia y apoyo han sido fundamentales para el desarrollo y la culminación de esta tesis. Aprecio sinceramente la generosidad con la que compartió su conocimiento y brindó valiosas sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Y termino agradeciendo a esas personas que Dios puso en mi camino, especialmente a mi novio Gabriel Villacrés gracias por brindarme tu apoyo, por estar a mi lado en las buenas y malas, dándome ánimo para seguir adelante.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes investigativos	3
1.2 Categorías fundamentales.....	7
1.2.1 Resistencia antibiótica.....	7
1.2.2 Mecanismos	7
1.2.2.1 Enzimas hidrolíticas:	7
1.2.2.2 Expulsión del antibiótico.....	7
1.2.2.3 Alteración de los receptores	8
1.2.3 Historia.....	8
1.2.3.1 Relación con otras bacterias	9
1.2.4 Características generales de <i>Shigella</i>	10
1.2.5 Taxonomía de <i>Shigella</i>	11
1.2.5.1 Especies	11
1.2.6 Transmisión.....	12
1.2.7 Pollo	13
1.3 Objetivos	13
1.3.1 Objetivo general	13
1.3.2 Objetivos específicos	13
1.4 Hipótesis.....	14
CAPÍTULO II	15
METODOLOGÍA	15
2.1 Ubicación.....	15
2.2 Características del lugar	15
2.3 Materiales y equipos.....	16
2.4 Factores de Estudio	17
2.5 Análisis estadístico	17
2.5.1 Tamaño de la muestra	17
2.5.2 Diseño experimental.....	18
2.6 Metodología.....	19

2.6.1	Fase 1. Refrescar las cepas de <i>Shigella</i> spp en Tripticasa de soya (TS)	19
2.6.1.1	Preparación del agar TS (TM MEDIA)	19
2.6.1.2	Siembra de cepas de <i>Shigella</i> spp en TS	20
2.6.2	Siembra de <i>Shigella</i> spp en Caldo Cerebro-Corazón (CC)	20
2.6.2.1	Preparación de Infusión Cerebro-Corazón (TM Media)	20
2.6.2.2	Siembra de colonias de <i>Shigella</i> spp en Caldo Cerebro Corazón	21
2.6.3	Siembra de <i>Shigella</i> spp en Müller Hinton (MH) para antibiorresistencia	21
2.6.3.1	Preparación de Agar Müller Hilton (TM Media)	21
2.6.3.3	Siembra de <i>Shigella</i> spp en agar MH	22
2.6.3.4	Colocación de los discos de antibióticos en las cajas petri	23
2.6.4	Lectura de resultados	23
2.6.5	Fase 2. Determinar el (CMI) de las cepas Sensibles a los antibióticos a través de microdilución	24
2.6.5.1	Refrescar las cepas de <i>Shigella</i> spp y sembrarlas en Tripticasa de soya (TS)	24
2.6.5.2	Caldo Luria Bertani (LB)	24
2.6.5.2.1	Preparación de Luria Bertani (TM MEDIA)	25
2.6.5.2.2	Preparación de solución madre de antibiótico	25
2.6.5.2.3	Preparación de la bacteria	27
2.6.5.2.4	Siembra en las microplacas	27
2.7	Variable respuesta	28
2.7.1	Cualitativa	28
2.7.2	Cuantitativa	29
2.8	Procesamiento de la información	29
CAPÍTULO III		30
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS		30
3.1	Prueba de antibiorresistencia (sensibilidad a los antibióticos)	31
3.2	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	39
3.2.1	CMI de Azitromicina (AZM)	40
3.2.2	CMI de Ciprofloxacina (CIP)	42
3.2.3	CMI De Ceftriaxona (CRO)	44
3.2.4	CMI de Amoxicilina + Ácido Clavulánico (AMC)	45
3.2.5	CMI de Gentamicina (CN)	48

3.3 Mecanismos moleculares de resistencia de <i>Shigella</i> spp a CIP, AMC, CRO, CN, AZM.....	49
3.3.1 Mecanismos de resistencia de <i>Shigella</i> spp a fluoroquinolonas	49
3.3.2 Mecanismos de resistencia de <i>Shigella</i> spp a Betalactámicos	52
3.3.3 Mecanismos de resistencia de <i>Shigella</i> spp a Aminoglucósidos	54
3.3.4 Mecanismos de resistencia de <i>Shigella</i> spp a Macrólidos	55
3.4. Verificación de Hipótesis	57
CAPÍTULO IV.....	58
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
4.1. Conclusiones	58
4.2. Recomendaciones	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Categoría taxonómica de <i>Shigella</i>	11
Tabla 2. Características del cantón Cevallos.....	15
Tabla 3. Materiales.....	16
Tabla 4. Discos de Antibióticos	17
Tabla 5. Halos de antibiorresistencia (mm).	23
Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	25
Tabla 7. Cálculo de dosis para preparar la solución madre de antibiótico.....	26
Tabla 8. Sensibilidad <i>in vitro</i> de cepas de <i>Shigella</i> spp. aisladas de carne de pollo frente a cinco antibióticos (Azitromicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Amoxicilina + Acido clavulánico y Gentamicina).....	31
Tabla 9. Efectividad de cinco antibióticos (Azitromicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Amoxicilina + Acido clavulánico y Gentamicina) mediante ensayo de sensibilidad <i>in vitro</i> de cepas de <i>Shigella</i> spp. aisladas de carne de pollo	34

Tabla 10. Sensibilidad in vitro de las tres especies del género <i>Shigella</i> aisladas de carne de pollo frente a cinco antibióticos (Azitromicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Amoxicilina + Acido clavulánico y Gentamicina).	36
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>Shigella</i>	10
Figura 2. Procedimiento de microdilución.....	28
Figura 3. Porcentaje de cepas sensibles a los fármacos	39
Figura 4. Curva de inhibición de la cepa más sensible y menos resistente a AZM ...	40
Figura 5. Curva de inhibición de la cepa más sensible y menos resistente.....	42
Figura 6. Curva de inhibición de la cepa más sensible y menos resistente a CRO....	44
Figura 7. Curva de inhibición de la cepa más sensible y menos resistente a AMC...	45
Figura 8. Curva de inhibición de la cepa más sensible y menos resistente a CN	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Tabulación resultados Fase 1 (Antibiorresistencia)	72
Anexo 2. Resultado del cálculo estadístico, Fase 1	72
Anexo 3. Actividades realizadas durante la fase 1	73
Anexo 4. Tabulación de resultados obtenidos en la segunda fase (CMI)	75
Anexo 5. Media de los resultados de la segunda fase	75
Anexo 6. Actividades realizadas durante la segunda fase.....	76

RESUMEN

Shigella spp exhibe mecanismos de resistencia ante los antibióticos notablemente elevados y muy desarrollados, lo cual constituye un desafío global para la salud pública. Una de las principales vías de transmisión de esta resistencia se observa en los alimentos de origen animal, resaltando que la falta de higiene y control sanitario en los centros de faenamiento contribuye a su propagación. El objetivo de esta investigación fue evaluar la antibiorresistencia de cepas de *Shigella* spp aisladas de carne de pollo en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua. Se trabajó con 17 cepas de *Shigella* spp sometidas a dos fases de investigación. En la primera fase, se utilizó el método fenotípico Kirby Bauer (disco-placa) para determinar si son resistentes, intermedias o susceptibles las cepas a un grupo de medicamentos que incluye Azitromicina (AZM), Gentamicina (CN), Ceftriaxona (CRO), Amoxicilina + ácido clavulánico (AMC) y Ciprofloxacina (CIP). Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney. Se obtuvo una resistencia del 82.4% a CIP, 64.7% para AMC, 29.4% a CRO, 23.5% a CN y 5.9% para AZM. En la segunda fase, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas que mostraron sensibilidad en la fase 1 a los antibióticos mencionados. Los resultados se analizaron descriptivamente mediante curvas, estableciendo las CMI para AZM 160 µg/ml, CN 10 µg/ml, AMC 160 µg/ml, CRO 1.25 µg/ml y CIP 20 µg/ml, siguiendo los puntos de corte de CLSI en 2016. Se consideró esencial investigar los mecanismos de resistencia exhibidos por *Shigella* spp. En primer lugar, se enfocó en las fluoroquinolonas, ya que este grupo mostró una resistencia significativa debido a la presencia de mutaciones cromosómicas. Además, se observó resistencia relacionada con la producción de BLEE para los betalactámicos, así como la alteración del sitio diana presentes en los aminoglucósidos, existencia de genes como *mphA* o *ermB* en los macrólidos.

Palabras clave: *Shigella* spp, antibiorresistencia, CMI, mecanismos, antibióticos.

ABSTRACT

Shigella spp exhibits remarkably high and highly developed antibiotic resistance mechanisms, which constitutes a global challenge for public health. One of the main routes of transmission of this resistance is observed in foods of animal origin, highlighting that the lack of hygiene and sanitary control in slaughter centers contributes to its spread. The objective of this research was to evaluate the antibioresistance of *Shigella* spp strains isolated from chicken meat in the city of Ambato, Tungurahua Province. We worked with 17 strains of *Shigella* spp subjected to two phases of research. In the first phase, the Kirby Bauer phenotypic method (disk-plate) was used to determine the resistance, intermediate or susceptibility of the strains to a group of drugs that includes Azithromycin (AZM), Gentamicin (CN), Ceftriaxone (CRO), Amoxicillin + clavulanic acid (AMC) and Ciprofloxacin (CIP). The results were analyzed using the Kruskal Wallis test, complemented by the Mann Whitney U test. A resistance of 82.4% was obtained for CIP, 64.7% for AMC, 29.4% for CRO, 23.5% for CN and 5.9% for AZM. In the second phase, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the strains that showed sensitivity in phase 1 to the aforementioned antibiotics was determined. The results were analyzed descriptively using curves, establishing the MICs for AZM 160 µg/ml, CN 10 µg/ml, AMC 160 µg/ml, CRO 1.25 µg/ml and CIP 20 µg/ml, following the CLSI cut-off points in 2016. It was considered essential to investigate the resistance mechanisms exhibited by *Shigella* spp. First, we focused on fluoroquinolones, as this group showed significant resistance due to the presence of chromosomal mutations. In addition, resistance related to the production of ESBL was observed for beta-lactams, as well as the alteration of the target site present in aminoglycosides, the existence of genes such as *mphA* or *ermB* in macrolides.

Keywords: *Shigella* spp, antibioresistance, MIC, mechanisms, antibiotics

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

En una década la utilización de antibióticos ha ido en aumento aproximadamente un 40%, pero su resistencia hoy en día se ha vuelto una amenaza mundial (**Bantawa et al., 2019**). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el progreso de bacterias resistentes a los fármacos como una crisis global (**Puzari et al., 2018**).

La consciencia sobre los patógenos que se transmiten por alimentos está aumentando ya que afectan la salud. La carga de enfermedades transmitidas a través del consumo de alimentos contaminados ha incrementado debido a la antibiorresistencia, lo que representa un mayor riesgo de fracaso del tratamiento (**Bantawa et al., 2019**). El alto nivel de bacterias que pueden ocasionar enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos representa un problema en la salud pública. Lo cual significa que es necesario implementar estrictos controles de higiene en toda la cadena alimentaria para mejorar las condiciones higiénicas durante el almacenamiento, procesamiento, y distribución de los alimentos (**Rabins, 2021**).

Hoy en día, la shigelosis es una de las importantes enfermedades que se transmite a través de los alimentos que representan un gran problema en la salud del mundo, especialmente en países en desarrollo. Afecta a personas de todos los grupos de edad, pero muy comúnmente en niños e individuos inmunocomprometidos. Esta enfermedad causa disentería bacilar en humanos, caracterizada por disentería de leve a grave, fiebre, calambres abdominales y deshidratación (**Rabins, 2021**).

El tratamiento con antibióticos para infecciones provocadas por *Shigella* desempeña un papel significativo en la disminución de la morbilidad y mortalidad de esta

enfermedad. Sin embargo, el tratamiento de estas infecciones sigue siendo un desafío ya que la resistencia de amplio espectro a muchos antibióticos va en aumento a nivel del mundo. La resistencia a los medicamentos en *Shigella* puede deberse a muchos mecanismos, como la disminución de la permeabilidad celular, la extrusión de fármacos por bombas de flujo activas, mutación y la sobreexpresión de enzimas modificadoras e inactivadoras de fármacos. Por esta razón, además de prestar más atención a esta infección existe una gran necesidad de identificar y desarrollar estrategias de tratamiento alternativo que proporcionen herramientas innovadoras para combatir las infecciones por *Shigella* (Ranjbar & Farahani, 2019).

Con respecto a lo mencionado anteriormente el presente trabajo de titulación busca evaluar la antibiorresistencia de cepas de *Shigella*, las cuales ya fueron aisladas en anteriores estudios de muestras en carne de pollo que son vendidas en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, para proporcionar información significativa sobre la capacidad de *Shigella* para inhibir los mecanismos de acción de los antibióticos, también se determinará las dosis efectivas de las cepas que se muestren sensibles a los diferentes fármacos para detener el crecimiento bacteriano.

Se realizará en 3 fases, en la fase uno se empleará el método de kirby Bauer el cual clasificará las cepas como Sensibles (S), Intermedias (I) y Resistentes (R), a través de la medición de los halos y puntos de corte que nos indica el (CLSI, 2016) The Clinical & Laboratory Standards Institute. En la fase dos solo se trabajará con las cepas sensibles, en la que se llevará a cabo el CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) a través de la dilución de los fármacos y un espectrofotómetro, el mismo que nos dará los resultados de la medición de densidad óptica del medio de cultivo y será interpretado por la curva de crecimiento. En la fase tres se establecerá los mecanismos de resistencia de *Shigella* por revisión bibliográfica.

Esta investigación tiene un enorme peso para la salud pública ya que la carga de enfermedades que se transmiten al consumir alimentos contaminados ha incrementado

debido a la antibiorresistencia, además tiene relación con medicina veterinaria, ya que *Shigella* es una de las bacterias más importantes que se transmite por los alimentos principalmente a través de la carne. Al igual que otros tipos de carnes, la de pollo se considera un importante reservorio de bacterias patógenas y es riesgoso para la salud pública debido a que es un producto cárnico con más demanda en nuestro país.

1.1 Antecedentes investigativos

En el año 2021 se hizo una investigación en Irán, con el fin de investigar la resistencia antimicrobiana entre las especies de *Shigella*. Recolectaron 165 muestras de leche fresca, ensalada de verduras y carne picada. También recogieron 906 muestras de heces. Los resultados obtenidos fueron (4.84%) muestras de alimentos que contenían *Shigella sonnei*. De los aislamientos fecales obtuvieron *S. boydii* 2,85%, *S. flexneri* 5,71% y *S. sonnei* 91,42%. No hubo *S. dysenteriae*. De los aislados alimentarios, un 62,5 % mostraron resistencia para tetraciclina, ante amikacina todos los aislamientos fueron susceptibles y el 50% mostraron multirresistencia. Un dendrograma obtenido por RAPD-PCR mostró que las cepas aisladas de muestras de alimentos y heces pertenecían al mismo grupo. En cuanto a la genética existe un estrecho vínculo entre las muestras de heces y las cepas de *Shigella* obtenidas de alimentos y por lo tanto, no se debe descartar que los alimentos pueden ser los principales transmisores de *Shigella* spp (Pakbin, Didban et al., 2021).

En el año 2016 se publicó un artículo, el cual fue realizado en la Universidad Arba Minch, Etiopía del Sur, con el fin de determinar la prevalencia, patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos y los factores de riesgo asociados de *Shigella* y *Salmonella*. Recolectaron muestras de heces de 345 trabajadores de la industria alimentaria y las analizaron en busca de patógenos. Para ello, realizaron pruebas bioquímicas para identificar las especies patógenas y prueba de susceptibilidad mediante la técnica en disco (Kirby-Bauer). El resultado fue un 6,9% de aislados de *Salmonella* y un 3% de aislamientos de *Shigella*. Todos los aislamientos bacterianos

mostraron resistencia para amoxicilina-ácido clavulánico 35%, claritromicina 41% y amoxicilina 100%. El estado de las uñas, lavado de las manos luego de hacer uso del baño y la manipulación de los alimentos con las manos desnudas fueron predictores independientes de enfermedades intestinales (**Mama & Alemu, 2016**).

En el año 2020 se publicó un artículo con el tema de investigación de la diversidad del deterioro y las bacterias que intoxican los alimentos de la carne de pollo de Biratnagar, Nepal, con el objetivo de investigar la diversidad de población microbiana como *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio*, *E. coli* y *Staphylococcus*, de la carne de pollo cruda y su resistencia a los antibióticos. Se obtuvieron las principales bacterias *Vibrio* 13,3%, *Staphylococcus epidermidis* 33,3%, *Staphylococcus aureus* 40 %, *E. coli* 46,7 %, *Pseudomonas aeruginosa* 46,7%, *Salmonella* 53,3% y *Shigella* 60%. El 37,5% de *Shigella* eran resistentes a cefotaxima y levofloxacina; mientras que el 12,5% mostraron resistencia a la amoxicilina (**Mahato et al., 2020**).

En el año 2021 se realizó un estudio para evaluar el número genotípico y fenotípico, también la tasa de prevalencia, en cuanto a la resistencia a los antibióticos, a partir de 405 muestras alimentarias, leche fresca, carne molida y ensalada de verduras. La tasa de prevalencia de *Shigella* en aislados alimentarios fue 4,44%. La frecuencia de *S. flexneri* 0,74% fue menor que la de *S. sonnei* 3,7% *S.* Mientras que *S. boydii* y *S. dysenteriae* no se hallaron en las muestras analizadas. Esta investigación señaló que los aislamientos de *Shigella* mostraron resistencia a cloranfenicol 50%, azitromicina 50%, amoxicilina-ácido clavulánico 50 %, ampicilina 50 %, tetraciclina 61,1 %, estreptomina 66,6 %, amoxicilina 66,6 % y sulfametoxazol/trimetoprima 83,3 % y fueron sensibles a gentamicina, amikacina, cefepima y cefoxitina. Todos los aislamientos de *Shigella* presentaron multiresistencia (**Pakbin, Amani, et al., 2021**).

En el año 2018 se hizo un estudio con el objetivo de evaluar la calidad bacteriológica, haciendo hincapié en el aislamiento de *Vibrio*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, en la carne cruda que se distribuye en Dharan, este

de Nepal. Recolectaron 50 muestras de carne de los mercados. Encontrando coliformes en el 84% de las muestras, obteniendo *S. aureus* (68%), *Salmonella* en el 34% de las muestras, *Shigella* 6%, *Vibrio* presente en solo 3 muestras y *P. aeruginosa* se aisló en el 40% de las muestras. Mayor carga microbiana y presencia de bacterias intestinales *Vibrio*, *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella* muestran que la carne se encuentra contaminada del contenido de vísceras y que los consumidores que la comen cruda tiene riesgo de adquirir una enfermedad (**Bantawa et al., 2018**).

En el año 2019 se realizó una investigación para evaluar la contaminación de bacterias aisladas en la carne de pollo cocida recolectada en varias tiendas en Dhaka, Bangladesh. Para lo cual, se analizan muestras para identificar bacterias patógenas entéricas en la carne de pollo. Obteniendo como resultados el aislamiento de tres géneros de bacterias. Los aislamientos se identificaron como *Shigella*, *Salmonella* y *E. coli* a través del método de cultivo convencional. Se sometieron los tres patógenos entéricos a pruebas de PCR para confirmar su virulencia. Solo se corroboró que los aislados de *E. coli* eran *E. coli* patógena (enterotoxigénica). Los resultados de esta investigación sugieren tener más precaución en la higiene del personal, al procesar y manipular productos avícolas (**Uddin et al., 2019**).

En el año 2022 se llevó a cabo una revisión bibliográfica con el objetivo de resaltar la importancia de los patógenos zoonóticos bacterianos transmitidos por la carne, la importancia de los patógenos transmitidos por la carne para la transmisión global de enfermedades y la seguridad alimentaria es significativa para la salud pública. El consumo de carne o productos cárnicos contaminados con patógenos provoca una variedad de enfermedades bacterianas causadas por cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Brucella*, y toxinas producidas por *Staphylococcus aureus*, especies de *Clostridium*. Igualmente, el consumo de carne y productos cárnicos contaminados con bacterias resistentes a los medicamentos supone un grave riesgo para la salud pública (**Ali & Alsayeqh, 2022**).

Ese mismo año se realizó un estudio con el objetivo de evaluar las propiedades microbiológicas y presencia de *Shigella* en niños que presentaban diarrea aguda, que los atendieron en el hospital infantil de Posadas. Se utilizaron métodos microbiológicos estándar. Se aislaron 106 de 2128 (5%) de *Shigella*, con una mayor repetición en los días de verano 54,5%. Prevalcieron *S. flexneri* 60,4% y *S. sonnei* 34,9%. Los menores a 5 años fueron los más afectados 70 %. La tasa general de resistencia a la ampicilina fue del 72,7% y al trimetoprim-sulfametoxazol del 58,1%. El 97% eran sensibles a quinolonas fluoradas, la furazolidona y la cefpodoxima. Encontraron 6 fenotipos con tasa baja de resistencia a múltiples medicamentos 2,6% **(Del Valle et al., 2022)**.

En el año 2022 se publicó un artículo que tenía como objetivo aislar y determinar los patrones de susceptibilidad a los antibióticos de las especies de *Salmonella* y *Shigella* en niños con diarrea aguda. En cuanto al perfil de susceptibilidad a los fármacos de las cepas que se aislaron se evaluó mediante el método Kirby Bauer. Se aisló enteropatógenos. Se obtuvieron 260 muestras de heces, de las cuales fueron aisladas un total de 120 patógenos entéricos. Las tasas de aislamiento se obtuvieron los siguientes resultados *Salmonella* (7,3%), *Shigella* (6,9%) y parásitos intestinales (31,9%). La mayor parte de los aislados de *Shigella* resultaron resistentes a cloranfenicol 55,6%, cotrimoxazol 55,6%, tetraciclina 77,8 y ampicilina 88,9%. Se observó resistencia a múltiples fármacos en 16(88,9%) para *Shigella* **(Gebreegziabher et al., 2018)**.

En el año 2021 se realizó una revisión bibliográfica para conseguir información acerca de los principales patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos. En ausencia de subgrupos, analizaron las estimaciones de prevalencia agrupadas de patógenos bacterianos en general, así como heces humanas y muestras ambientales. En la estimación de la prevalencia combinada aleatoria general de patógenos bacterianos por alimentos se encontró *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella* y *Campylobacter* spp y fue del 8%, con estimaciones estadísticamente más altas ($P < 0,01$) en muestras ambientales 11% que en heces humanas 6% **(Dinaol et al., 2021)**.

1.2 Categorías fundamentales

1.2.1 Resistencia antibiótica

La resistencia a los antibióticos es una capacidad que tienen las bacterias para resistir los efectos de los fármacos; esta es una habilidad adquirida o una propiedad inherente de las bacterias mientras dura la infección (**Giono et al., 2020**).

La OMS ha reconocido que hoy en día el desarrollo de las bacterias resistentes a los medicamentos es una crisis global. Esto ha llevado a una tasa de fracaso cada vez mayor en tratar las enfermedades a consecuencia de las bacterias, dado que los medicamentos a los que antes eran sensibles ya no dan resultado (**Puzari et al., 2018**).

1.2.2 Mecanismos

Las bacterias pueden tener resistencia intrínseca debido a sus propiedades innatas o adquirir esta resistencia a través de transferencia de genes y mutaciones. Entre los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos están:

1.2.2.1 Enzimas hidrolíticas: Hace referencia a la capacidad que poseen las bacterias para producir una enorme cantidad de enzimas que inhiben y modifican la acción de los antibióticos (**Puzari et al., 2018**).

1.2.2.2 Expulsión del antibiótico: Las bacterias poseen la capacidad para expulsar los fármacos desde el interior de la célula, mediante la formación de una bomba de eflujo, el cual expulsa el fármaco sin dañar a la célula bacteriana (**Puzari et al., 2018**).

1.2.2.3 Alteración de los receptores: Se produce una mutación que modifica el receptor microbiano, inhibiendo la unión del receptor a los antibióticos bloqueando los efectos del antibiótico (**Puzari et al., 2018**).

Shigella utiliza mecanismos de unión, invasión, motilidad intracelular, secreción de toxinas y mecanismos de interrupción de la célula huésped, causando diarrea leve, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en humanos a través de la secreción de proteínas denominadas efectores, toxinas, evasión del sistema inmunitario de la célula huésped (**Pakbin et al., 2023**).

La antibiorresistencia se produce a través de varios mecanismos que impiden la absorción del antibiótico, dichos mecanismos son capaces de alterar al antibiótico, disminuyen la afinidad con el objetivo del antibiótico, biotransformación celular. La primera barrera frente a la penetración del antibiótico son las paredes celulares de los microorganismos. Algunos cambios que se producen en la membrana como la permeabilidad o alteraciones logran provocar la pérdida de porinas, lo que implica un incremento de la concentración mínima inhibitoria (**Ranjbar & Farahani, 2019**).

1.2.3 Historia

Shigella fue aislada por primera vez en el año 1898 por el microbiólogo japonés Kiyoshi Shiga, quien le dio el nombre de bacilo de Shiga, hoy en día conocida como *Shigella*. Durante años *Shigella* ha confirmado ser un modelo singular de patógeno bacteriano invasivo y ha servido como paradigma para el estudio de otras bacterias. Además de la invasión de las células epiteliales, algunos de estos rasgos compartidos incluyen la resistencia a múltiples antibióticos, la producción de toxinas, motilidad intracelular, inducción de apoptosis e inflamación. (**Lampel et al., 2018**).

Esta bacteria ha sido la responsable de ocasionar disentería bacilar en el despliegue de tropas y operaciones militares, no obstante, la historia de *Shigella* es más importante. El impacto que produce la infección para la salud pública sigue intacto incluso más de 100 años luego de su descubrimiento. La historia de la investigación de *Shigella* proporciona conocimiento sobre los avances tecnológicos, las enfermedades infecciosas bacterianas y la evolución de los paradigmas en el pensamiento sobre estos patógenos en el siglo pasado (**Lampel et al., 2018**).

1.2.3.1 Relación con otras bacterias

Las especies de *Shigella* están relacionadas con *E. coli* taxonómicamente, en efecto, recientes estudios moleculares califican a *Shigella* dentro de la especie de *E. coli* y las dos bacterias continúan teniendo diferentes nombres por razones médicas e históricas más que genética. La pérdida e inactivación de genes a gran escala distinguen el cromosoma de *E. coli* del de *Shigella* (**Bliven & Lampel, 2017**).

Debido a la estrecha relación genética entre *Shigella* y *E. coli* permitió una aplicación temprana de herramientas genéticas usadas en *E. coli* para estudiar los mecanismos patogénicos de *Shigella*. El descubrimiento de estos mecanismos patogénicos compartidos entre estas dos bacterias ayudado al avance de nuestro conocimiento y ha afirmado uno de los conceptos primordiales de la evolución: cuando un organismo halla una manera de sobrevivir o adaptarse a su nuevo entorno, la selección natural empujará a otros organismos a seguir el mismo camino (**Lampel et al., 2018**).

Aunque hay modelos animales para diversos patógenos bacterianos que infectan al ser humano, los estudios de *Shigella* se han limitado a los primates, ya que estos son los únicos animales que reproducen fielmente la disentería cuando son expuestos a esta bacteria. Sin embargo, aunque tiene una estrecha relación con *E. coli* y ha evolucionado a partir de ella, *Shigella* es un patógeno bacteriano adaptado altamente

al huésped (humano) sin reservorio ambiental o animal (**Lampel et al., 2018**).

1.2.4 Características generales de *Shigella*

Shigella es un bacilo gramnegativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, con forma de bastón, pequeño, no forma esporas, no tiene cápsula, anaerobio facultativo, pero se multiplica mejor en condiciones aerobias, no fermenta lactosa, es inmóvil y es la responsable de diarrea aguda que puede progresar a diarrea mucoide con sangre, también conocida como disentería bacilar (**Rabins, 2021**). Las colonias de *Shigella* son transparentes, circulares, convexas y con bordes intactos que consiguen casi dos milímetros de diámetro en 24 horas (**Duarte et al., 2021**).

Figura 1. Morfología de *Shigella*



Fuente: (**Juneja et al., 2023**)

Puede sobrevivir a un bajo pH porque tiene pocas dificultades de lograr traspasar la barrera ácida gástrica, seguidamente invade las células del epitelio del colon (células mostradoras de antígenos) diseminándose, y luego de la multiplicación intracelular se provoca una lesión y por ende la muerte de la célula, siendo estos dichos procesos mediados por un plásmido que se encuentra en todas las cepas de *E. Coli* y *Shigella* (**Rabins, 2021**).

1.2.5 Taxonomía de *Shigella*

Tabla 1. Categoría taxonómica de *Shigella*

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

Fuente: (NCBI, 2023).

1.2.5.1 Especies

Shigella es la causa más habitual de enfermedad diarreica y continúa siendo un importante patógeno ya que es el responsable del aumento de las tasas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Entre los serotipos de las cuatro especies de *Shigella*, el tipo 1 *S. dysenteriae*, es el más virulento al presentar genes que se encargan de codificar para producir una potente citotoxina, conocida como toxina Shiga, produce el síndrome hemolítico-urémico, y causa una mortalidad del 20%. Este serotipo está presente con una alta frecuencia en los países de bajos recursos y que poseen inadecuadas condiciones de higiene, relacionándose con brotes epidémicos con una alta tasa de mortalidad (Ministerio de Salud, 2019).

Por otro lado, las cepas de *S. flexneri* predominan en los países en desarrollo, y produce una artritis reactiva (síndrome Reiter) asociada infección por bacterias. Mientras tanto *S.*

sonnei prevalece en países desarrollados y causa una baja mortalidad, mientras que *S. boydii* se está presente especialmente en el subcontinente de la India. En relación a las estaciones del año la infección causada por *Shigella* suele ser más habitual a principio de otoño y en verano en lugares templados, en cambio en las zonas tropicales es más frecuente en las temporadas lluviosas (**Ministerio de Salud, 2019**).

1.2.6 Transmisión

Varios patógenos que se transmiten por los alimentos, incluidos *Campylobacter*, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Vibrio* y *Shigella*, logran contaminar la carne e infectar a los humanos si se consume poco cocida o al manipularlos crudos (**Julqarnain et al., 2022**). Es una bacteria que se transmite con gran facilidad, por lo tanto, es una gran problema en la salud pública, la dosis infectiva es de 10 a 100 ufc/g de alimento, en tanto que para otras bacterias como *Vibrio* es de 108 ufc/g de alimento y para *Salmonella* es de 105 ufc/g de alimento (**Ranjbar & Farahani, 2019**).

El género *Shigella* es un patógeno natural exclusivo de los humanos y algunos primates y pueden continuar eliminando la bacteria en las heces durante varias semanas después de sufrir diarrea sanguinolenta. Los portadores asintomáticos también pueden transmitir la enfermedad. *Shigella* reside en el tracto gastrointestinal de los individuos infectados y se transmite especialmente por vía fecal-oral, contacto directo (persona a persona) y por contacto con heces infectadas. También puede ser transmitido por contacto indirecto a través de moscas, fómites, o el consumo de alimentos o agua contaminada (**OMS, 2022**). *Musca domestica*, la mosca doméstica común, actúa como vector de transmisión del patógeno (**Puzari et al., 2018**).

1.2.7 Pollo

En Ecuador, uno de los productos cárnicos más consumidos es el pollo, y son una importante fuente de proteína animal con un consumo per cápita de 27.31 Kg/persona/año (Conave, 2019). Normalmente, se puede encontrar muy pocos o ningún microorganismo en la carne de animales sanos, ya que la contaminación bacteriana es producida por una mala higiene que surge del sacrificio, procesamiento, transporte, distribución y almacenamiento (Bantawa et al., 2019).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la antibiorresistencia de cepas de *Shigella* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia Tungurahua.

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar la antibioresistencia por el método de difusión en agar (Kirby Bauer).
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los fármacos a los que fueron sensibles las bacterias *Shigella flexneri*, *S. sonnei* y *S. dysenteriae*.
- Describir el mecanismo de resistencia de *Shigella flexneri*, *S. sonnei* y *S. dysenteriae* ante los antibióticos resistentes.

1.4 Hipótesis

H0: No existe antibiorresistencia de cepas de *Shigella* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia Tungurahua.

H1: Si existe antibiorresistencia de cepas de *Shigella* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia Tungurahua.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación

La localización de esta investigación se desarrollo en el Laboratorio de Biología Molecular situado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato, cantón Cevallos en la provincia de Tungurahua, con una extensión de 19,000 km², latitud 1°22'08.7", altitud de 2.882 msnm, y longitud 78° 36'23.8".

2.2 Características del lugar

Tabla 2. Características del cantón Cevallos

Parámetro	Valor
Temperatura media promedio, °C	13 a 16
Clima	Ecuatorial Meso Térmico Seco
Precipitación, mm	200 – 500
Velocidad del viento, m/s	2.1 – 8.9
Humedad relativa, %	60 – 75

Fuente: (GAD-Cevallos, 2011)

2.3 Materiales y equipos

Tabla 3. Materiales

Materiales de laboratorio	
<input type="checkbox"/> Cajas Petri	<input type="checkbox"/> Portaobjetos
<input type="checkbox"/> Gradillas	<input type="checkbox"/> Mascarilla
<input type="checkbox"/> Asas de siembra	<input type="checkbox"/> Cucharas de medición
<input type="checkbox"/> Varilla de agitación	<input type="checkbox"/> Cofia
<input type="checkbox"/> Vasos de precipitación	<input type="checkbox"/> Mandil
<input type="checkbox"/> Cofia	<input type="checkbox"/> Zapatones
<input type="checkbox"/> Papel de Aluminio	<input type="checkbox"/> Tubos Eppendorf
<input type="checkbox"/> Micropipeta	<input type="checkbox"/> Puntas de micropipeta
<input type="checkbox"/> Mecheros bunsen	<input type="checkbox"/> Cintas testigo
<input type="checkbox"/> Guantes de látex	<input type="checkbox"/> Bolsas ziploc
<input type="checkbox"/> Papel Kraft	<input type="checkbox"/> Hisopos
<input type="checkbox"/> cuvvets	<input type="checkbox"/> Palitos de naranja
<input type="checkbox"/> Microplatos 96 pocillos	<input type="checkbox"/> Tubos de ensayo
Reactivos	
<input type="checkbox"/> Agar tripticasa de soya	<input type="checkbox"/> Discos de antibiograma
<input type="checkbox"/> Infusión cerebro - corazón.	<input type="checkbox"/> Luria bertani broth Miller
<input type="checkbox"/> Agar Müller Hilton	<input type="checkbox"/> Antibióticos inyectables
<input type="checkbox"/> Alcohol	<input type="checkbox"/> Cloro
<input type="checkbox"/> Agua destilada	
Equipos	
<input type="checkbox"/> Lector de microplacas	<input type="checkbox"/> vórtex
<input type="checkbox"/> Autoclave	<input type="checkbox"/> Nevera
<input type="checkbox"/> Incubador	<input type="checkbox"/> Espectrofotómetro
<input type="checkbox"/> Agitador magnético con plancha de calentamiento	<input type="checkbox"/> Balanza Analítica FC 2000 (2000 g; 0,01 g)
Insumos para la oficina	
<input type="checkbox"/> laptop	<input type="checkbox"/> Celular
<input type="checkbox"/> Cuaderno	<input type="checkbox"/> Impresora
<input type="checkbox"/> Esferográficos	<input type="checkbox"/> marcador
<input type="checkbox"/> Cinta maski	

2.4 Factores de Estudio

Tabla 4. Discos de Antibióticos

Fármaco	Simbología	Descripción
Azitromicina	AZM 15 µg	Los macrólidos, inhiben la síntesis de las proteínas de la bacteria uniéndose a la subunidad 50 S del ribosoma e inhiben la translocación del péptido.
Ceftriaxona	CRO 30 µg	Cefalosporina de tercera generación, tiene efecto bactericida ya que es capaz de inhibir la síntesis de las paredes celulares bacterianas.
Amoxicilina + ácido clavulánico	AMC 20/10 µg	Betalactámico junto a un inhibidor de betalactamasas, inhibe la síntesis de paredes bacterianas y previene la actividad enzimática bacteriana resistentes a los medicamentos.
Ciprofloxacina	CIP 5 µg	Fluoroquinolona, inhibe el superenrollamiento del ADN por la girasa, bloqueando la replicación del ADN bacteriano.
Gentamicina	CN 10 ug	Aminoglucósido, acción bactericida por unión irreversible a la subunidad del ribosoma bacteriano 30S, evitando la síntesis proteica.

Fuente: (Elaboración propia)

2.5 Análisis estadístico

2.5.1 Tamaño de la muestra

Se trabajó con un total de 17 muestras identificadas molecularmente de *Shigella* spp, las mismas se encuentran conservadas en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad Técnica de Ambato.

2.5.2 Diseño experimental

Esta investigación se realizó en tres fases:

Fase 1: Se determinó la sensibilidad bacteriana de cada cepa de *Shigella* spp a los diferentes discos de antibióticos, la variable a considerar será la respuesta de Sensibilidad (S) o Resistencia (R) ante los antibióticos evaluados.

Los datos de esta primera fase al ser variables cualitativas no presentaron una distribución normal ni homogeneidad, por lo tanto, el análisis estadístico se realizó con pruebas no paramétricas utilizando la prueba Kruskal Wallis complementada con el test U de Mann Whitney, utilizando el paquete SPSS 26.0, con un nivel de significancia del 95%.

Fase 2: Las cepas que fueron sensibles en la fase 1 frente a los diferentes antibióticos, fueron evaluados para determinar Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) empleando diferentes concentraciones del antibiótico, tomando en cuenta las directrices establecidas por la (CLSI, 2016) Clinical Laboratory Standard Institut. Esta evaluación se realizará midiendo densidad óptica en el espectrofotómetro (# de bacterias/ml).

Los datos de la segunda fase, se tabularon en Microsoft Excel 2016 y se hizo un análisis estadístico descriptivo, para que de esta manera los datos obtenidos se describieran en forma de tablas y gráficos.

Fase 3: Los resultados obtenidos fueron presentados y analizados mediante el estudio bibliográfico de los mecanismos moleculares de resistencia con cada uno de los antibióticos.

2.6 Metodología

Las 17 cepas de *Shigella* spp que ya fueron identificadas molecularmente en anteriores estudios, cada inóculo estaba conservado en eppendorfs, etiquetadas con su respectivo nombre, colocados en gradillas para crioviales y envueltas en papel aluminio para conservar mejor la temperatura adecuada de -20°C en el Laboratorio de Biología Molecular situado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Técnica de Ambato.

2.6.1 Fase 1. Refrescar las cepas de *Shigella* spp en Tripticasa de soya (TS)

Agar Tripticasa de soya, es un medio no selectivo, siendo medio óptimo para el crecimiento y enriquecimiento de bacterias dificultosas de aislar, principalmente anaerobias, la cual ayuda al crecimiento de microorganismos exigentes, sus ingredientes principales son cloruro de sodio el cual ayuda al equilibrio del balance osmótico y peptona de soya que actúa como promotor de crecimiento (TM MEDIA, 2014).

2.6.1.1 Preparación del agar TS (TM MEDIA)

1. Primeramente, se esterilizó los materiales para poder preparar el agar.
2. Luego se pesó 40 mg, y se mezcló en 1 litro de agua destilada en una botella de vidrio.
3. Se esterilizó en la autoclave a una temperatura de 120°C durante 30 minutos.
4. Al final, se puso el agar en cajas Petri
5. Después de 15 minutos se voltearon las cajas y se procedió a envolver en papel aluminio para conservarlas en la refrigeradora para usarlas el día que se realizó la siembra.

(TM media, 2014)

2.6.1.2 Siembra de cepas de *Shigella* spp en TS

1. Se sacaron los eppendorfs que tenían las cepas que íbamos a trabajar, se atemperaron unos 10 minutos, en un cuarto que previamente se había preparado con un ambiente completamente estéril, encendiendo mecheros de bunsen.
2. Se rotularon las cajas Petri con nombre de la cepa y su respectivo número.
3. Se utilizó un palito de naranjo previamente esterilizado para tomar una pequeña cantidad de bacteria de cada eppendorf.
4. Se colocó una gota en la caja petri y se esperó a que seque por completo.
5. Luego se procedió a estriar con un asa estéril.
6. Al final, se puso en la incubadora durante 24 horas a 37°C.

2.6.2 Siembra de *Shigella* spp en Caldo Cerebro-Corazón (CC)

Se utilizó para preparar los inóculos para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. El caldo BHI (brain heart infusion broth) también es el medio preferido para bacterias anaerobias, levaduras y mohos. Este medio es muy nutritivo ya que entre sus ingredientes principales tiene: corazón de bovino y corazón de ternera que ayudan en el crecimiento de una amplia variedad de organismos. También está compuesto por peptona la cual contribuye con aminoácidos, vitaminas, nitrógeno, péptidos y carbono y ayuda al desarrollo de las colonias (TM MEDIA, 2019a).

2.6.2.1 Preparación de Infusión Cerebro-Corazón (TM Media)

1. Primeramente, se esterilizó los materiales que se vayan ocupar para preparar la infusión cerebro corazón (ICC).
2. Se pesaron 37 g del polvo y se añade a 1 litro de agua purificada o destilada.
3. Se esterilizó la mezcla en autoclave a 120°C durante 30 minutos.

4. Se dejó que se atempere la mezcla.
5. Se rotuló cada tubo de ensayo con el número de la cepa y nombre, # de réplica.
6. Se colocó 5ml de la preparación en los tubos de ensayo y se fue colocando los tapones.

(TM MEDIA, 2019a)

2.6.2.2 Siembra de colonias de *Shigella* spp en Caldo Cerebro Corazón

1. Se tomó con un asa estéril de 5 a 6 colonias de la placa de TS, en la cual ya se había sembrado un día antes y tiene un tiempo de incubación de 24 h.
2. Se colocó las cepas en los respectivos tubos de ensayo que ya se llenaron con CC.
3. Finalmente se puso en la incubadora por un tiempo de 3 horas a 37°C.

2.6.3 Siembra de *Shigella* spp en Müller Hinton (MH) para antibiorresistencia

El agar Mueller Hinton se utilizó para la determinar si la cepa es sensible a los discos de fármacos. Es un agar estándar para las pruebas de susceptibilidad bacteriana y su desempeño está de acuerdo con la CLSI por varias razones: Demuestra una mezcla homogénea por lotes, es reproducible para ensayos sensibles, tiene niveles bajos de inhibidores de tetraciclina, sulfonamida y trimetoprima, es compatible con el crecimiento de la mayor parte de bacterias. Entre sus ingredientes principales están: infusión de carne, almidón, peptona ácida de casina y sangre de ovino (TM MEDIA, 2019b).

2.6.3.1 Preparación de Agar Müller Hilton (TM Media)

1. Se esterilizó los materiales en la autoclave a 120°C.

2. Se pesaron 38g y se mezcló en un litro de agua destilada.
3. Se esterilizó la mezcla en la autoclave a 120°C por 30 minutos.
4. Se distribuyó el agar sobre las cajas Petri plásticas.
5. Se esperó 10 min que solidifique y se procedió a voltearlas.
6. Se dejó almacenado en la refrigeradora hasta el día que se realizó la siembra.

Nota: Los agares se preparaban un día antes

(TM MEDIA, 2019b)

2.6.3.2 Medición de la turbidez con densidad en el espectrofotómetro

Transcurridas las 3 horas de la siembra en los tubos de ensayo se procedió a medir la turbidez. Para medir se tomó un tubo control igual a 0,5 o sea con una turbidez de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, se agitó el tubo en un vórtex y con luz, comparáramos la turbidez con la suspensión bacteriana del medio de cultivo líquido, si se llegaba a sobrepasar el valor de la escala se ajustó la turbidez del inóculo con suero fisiológico (Ulloa, 2015).

2.6.3.3 Siembra de *Shigella* spp en agar MH

1. Una vez ya ajustado el inóculo a 0.5, seguidamente se sumergió un hisopo previamente esterilizado en la suspensión bacteriana y se fue presionando fijamente en las paredes internas del tubo de ensayo para tener una cantidad correcta del inóculo.
2. Seguidamente se procedió a sembrar en las placas Petri que contenían el agar MH, ya rotuladas con nombre de la cepa, se trabajaron con 3 réplicas, se fue realizando estrías con ayuda del hisopo en cuatro orientaciones para que este distribuida por toda la placa y se puso a secar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

2.6.3.4 Colocación de los discos de antibióticos en las cajas petri

1. Seguidamente ya transcurridos los 15 minutos se colocaron los discos de antibióticos, con una pinza estéril, haciendo una ligera presión encima de cada disco. Basándonos en las normas propuestas por la CLSI, en el cual señala que no deben ser colocados más de 12 discos en una caja petri de 150 mm y en una de 100mm no más de 6 discos.
2. Se colocó el disco blanco en el centro el cual sirve como control, y los otros 5 discos (AMC, CRO, AZM, CN, CIP) alrededor del disco blanco, siempre colocando a 2 cm de distancia entre el borde de la placa y entre discos.
3. Se voltearon las cajas y se procedió a colocar en la incubadora a 37°C, por 24 horas para el día siguiente proceder con la lectura.

(Dota, 2017)

2.6.4 Lectura de resultados

1. Finalmente se examinó cada caja, se colocó sobre una superficie oscura y se midió los diámetros de cada halo de inhibición por disco.
2. Se comparó los resultados con las tablas de las normas CLSI para comprobar si las bacterias son sensibles o resistentes.

Tabla 5. Halos de antibiorresistencia (mm).

Discos de antibióticos	Siglas	Sensible	Intermedio	Resistente
Azitromicina 15µg	AZM	≥ 16	-	≤ 15
Ceftriaxona 30 µg	CRO	≥ 23	20–22	≤ 19
Ciprofloxacina 5 µg	CIP	≥ 21	16–20	≤ 15
Amoxicilina + ácido clavulánico 20/10µg	AMC	≥ 18	14–17	≤ 13
Gentamicina 10 µg	CN	≥ 15	13–14	≤ 12

Fuente: (CLSI, 2016)

3. Se registraba en Excel los resultados obtenidos, para tener una media de las 3 réplicas de cada cepa.

2.6.5 Fase 2. Determinar el (CMI) de las cepas Sensibles a los antibióticos a través de microdilución

En esta fase se trabajó solo con las cepas que fueron Sensibles (S) en la Fase uno, para determinar el CMI de cada cepa a los antibióticos que se eligió (AMC, CRO, AZM, CN, CIP), es decir, trabajando con la dosis mínima en $\mu\text{g/ml}$ que consiga inhibir el crecimiento de *Shigella* (Britanialab, 2021).

2.6.5.1 Refrescar las cepas de *Shigella* spp y sembrarlas en Trypticase de soya (TS)

Se realizó el mismo proceso para la preparación de TS ya descrito anteriormente en la primera fase, y se siguieron los mismos para realizar la siembra y estriación de las cepas de *Shigella* que fueron sensibles (S) a los antibióticos (TM MEDIA, 2014).

2.6.5.2 Caldo Luria Bertani (LB)

El agar Luria Bertani es un medio líquido seleccionado para realizar CMI, ayuda al mantenimiento de las bacterias. Sus ingredientes son nutricionalmente ricos para el crecimiento de cultivos. Entre sus componentes está el extracto de levadura y la peptona de caseína, las cuales proporcionan un adecuado ambiente y estimulan el crecimiento de la bacteria, además tiene cloruro de sodio que suministra iones de sodio para el transporte de membrana y mantiene el equilibrio osmótico del medio (TM MEDIA, 2022).

2.6.5.2.1 Preparación de Luria Bertani (TM MEDIA)

1. Primero se esterilizó todos materiales en la autoclave a 120 °C durante 30 minutos
2. Se pesó 25 gramos del producto y se disolvió en 1000 mililitros de agua purificada/destilada.
3. Se colocó en la autoclave a una temperatura de 120°C por 30 minutos.
4. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se guardó en la refrigeradora hasta el día que se vaya a ocupar.

(TM MEDIA, 2022)

2.6.5.2.2 Preparación de solución madre de antibiótico

1. Primero se tuvo en cuenta las concentraciones mínimas recomendadas por la CLSI

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Antibiótico	Siglas	Sensible	Intermedio	Resistente
Azitromicina 15 μg	AZM	≤ 16	-	≥ 32
Ceftriaxona 30 μg	CRO	≤ 1	2	≥ 4
Ciprofloxacina 5 μg	CIP	≤ 1	2	≥ 4
Amoxicilina + ácido clavulánico 20/10 μg	AMC	$\leq 8/4$	16/8	$\geq 32/16$
Gentamicina 10 μg	CN	≤ 4	8	≥ 16

Fuente: (CLSI, 2016)

2. Luego se realizaron los cálculos tomando en cuenta las concentraciones de los medicamentos, se realizó reglas de 3, multiplicando 20 veces la dosis que establece la CLSI y al final se multiplicó por 3ml de LB, que son de la solución madre del antibiótico.

Tabla 7. Cálculo de dosis para preparar la solución madre de antibiótico

Antibióticos	Regla de 3	Concentraciones de antibiótico ($\mu\text{l}/3\text{ml}$)
Azitromicina (AZM)	Concentración: 600mg/50ml $600.000 \mu\text{g} - 50.000\mu\text{l}$ $320\mu\text{g} \quad X = 26.67 \mu\text{l}$	$26.67 \mu\text{l} \times 3\text{ml (LB)} = 80 \mu\text{l}$
Ceftriaxona (CRO)	Concentración: 1g/100ml $1.000.000 \mu\text{g} - 100.000\mu\text{l}$ $20\mu\text{g} \quad X = 2 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l} \times 3\text{ml (LB)} = 6 \mu\text{l}$
Ciprofloxacina (CIP)	Concentración: 200mg/100ml $2000.000 \mu\text{g} - 100.000\mu\text{l}$ $20\mu\text{g} \quad X = 10 \mu\text{l}$	$10 \mu\text{l} \times 3\text{ml (LB)} = 30 \mu\text{l}$
Amoxicilina + ácido clavulánico (AMC)	Concentración: 1500mg/2ml $1.5000.000 \mu\text{g} - 5000\mu\text{l}$ $160\mu\text{g} \quad X = 0.53 \mu\text{l}$	$0.53 \mu\text{l} \times 3\text{ml (LB)} = 1.6 \mu\text{l}$
Gentamicina (CN)	Concentración: 80mg/2ml $80.000 \mu\text{g} - 2000\mu\text{l}$ $80\mu\text{g} \quad X = 2 \mu\text{l}$	$2 \mu\text{l} \times 3\text{ml (LB)} = 6 \mu\text{l}$

Fuente: (Elaboración propia)

3. Se rotularon 5 tubos de ensayo 1 por cada antibiótico.
4. Se colocó 3ml de LB a cada tubo
5. Luego con ayuda de una pipeta se sacó la cantidad que obtuvimos en la tabla anterior, el resultado de concentraciones de antibióticos ($\mu\text{l}/3\text{ml}$).
6. Seguidamente se colocó el antibiótico de acuerdo a lo que obtuvimos en la tabla anterior concentraciones de antibióticos ($\mu\text{l}/3\text{ml}$), para que de esta manera podamos tener 3ml totales de solución madre de antibiótico.

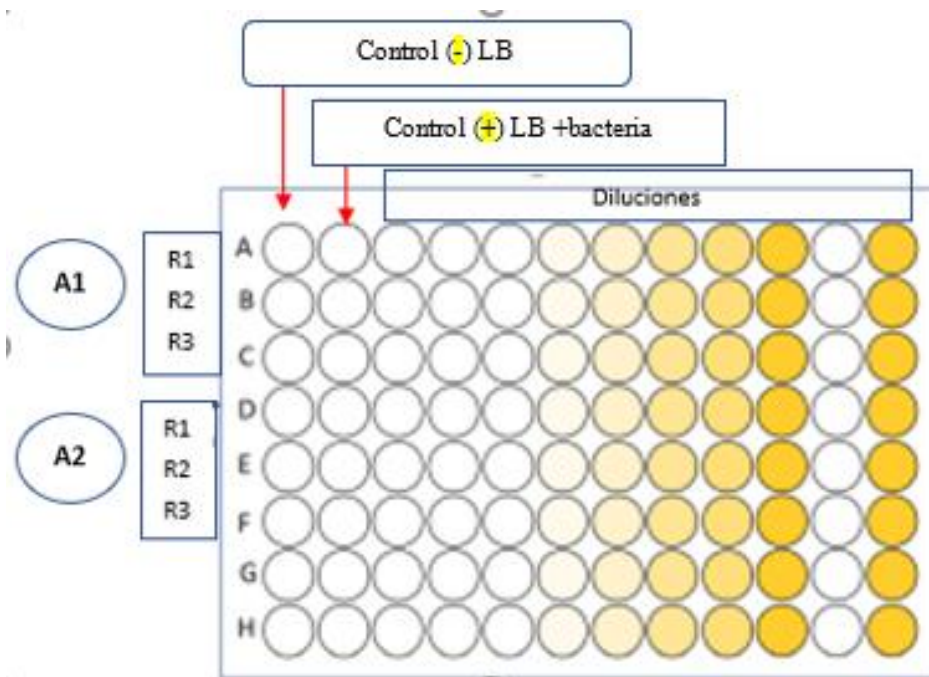
2.6.5.2.3 Preparación de la bacteria

1. Se rotularon los tubos con los respectivos nombres y código de las cepas.
2. Se llenaron los tubos con 3 ml de LB.
3. Se tomaron las colonias con ayuda de un palito de naranjo, se introdujeron en el tubo y se mezcló en el vórtex.
4. Se midió la turbidez en el espectrofotómetro a 600 nanómetros (nm) para que tenga una concentración de 0,5 o sea con una turbidez igual a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

2.6.5.2.4 Siembra en las microplacas

1. Se colocó el tubo de la bacteria en una caja petri para poder tomar con la pipeta multicanal.
2. De igual forma se colocó LB en una caja petri.
3. Con una pipeta se tomó 100 μ l de LB y se depositó en el primer pocillo
4. Con la pipeta se tomó 50 μ l de LB y se colocó en el segundo hasta el doceavo pocillo exceptuando el tercero.
5. Se colocó 100 μ l de la solución madre de antibiótico en el tercer pocillo.
6. Se tomó la pipeta multicanal y se ajustó a 50 μ l para hacer las diluciones.
7. Se hicieron las diluciones seriadas, tomando 50 μ l del tercer pocillo solución madre (concentración más alta) y adicionándolo al siguiente pocillo, y así sucesivamente.
8. A continuación, a cada pocillo se adicionó 50 μ l de bacteria. La concentración final en cada pocillo estuvo entre 1 y 5×10^4 ufc/ml.
Quedando la placa como se observa en la figura:

Figura 2. Procedimiento de microdilución



Fuente: (Elaboración propia)

9. Una vez que ya están inoculadas las placas de microdilución, se selló con una cinta parafilm para evitar la contaminación y evaporación del medio de cultivo.
10. Las placas se llevaron a incubar a 37°C por 21 horas.
11. Al siguiente día se hizo la lectura de los resultados en el lector de microplacas.

2.7 Variable respuesta

2.7.1 Cualitativa

- Resistencia a Antibióticos evaluada mediante método Kirby Bauer

Se clasifican las cepas de *Shigella* spp como Sensibles (S), Intermedia (I) o Resistente (R), tomando en cuenta el tamaño de los halos (mm) que presenten y comparándolas con

directrices expuestas por la CLSI.

2.7.2 Cuantitativa

- **Concentración Mínima Inhibitoria**

La CMI refiere a la dosis más baja del antibiótico expresada en $\mu\text{g/ml}$, la cual es necesaria para inhibir el crecimiento de *Shigella* spp. Dato que se establece midiendo la absorbancia (luz transmitida a través del cultivo) de la muestra mediante una longitud de onda de 600 nanómetros.

2.8 Procesamiento de la información

Los resultados recolectados en este estudio se anotaron en una base de datos en Microsoft Excel ® 2016.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo, se llevó a cabo la interpretación de los resultados obtenidos en cada fase de la investigación. De la primera fase, las mediciones de los halos de inhibición, clasificando a cada cepa en Sensible, Intermedia o Resistente ante los fármacos, tomando como referencia el método fenotípico de Kirby Bauer, basándonos en los puntos de corte señalados según la CLSI.

3.1 Prueba de antibiorresistencia (sensibilidad a los antibióticos)

Tabla 8. Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Shigella* spp. aisladas de carne de pollo frente a cinco antibióticos (Azitromicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Amoxicilina + Acido clavulánico y Gentamicina)

Cepas de <i>Shigella</i> spp.	Sensibilidad <i>in vitro</i> Rangos promedios	Media de la escala
<i>S. sonnei</i> SE6-1	182,3 a	2,6
<i>S. sonnei</i> Uyi_30	171,8 a	2,4
<i>S. sonnei</i> Uyi_30	171,8 a	2,4
<i>S. dysenteriae</i> 1657	155,6 ab	2,2
<i>S. flexneri</i> ATCC 29903	155,6 ab	2,2
<i>S. flexneri</i> ATCC 29903	145,1 ab	2,0
<i>S. sonnei</i> Uyi_30	128,9 abc	1,8
<i>S. sonnei</i> Uyi_30	128,9 abc	1,8
<i>S. sonnei</i> Uyi_30	128,9 abc	1,8
<i>S. dysenteriae</i> 1657	128,9 abc	1,8
<i>S. sonnei</i> ATCC 29930	118,4 bc	1,6
<i>S. sonnei</i> ATCC 29930	102,2 bc	1,4
<i>S. sonnei</i> ATCC 29930	102,2 bc	1,4
<i>S. flexneri</i> ATCC 29903	102,2 bc	1,4
<i>S. flexneri</i> T87	102,2 bc	1,4
<i>S. flexneri</i> ATCC 29903	75,5 c	1,0
<i>S. sonnei</i> 1915	75,5 c	1,0

Cepas de *Shigella* spp. que en una misma columna compartan letras, no difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$.

En la tabla 8 están descritas desde la cepa más resistente a las más sensible de *Shigella* spp, de modo que las cepas más resistentes son aquellas en la cual la media de la escala se acerca más a 3 mientras que las más sensibles se aproximan al 1. Estadísticamente

algunas de las cepas no muestran diferencia por lo que se determina a la cepa *S. sonnei* SE6-1 como la más resistente a los 5 antibióticos empleados (AMC, CRO, AZM, CN, CIP) en cambio las cepas más sensibles son las *S. sonnei* 1915 y *S. flexneri* ATCC 29903. Para realizar esta estadística, se utilizaron los datos recopilados en la Fase 1, en el cual se sacaron las medias de los tamaños de halo de las 3 réplicas por cepa, según el valor de corte del (CLSI, 2016) mediante el método Kirby Bauer.

En la presente investigación se pudo observar que la misma especie de *S. sonnei*, pero cepa 1915 resultó ser una de las más sensibles, mientras que la cepa SE6-1 fue una de las más resistentes. Coincidiendo con (Marcoleta et al., 2013) ya que en su estudio obtuvieron como resultado que de un total de 277 cepas de *Shigella sonnei*, el 17,3% presentó sensibilidad ante todos los antibióticos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, y ácido nalidíxico) y el 82,7% fue resistente a uno o más antimicrobianos. Estos datos son similares a nuestra investigación ya que siendo de la misma especie muestra un comportamiento diferente siendo una más sensible y la otra más resistente.

Por otro lado (Ahmad et al., 2021) sustenta lo anteriormente descrito en su investigación ya que al realizar un análisis mutacional mostró que el clon “linaje global III” tiene una fuerte adaptabilidad hacia el estrés oxidativo que probablemente refleja su patrón de dominancia. Por lo tanto, existe una relación significativa entre el integrón clase II y la resistencia desarrollada hacia los diferentes antibióticos en *S. sonnei*. La adquisición de integrones de clase II por parte de *S. sonnei*, junto con cambios mutacionales significativos, genera una presión selectiva sobre los antibióticos, dando lugar al desarrollo de cepas resistentes.

Shigella sonnei también cuenta con mecanismos antibacterianos. Tiene la capacidad de activar el sistema de consumo de protones, resistir los péptidos antimicrobianos del huésped, generar colicinas (toxinas producidas por bacterias coliformes) y mucinasas (enzimas para degradar las mucinas). Estos mecanismos resultan letales para una

variedad limitada de bacterias filogenéticamente relacionadas, lo que hace que *S. sonnei* sea más favorable en cepas sensibles a la colicina-mucinasasa (**Mattock & Blocker, 2017**). Un estudio realizado en la India reveló que el 93% de las muestras estudiadas contenían al menos un plásmido portador de genes para la producción de colicinas, evidenciando así un marcado nivel de patogenicidad preocupante (**Calcuttawala et al., 2015**).

En la investigación de (**Baker et al., 2018**) el estudio genómico mostró que la transferencia horizontal de genes de solo un plásmido RAM (resistencia antimicrobiana) entre cepas de *Shigella*, puede ser el culpable de las epidemias ya existentes y de promover nuevas. El adquirir de genes de resistencia ante los medicamentos implica varios sistemas de transferencia de genes, como integrones, transposones, plásmidos conjugativos (**Partridge, 2011**).

Los plásmidos tienen una función esencial en el proceso de transferencia horizontal de genes, facilitando la propagación de genes resistentes a los antibióticos. La transmisión de genes resistentes a través de plásmidos ha reavivado espantosamente el tema de la resistencia a los antibióticos y el reto actualmente en curso de CTX-M β la beta-lactamasa de espectro extendido NDM-1,bla. Por ejemplo los genes que codifican carbapenemasas, presentes en todos los patógenos entéricos, poseen la capacidad de ajustarse y persistir en el entorno, especialmente en ambientes acuáticos, como las aguas residuales (**Das & Mandal, 2019**).

La falta de adecuado saneamiento resulta en la contaminación del agua destinada tanto para riego como para consumo. Dándose, así como resultado la posible transmisión e intercambio genético entre cepas en *S. sonnei* lo que se ha convertido en una fuente común y potencial en el apareamiento de resistencia ante los antimicrobianos. La tipificación de aislamientos a través de la incompatibilidad de plásmidos tiene la capacidad de proporcionar un conocimiento detallado sobre la diversidad genética, facilitando así la comprensión de la expansión a nivel local, global y regional. Esto

puede ocurrir tanto a través de múltiples interacciones moleculares entre plásmidos como por la presencia de un único tipo de plásmido predominante (Das & Mandal, 2019).

Tabla 9. Efectividad de cinco antibióticos (Azitromicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Amoxicilina + Acido clavulánico y Gentamicina) mediante ensayo de sensibilidad *in vitro* de cepas de *Shigella* spp. aisladas de carne de pollo

Antibiótico	Sensibilidad <i>in vitro</i> <i>Rangos promedios</i>	Media de la escala
Ciprofloxacina	179,26 a	2,5
Amoxicilina +ácido clavulánico	155,71b	2,1
Ceftriaxona	114,76c	1,5
Gentamicina	106,91c	1,4
Azitromicina	83,35d	1,1

Antibióticos que en una misma columna comparten letras, no difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$

En la tabla 9 se realizó un análisis estadístico en el que se estableció los antibióticos más efectivos para bloquear el crecimiento de las cepas de *Shigella* spp que se estudiaron en esta investigación y el antibiótico menos eficaz, el cual determinó que el antibiótico más efectivo es la Azitromicina con una media de escala de 1.1, porque están más cerca al 1 (cuanto más cerca está la media al 1, más sensible será) y el fármaco con la menor efectividad para inhibir a las cepas de *Shigella* spp fue Ciprofloxacina con una media de 2,5.

En la investigación realizada por **(Marami et al., 2018)** obtuvieron como resultado que *Shigella* spp fue 100% sensible a ciprofloxacina. De igual manera **(Duarte et al., 2021)** encontró que ninguna cepa mostró resistencia al ciprofloxacino y encontró un porcentaje bajo de resistencia para ceftriaxona (4%). En cambio, en esta investigación, si hubo resistencia, aunque no fue muy marcada con un valor de media de escala de 2.5. En otra investigación por **(Rodríguez et al., 2023)** obtuvieron como resultado tasas de resistencia para azitromicina 52.9% y ciprofloxacino 44,1%. El presente estudio discrepa con el resultado de azitromicina ya que en nuestra investigación si presentó sensibilidad, pero coincidiendo con el caso de ciprofloxacina ya que si fue resistente igual que el estudio del autor.

(Chung & Baker, 2018) justifican esto ya que las fluoroquinolonas como la ciprofloxacina se empezaron a usarse con más frecuencia para tratar la shigelosis que era resistente a algunos medicamentos y de esta manera su uso se fue generalizando y es así como ha surgido resistencia a este grupo de antibióticos. La resistencia a las fluoroquinolonas, tanto para los aislados in vitro como para los aislados clínicos, es debido a la acumulación progresiva de mutaciones en la topoisomerasa y la girasa, codificadas respectivamente por los genes cromosómicos *parC* y *gyrA*, probablemente como una estrategia de adaptación para la resistencia contra la quinolona de primera generación, el ácido nalidíxico.

Así mismo **(De la Fuente et al., 2015)** menciona que la propagación de cepas resistentes a los medicamentos resultante del uso de fármacos es un proceso natural que puede acelerarse por el uso inadecuado de ciertos medicamentos.

En otra investigación por **(Yousfi et al., 2019)** obtuvieron de los 254 *Shigella* aislados, 76,4% fueron sensibles a la azitromicina y el 23,6% mostraron resistencia. Concordando en cierta medida ya que la azitromicina en nuestro estudio si presentó una alta sensibilidad.

Dichos resultados son similares a la investigación realizada por (Villacrés & Alcocer, 2015) en el cual analizaron 79 aislados de *Shigella* obteniendo como resultado una resistencia de 96.20% para tetraciclina, ampicilina 94.94%, azitromicina 15.19%, ácido nalidixíco 10.13%, ceftriaxona 1,27%. Dicho resultado en el caso de la azitromicina se puede comparar con la presente investigación ya que este antibiótico si fue sensible ante *Shigella*.

Tabla 10. Sensibilidad in vitro de las tres especies del género *Shigella* aisladas de carne de pollo frente a cinco antibióticos (Azitromicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Amoxicilina + Acido clavulánico y Gentamicina).

Especie	Ciprofloxacina	Amoxicilina + ácido clavulánico	Ceftriaxona	Gentamicina	Azitromicina
<i>Shigella</i>					
<i>S. sonnei</i>	2,6	2,3	1,4	1,6	1,2
<i>S. flexneri</i>	2,6	1,6	1,8	1,0	1,0
<i>S. dysenteriae</i>	2,0	3,0	2,0	2,0	1,0

Media de la escala de sensibilidad a los antibióticos (1-Sensible, 2-Intermedio, 3-Resistente)

En la tabla 10 se describe la sensibilidad que presentaron las tres especies de *Shigella* spp frente a los 5 antibióticos empleados presentando las tres especies una sensibilidad notoria con una media de la escala de 1 frente a la azitromicina y mostrando resistencia frente a la ciprofloxacina. En el caso de *S. dysenteriae* fue la especie que dio el máximo valor 3 en la media de escala, considerándose una especie totalmente resistente a amoxicilina más ácido clavulánico, sensibilidad intermedia para ciprofloxacina, ceftriaxona, gentamicina y siendo totalmente sensible para azitromicina.

Shigella sonnei cuenta también con mecanismos antibacterianos, tiene la capacidad de resistir a los péptidos antimicrobianos del huésped, activar el sistema de consumo de

protones, generar mucinasas (enzimas para degradar las mucinas) y colicinas (toxinas producidas por bacterias coliformes). Estos mecanismos resultan letales para una variedad limitada de bacterias filogenéticamente relacionadas, lo que hace que *S. sonnei* sea más efectiva en cepas susceptibles a la colicina-mucinasasa (**Mattock & Blocker, 2017**). Un estudio realizado en la India reveló que el 93% de las muestras analizadas poseían al menos un plásmido que codifica para colicinas, evidenciando así un nivel significativo de un rasgo patógeno amenazante (**Calcuttawala et al., 2015**). Además las mutaciones en *gyrA* y *parC* desempeñan un papel crucial en la capacidad de diseminación de aislados de *S. sonnei* resistentes a fluoroquinolonas (**Gu et al., 2017**).

Shigella sonnei presenta varios mecanismos patogénicos únicos y bien establecidos. La capacidad de sobrevivir intracelularmente, el sabotaje de la muerte fagocítica y la evasión del sistema inmunológico del huésped, especialmente las respuestas inflamatorias, son procesos fundamentales en su patogénesis. Por ejemplo, la inhibición de las respuestas proinflamatorias y la modulación de la regulación de las células B y T son aspectos destacados. Estos mecanismos, junto con la naturaleza evolutiva de *S. sonnei*, pueden contribuir a la persistencia de la infección a lo largo del tiempo (**Anderson et al., 2017**). Diversas investigaciones han demostrado que la incidencia de *S. sonnei* se incrementa en concordancia con el progreso económico, y que esta especie exhibe una mayor propensión a adquirir resistencia a antimicrobianos de amplio espectro.

En la presente investigación *Shigella flexneri* presentó una resistencia intermedia con un valor de la media de la escala de 2.6 para ciprofloxacina. Un valor muy similar fue conseguido por (**Anselmo et al., 2020**) quien obtuvo que el 57,14% de *S. flexneri* mostró una resistencia del 50% para ciprofloxacina. Dicho resultado concuerda con el de nuestra investigación ya que la especie *S. flexneri* si mostró resistencia ante ciprofloxacina, aunque no fue muy marcada.

Los plásmidos desempeñan una función central al facilitar el intercambio genético horizontal, promoviendo así la adquisición y difusión de genes de resistencia. La acción coordinada de elementos genéticos móviles, capaces de moverse dentro de moléculas de ADN, también contribuye a la propagación de genes de virulencia entre cepas altamente resistentes y virulentas de *S. flexneri*. Las cepas de *Shigella* llevan un plásmido grande (con un tamaño de 120 a 140 megadaltons) denominado pINV, el cual alberga genes esenciales para el comportamiento invasivo de estos patógenos, así como genes relacionados con la resistencia a fármacos y otras habilidades de supervivencia **(Das & Mandal, 2019)**.

En el caso de *Shigella dysenteriae* se observó una mayor resistencia comparando con las otras especies, ya que marcó valores más elevados en la media de la escala. *S. dysenteriae* se diferencia de otras especies debido a la producción de toxinas (toxina Shiga) y uno de los problemas es su resistencia frente a la mayoría de medicamentos. Además de la existencia de genes que codifican para esta toxina, hay algunas variaciones menores en los factores virulentos entre *S. dysenteriae* y otras especies de la bacteria *Shigella*. *S. dysenteriae* utiliza un sistema de secreción para introducir efectores de proteínas en las células huésped. Estos genes (A-O) codifican y expresan una estructura en forma de aguja **(Pakbin et al., 2023)**.

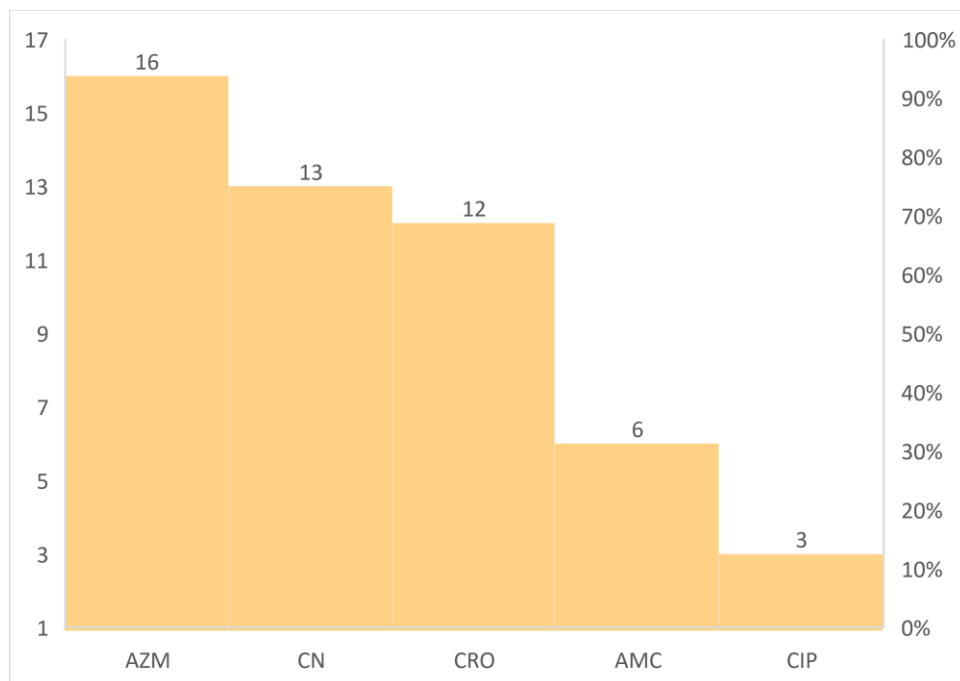
Además *S. dysenteriae* emplea un sistema específico de captación de hemo como un factor de virulencia defensivo, el cual está codificado por los genes Shu. Este mecanismo participa en la unión directa de proteínas que contienen hemo y en la secreción de hemóforos para suministrar hierro al organismo durante los procesos de patogénesis y supervivencia. Además, este mecanismo protege el ADN de *S. dysenteriae* tipo 1 contra el daño oxidativo inducido por el hemo **(Pakbin et al., 2023)**.

3.2 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

En la segunda fase del trabajo investigativo se realizó la Concentración Mínima Inhibitoria de las cepas que fueron sensibles a los fármacos (Azitromicina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Ceftriaxona, Amoxicilina + Ácido Clavulánico), los resultados serán descritos por fármaco. En esta fase se trabajó a partir de diluciones seriadas del fármaco tomando en cuenta los puntos de corte para enterobacterias según la (CLSI, 2016).

De las 17 cepas de *Shigella* spp que se trabajaron en la fase uno de esta investigación, se estableció que 16 cepas fueron Sensibles (S) ante azitromicina, 13 a gentamicina, 12 cepas fueron sensibles a ceftriaxona, 6 para amoxicilina + ácido clavulánico y 3 a ciprofloxacina (Figura 3) con estas cepas se trabajó en la segunda fase con el objetivo de determinar las CMI para cada cepa.

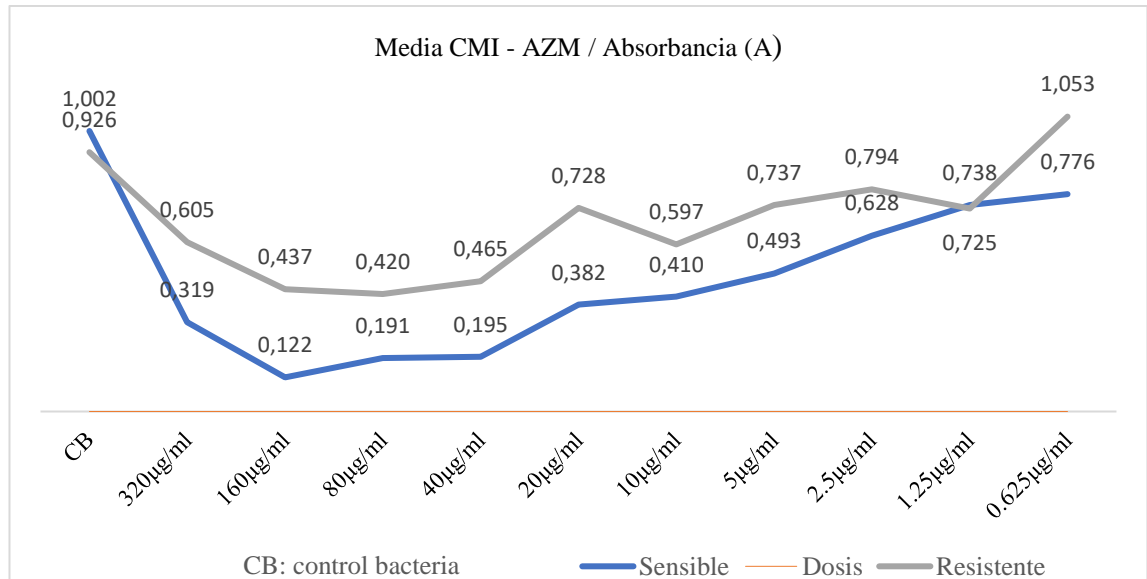
Figura 3. Porcentaje de cepas sensibles a los fármacos



3.2.1 CMI de Azitromicina (AZM)

Según la CLSI (2016) la CMI de AZM es $\leq 16\mu\text{g/ml}$.

Figura 4. Curva de inhibición de la cepa más sensible y menos resistente a AZM



En la figura 4 se observa las cepas que presentaron curvas de inhibición más significativas en este estudio ante la Azitromicina, de tal manera la cepa N21 Uyi_30 fue la que presentó mayor resistencia al antibiótico dando como resultado una curva de inhibición con un CMI de 80 $\mu\text{g/ml}$ con una absorbancia de 0.420 A. Mientras que en el caso de la cepa N36- ATCC 29903 fue la que mostró mayor sensibilidad al antibiótico a partir de un CMI de 160 $\mu\text{g/ml}$ con una absorbancia de 0.122 A, la curva se mantiene constante hasta 40 $\mu\text{g/ml}$, a partir de ahí la curva va subiendo debido a que hay menos concentración del antibiótico. Según el (CLSI, 2016) la bacteria es sensible a un CMI $\leq 16\mu\text{g/ml}$, mientras que en este estudio se observó que a partir de 160 $\mu\text{g/ml}$ tiene una absorbancia más baja.

Los macrólidos muestran actividad particularmente contra bacterias gram positivas, pocas bacterias gram negativas muestran sensibilidad in vitro entre ellas *Shigella* spp. Los macrólidos (claritromicina, azitromicina, eritromicina, etc.) de manera muy limitada logran penetrar a través de la barrera hematoencefálica. La azitromicina, tiene una mejor actividad contra bacterias gram negativas en medio alcalino, muestra actividad contra cepas de *Shigella* y *Haemophilus* y, debido a su prolongada vida, se administra una sola vez al día durante periodos más cortos de tiempo (**Lopardo, 2020**).

En general los bacilos gram negativos son impermeables a estos medicamentos debido al tamaño molecular y la estructura de la membrana externa. Los macrólidos interfieren con la síntesis de proteínas (traducción) en la etapa de elongación de la cadena. Distintos grupos funcionales de la eritromicina se conectan a secuencias del dominio V del ARN ribosómico 23S (ARNr), el cual forma parte de la subunidad 50S del ribosoma de la bacteria. Los macrólidos tienden a desarrollar una acción antibacteriana de desarrollo lento y es dependiente del tiempo. Esta actividad es considerada bacteriostática contra la mayor parte de los microorganismos. No obstante, en altas concentraciones en medio alcalino o principalmente durante la fase de crecimiento, pueden actuar como bactericidas. La CIM es significativamente menor a pH alcalino debido a que la forma no ionizada se difunde más eficientemente a través de la membrana citoplasmática (**Lopardo, 2020**).

(**Pozo et al., 2014**) en su investigación pone a prueba la azitromicina en aislados de *Shigella*, *Yersinia* y *Salmonella*, como resultado obtuvo que de las 139 cepas de *Shigella* 138 obtuvieron una CMI ≤ 16 mg/l, resultados que no coinciden con el presente estudio. Ya que se obtuvo una CMI de 160 ug/ml.

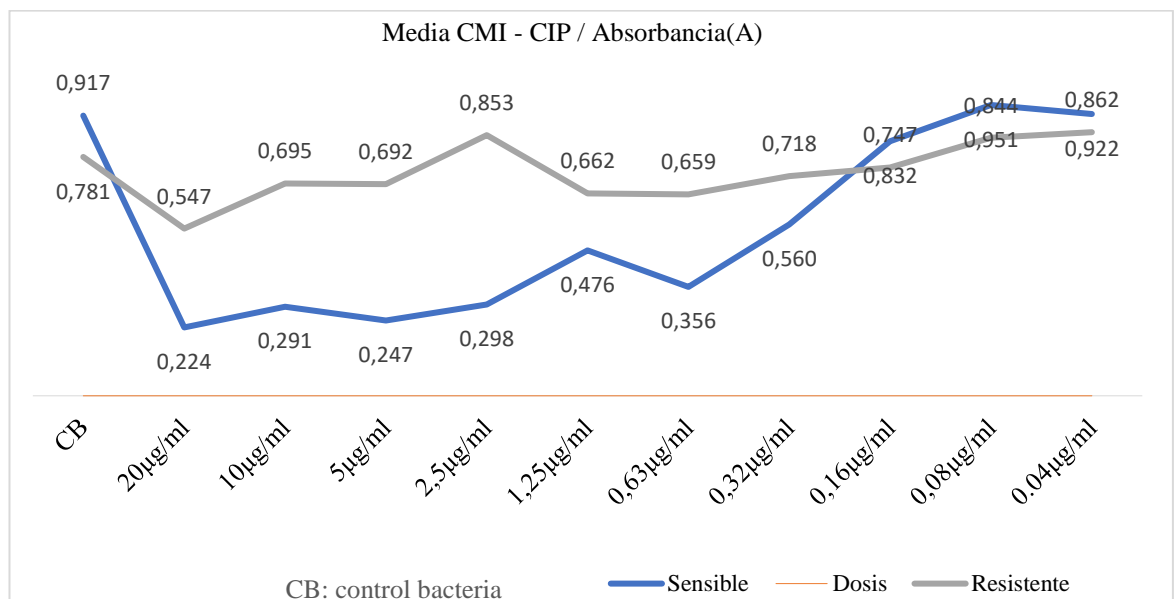
En cambio en otra investigación por (**Pulido & Reporter, 2013**) que fue realizada en los Ángeles, de un brote de *Shigella*, en el cual el 32,5% de los aislados experimentados manifestaron una reducida sensibilidad ante azitromicina obteniendo

una CMI >16mg/l. De igual manera en un estudio realizado por (Rodríguez et al., 2023) en cuatro aislados de *S. sonnei* la CMI para azitromicina fue mayor a 256 mg/L, dichos resultados coinciden con esta investigación ya que se logró una CMI a concentraciones >16mg/l del antibiótico. La resistencia a los macrólidos se asocia con la expresión del gen *mphA* que tiene localización plasmídica (Pulido & Reporter, 2013).

3.2.2 CMI de Ciprofloxacina (CIP)

Según CLSI (2016) el punto de corte para CMI de CIP en enterobacterias es ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$

Figura 5. Curva de inhibición de la cepa más sensible y menos resistente



En la figura 5 se observa las cepas que presentaron curvas de inhibición más significativas en este estudio ante la ciprofloxacina, de tal manera la cepa N16 1657 fue la que presentó mayor resistencia al antibiótico dando como resultado una curva de inhibición con un CMI de 20 $\mu\text{g/ml}$ con una absorbancia de 0.547 A. Mientras que

en el caso de la cepa N18 ATCC 29903 fue la que mostró mayor sensibilidad al antibiótico a partir de un CMI de 20 µg/ml con una absorbancia de 0.224 A, la curva se mantiene más o menos constante hasta 0.63µg/ml, a partir de ahí la curva va subiendo debido a que la concentración del antibiótico sigue bajando. Según el **(CLSI, 2016)** la bacteria es sensible a un CMI ≤ 1 µg /ml, no obstante en este estudio se observó que en 20 µg/ml tiene una absorbancia más baja.

Las fluoroquinolonas también conocidas como quinolonas, constituyen una categoría de antibióticos sintéticos con propiedades bactericidas de amplio espectro. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de las enzimas topoisomerasa IV y topoisomerasa II (girasa de ADN) bacterianas, esenciales para procesos como la recombinación, reparación, transcripción, replicación, y transcripción del ADN en bacterias. La ciprofloxacina, perteneciente a la segunda generación de fluoroquinolonas, exhibe su principal eficacia contra bacterias gramnegativas y algunos microorganismos grampositivos. Como una de las primeras fluoroquinolonas desarrolladas, se receta para el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas específicas, y su espectro de acción cambia dependiendo del nivel de actividad **(Carrillo et al., 2018)**.

De manera similar a los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas exhiben un efecto bactericida que depende de la concentración del medicamento. Su capacidad bactericida se intensifica a medida que la concentración sérica del antibiótico llega a ser alrededor de 30 veces la CMI **(Carrillo et al., 2018)**.

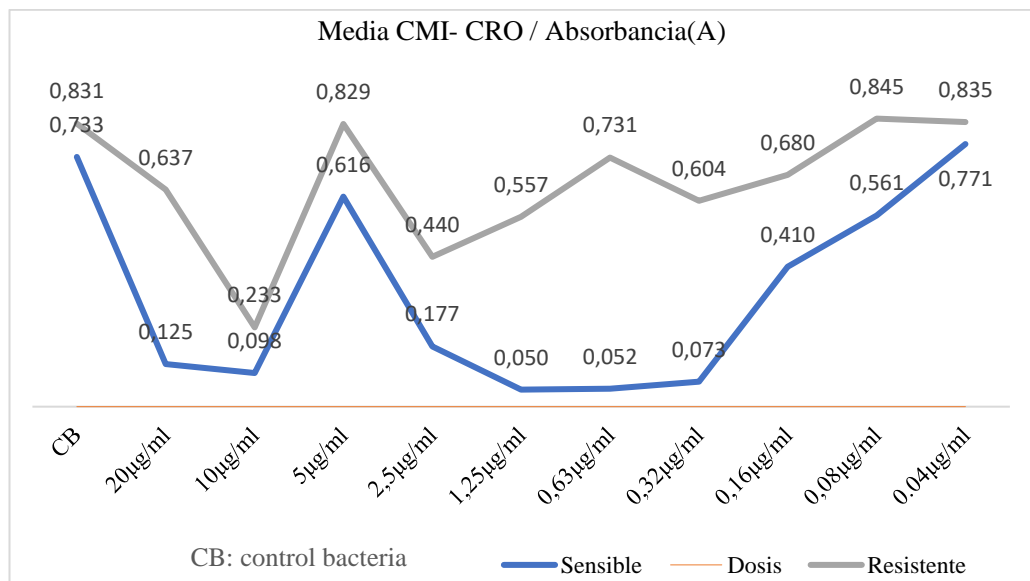
En el estudio realizado por **(Tijerino et al., 2019)** un reducido porcentaje de cepas exhibió una disminución en la sensibilidad a las quinolonas y dicha resistencia fue registrada en diversas regiones del mundo como África, Asia y otros lugares de Latinoamérica. Un estudio realizado en Brasil reveló un incremento notable en la resistencia a la ciprofloxacina, pasando del 5% en 2015 al 62.5% en 2017 **(Silveira & Machado, 2018)**. La resistencia está vinculada a mutaciones específicas en los

genes *gyrB* y *gyrA*, responsables de codificar ADN girasa, así como en los genes *parE* y *parC*, encargados de codificar la topoisomerasa IV, además se observan una eliminación activa del agente antimicrobiano y alteraciones de permeabilidad de la membrana a través de bombas eflujo (Kim et al., 2008).

3.2.3 CMI De Ceftriaxona (CRO)

Según CLSI (2016) la CMI de CRO es $\leq 1 \mu\text{g/ml}$

Figura 6. Curva de inhibición de la cepa más sensible y menos resistente a CRO



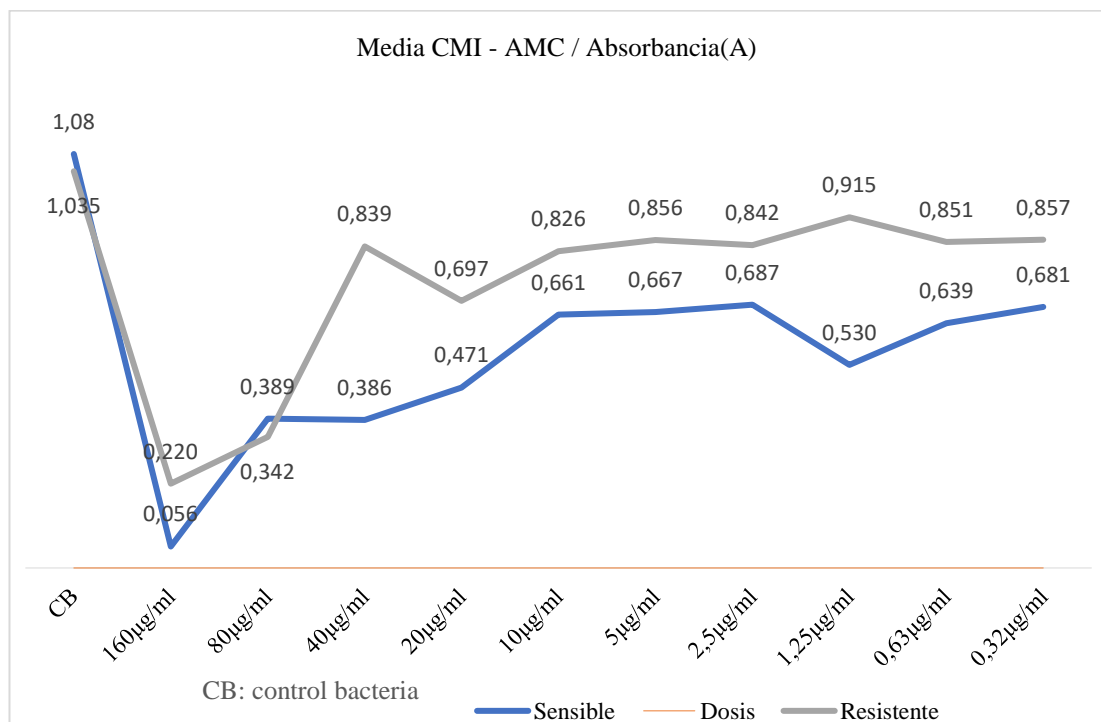
En la figura 6 se observa las cepas que presentaron curvas de inhibición más significativas en este estudio, de tal manera la cepa N16 1657 fue la que presentó mayor resistencia al antibiótico dando como resultado una curva de inhibición con un CMI de 10 µg/ml con una absorbancia de 0,233 A. Mientras que en el caso de la cepa N3 ATCC 29930 fue la que mostró mayor sensibilidad al antibiótico a partir de un CMI de 1,25 µg/ml con una absorbancia de 0,050 A. Según el (CLSI, 2016) la bacteria es sensible a un CMI $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ y es lo que se observó en este estudio ya que, mientras

la concentración fue bajando a partir del 1,25 µg/ml la curva se mantenía, entonces se pudo ver que dosis recomendada por el CLSI si fue efectiva en esta cepa ya que se encuentra más o menos entre esos valores.

3.2.4 CMI de Amoxicilina + Ácido Clavulánico (AMC)

Según CLSI (2016) la CMI de Amoxicilina + Ácido Clavulánico para enterobacterias es $\leq 8/4$ µg/ml.

Figura 7. Curva de inhibición de la cepa más sensible y menos resistente a AMC



En la figura 7 se describe la curva de inhibición de las cepas resultando N3 ATCC29930 con mayor resistencia ante el antibiótico, de manera que la CMI se observó que tuvo una CMI de 160 µg/ml con una absorbancia de 0,220 A la curva se mantiene constante en 10 µg/ml con una absorbancia de 0,826 A. En cambio, en la

cepa N18 T87 muestra una mayor sensibilidad ante el antibiótico y se observó una absorbancia de 0.056 A en los 160 µg/ml. Según el **(CLSI, 2016)** la bacteria es sensible a un CMI $\leq 8/4$ µg/ml mientras que en este estudio se observó que fue sensible a una concentración de 160 µg/ml.

Los betalactámicos comprenden una categoría de agentes antimicrobianos que incluye inhibidores de penicilinasas, monobactams, carbapenemes, cefalosporinas y penicilinas. Estos antibióticos, que poseen un amplio espectro de acción, comparten el anillo betalactámico como componente común, y constituye cerca del 50% de los antimicrobianos prescritos a nivel global. El mecanismo de acción implica la degradación de la pared celular bacteriana al unirse a las proteínas fijadoras de β -lactámicos (PBP). Las bacterias, mayoritariamente gramnegativas, emplean enzimas conocidas como betalactamasas para hidrolizar el anillo betalactámico, bloqueando de esta manera el mecanismo de acción. Entre estas enzimas, se destaca la Betalactamasa de espectro extendido (BLEE), que confiere resistencia a las penicilinas y cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación. Esta resistencia puede ser contrarrestada por los inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico **(Astocondor, 2018)**.

El mecanismo de acción de las cefalosporinas guarda similitud con el de otros betalactámicos. La inhibición del crecimiento bacteriano se produce al interferir con la síntesis de la pared celular y al inducir la autólisis bacteriana. La pared celular, compuesta por una glucoproteína denominada peptidoglucano, se encuentra finamente estructurada y rodeada por una membrana externa constituida por proteínas y lípidos en el caso de bacterias gram negativas **(Lopardo, 2020)**.

La resistencia a las cefalosporinas, especialmente en bacterias gramnegativas, se debe principalmente a la producción de betalactamasas, que implica la inactivación del antibiótico a través de la hidrólisis. Estas enzimas betalactamasas poseen la capacidad de descomponer el anillo betalactámico presente en los antibióticos, provocando la

destrucción y desestabilización de su estructura química. Después de interactuar con una molécula de fármaco, la betalactamasa se separa y se regenera, lo que le permite actuar nuevamente con otras moléculas. Los genes que contienen la información para la síntesis de estas enzimas pueden estar presentes en el genoma de ciertas especies de bacterias de manera constitutiva o estar presentes en el ADN plasmídico, facilitando su transferencia entre diferentes especies (**Lopardo, 2020**).

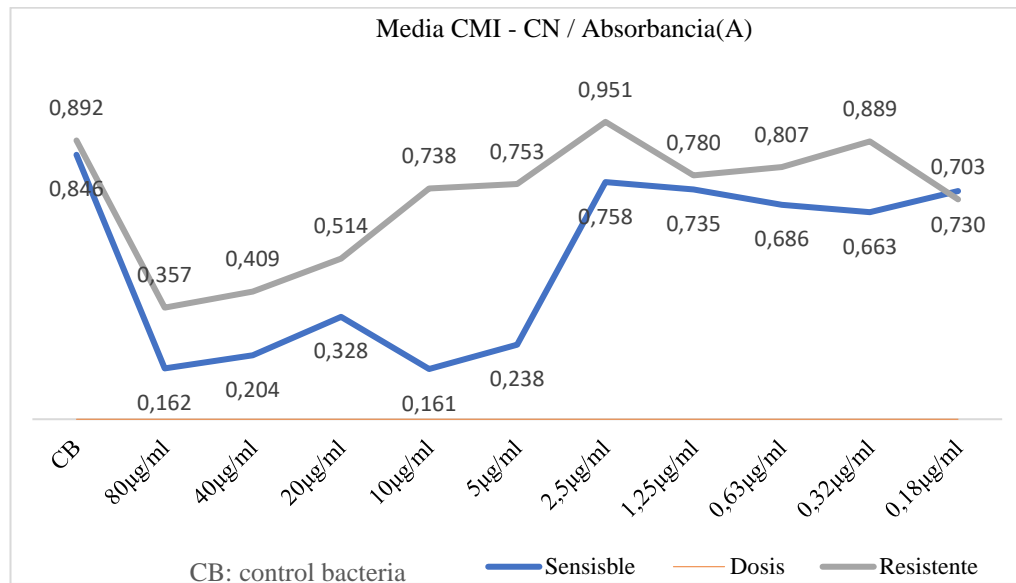
En el estudio realizado por (**Pozo et al., 2014**) demostró sensibilidad a la amoxicilina, ya que todas las cepas pertenecían al serotipo O:3, que produce una β -lactamasa cromosómica capaz de hidrolizar cefalosporinas de primera y segunda y ampicilina.

En la investigación por (**Gavarrete et al., 2021**) se llevó a cabo la detección de cepas que producen de BLEE utilizando el método de disco triple con Ceftriaxona (CRO), Cefotaxima (FOX) y Ceftazidima (CAZ), y, resultando en un 6% de cepas que mostraron resistencia. Dicha resistencia ha sido reportada en varios informes de China, Corea del Sur, Irán, Japón, Líbano, Turquía, Canadá, Israel, Argentina y varios lugares de Asia, donde se ha detectado *Shigella* spp, que albergan diversos tipos de genes BLEE. A pesar de que la mayor parte de las BLEE se originan de las familias de β -lactamasa SHV y TEM, inicialmente identificadas, *Shigella* spp. además puede manifestar la familia CTXM (**Ranjbar & Farahani, 2019**).

3.2.5 CMI de Gentamicina (CN)

Según CLSI (2016) la CMI de CN es 4µg/ml

Figura 8. Curva de inhibición de la cepa más sensible y menos resistente a CN



En la figura 8 se observa las cepas que presentaron curvas de inhibición más significativas en el presente estudio, de tal manera la cepa N19 Uyi_30 fue la que presentó mayor resistencia al antibiótico dando como resultado una curva de inhibición con un CMI de 80 µg/ml, con una absorbancia de 0,357 A. Mientras que en el caso de la cepa N18 ATCC29903 fue la que mostró mayor sensibilidad al antibiótico a partir de un CMI de 10 µg/ml con una absorbancia de 0,161 A. Según el (CLSI, 2016) la bacteria es sensible a un CMI ≤ 4 µg /ml mientras que en este estudio se observó que fue sensible a una concentración de 10 µg/ml.

Los aminoglucósidos presentan actividad bactericida la velocidad de eliminación bacteriana se incrementa a medida que la concentración del antibiótico aumenta, independientemente del tamaño del inóculo. Estos agentes son efectivos contra diversos microorganismos, tanto grampositivos como gramnegativos, destacándose su

actividad especialmente contra las enterobacterias. Su amplio espectro puede ser ampliado debido a su capacidad de exhibir actividad sinérgica con otros antibióticos, principalmente con los beta-lactámicos, tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas (**Lopardo, 2020**). Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas al unirse al sitio A en el ARN ribosomal 16S del ribosoma 30S (**Treviño & Molina, 2022**).

La resistencia a los aminoglucósidos se origina a partir de la interacción de tres mecanismos distintos: 1) debido a cambios en la membrana bacteriana que afectan la absorción y los sistemas activos de expulsión, lo que resulta en la acumulación intracelular de aminoglucósidos; 2) disminución de la unión de los aminoglucósidos como resultado de mutaciones o metilación en el sitio de unión al ARN ribosómico 16S; y 3) inactividad enzimática de los aminoglucósidos mediante procesos de O-fosforilación u O-nucleotidación y N-acetilación (**Lopardo, 2020**).

3.3 Mecanismos moleculares de resistencia de *Shigella* spp a CIP, AMC, CRO, CN, AZM.

A continuación, se describen los mecanismos moleculares de resistencia de las Cepas más resistente a todos los antibióticos, desde el antibiótico que presentaron mayor resistencia al más sensible siendo CIP, AMC, CRO, CN y AZM, de manera que se establecerá las diferentes formas de evasión de la cepa de *Shigella* spp para bloquear, inhibir y alterar los mecanismos de acción de los antibióticos utilizados en el presente estudio.

3.3.1 Mecanismos de resistencia de *Shigella* spp a fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas fue uno de los grupos de antibióticos que más resistencia mostró ante *Shigella* spp. La resistencia a las fluoroquinolonas en organismos gramnegativos

generalmente se atribuye a uno de dos mecanismos. Un mecanismo surge debido a mutaciones en los genes diana de la fluoroquinolona, que incluyen *gyrA* y *gyrB* (encargados de codificar ADN girasa), así como *parE* y *parC* (responsables de codificar topoisomerasa IV). El segundo mecanismo resulta de la expulsión activa de las fluoroquinolonas. En *Shigella*, se ha demostrado que una bomba de eflujo para fluoroquinolonas confiere un alto nivel de resistencia a las quinolonas contra *S. Dysenteriae* (Kim et al., 2008).

La resistencia originada por mutaciones cromosómicas en el sitio objetivo se produce en las subunidades específicas de la topoisomerasa IV y la ADN girasa, que son *gyrB*, *gyrA*, *parE*, *parC*, codificadas por los genes correspondientes. La ADN girasa consta de dos subunidades *gyrA* y dos subunidades *gyrB*, mientras que la topoisomerasa IV incluye dos subunidades *parC* y dos *parE*. Las mutaciones más frecuentes suelen ocurrir en los codones 83, 87 y 211, con mutaciones en *gyrB* detectadas con menor frecuencia en diversos estudios. Algunos investigadores sostienen la idea de que una sola mutación en *gyrA* podría conferir resistencia a las quinolonas, pero para reducir la susceptibilidad a las fluoroquinolonas, se requieren múltiples mutaciones adicionales en las regiones *parC* y *gyrA* (Azmi et al., 2014).

Las mutaciones del gen *parC* son más frecuentes en los codones 80 entre los aislados de *Shigella*. Se ha verificado que las alteraciones en el gen *gyrA* son considerablemente más prevalentes que las mutaciones en el gen *gyrB* (Tamanna & Ramana, 2016).

Resistencia mediada por plásmidos: La resistencia a las fluoroquinolonas mediada por plásmidos se debe a la protección de ADN girasa por una proteína de la familia de repetición de pentapéptidos llamado qnr o ciprofloxacina: modificada por una enzima (aminoglucósido acetiltransferasa) codificada por el gen *aac 6-Ib-cr* (Taneja et al., 2015).

La razón primordial de la resistencia a las quinolonas en los aislamientos de *Shigella* radica en la dispersión de genes plasmídicos identificados como regiones resistentes ante las quinolonas mediadas por plásmidos (PMQR). Estos genes, como *qnr* (*qnrD*, *qnrB*, *qnrA*, *qnrC*, *qnrS*, *aac[6']-lb-cr*, *qep*), están comúnmente asociados con elementos transponibles o móviles presentes en plásmidos. Los genes *qnr*, con frecuencia integrados en integrones, facilitan la propagación entre *Shigella* y otros miembros de la familia Enterobacterias. Posteriormente, los aislados con resistencia ante quinolonas puede propagarse a través de distintas zonas geográficas debido a la movilidad de la población. La combinación de nuevas mutaciones en *GyrA* y *ParC*, junto con la presencia de la bomba de eflujo y los genes PMQR, contribuye al aumento de la (CMI) en las quinolonas. Estos hallazgos son esenciales para mejorar nuestra comprensión de la resistencia a las quinolonas en estos aislados **(Das et al., 2016)**.

(Bowen et al., 2015) realizaron un estudio en Estados Unidos, como resultado obtuvieron una tasa de resistencia de *Shigella* a las fluoroquinolonas del 87 % durante 2014-2015. La resistencia de los aislados de *Shigella* a las fluoroquinolonas se debe principalmente a alteraciones mutacionales en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, pero la resistencia a las quinolonas mediada por plásmidos (PMQR) pueden facilitar la selección de aislados que exhiben niveles más altos de resistencia a través de mecanismos codificados extracromosómicamente y confieren una susceptibilidad reducida a las fluoroquinolonas.

Es crucial señalar que los aislados de *Shigella* que son positivos para *qnrS*, particularmente las cepas de *S. flexneri*, exhiben una resistencia significativamente elevada a las fluoroquinolonas. Varios investigadores de diversas regiones del mundo coinciden en que el gen *qnrS*, asociado con la resistencia a las quinolonas y transmitido por plásmidos, juega un papel fundamental en disminuir la susceptibilidad de cepas de *Shigella* a fluoroquinolonas **(Zhang et al., 2019)**.

3.3.2 Mecanismos de resistencia de *Shigella* spp a Betalactámicos

Las β -lactamasas de clase A: tienen la capacidad de descomponer penicilinas de espectro estrecho, sin afectar a las cefalosporinas ni carbapenémicos, y pueden ser inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam. Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se clasifican dentro de la clase A según la categorización de Ambler. Se ha observado la existencia de BLEE que proporcionan resistencia ante cefalosporinas de tercera generación en cepas de *Shigella*. El primer reporte que describe el descubrimiento de cepas de *Shigella* que producen BLEE provienen de Bangladesh en 2004, lo cual constituye una seria amenaza global para la salud, impactando a países desarrollados como a los que están en desarrollo (**Rahman et al., 2004**).

A pesar de que la mayoría de las BLEE tienen su origen en las familias de β -lactamasas SHV y TEM, que fueron identificadas inicialmente, *Shigella* spp además tiene la capacidad de expresar la familia CTX-M. Dentro de esta familia, CTX-M-15 es uno de los descubrimientos más significativos asociados con la epidemiología actual de las BLEE. Se ha identificado predominantemente en aislados de *Shigella* productores de BLEE, tanto comensales como patógenos, en diversas regiones del mundo. Hasta la fecha, se ha constatado la presencia de CTX-M-15 en aislados de *Shigella* provenientes de varios países, incluyendo Irán, Turquía, Bulgaria, Francia, el Reino Unido, Polonia, Canadá, Rusia y Polonia (**Bialvaei et al., 2017**).

Las β -lactamasas de tipo CTX-M comprenden al menos 40 variedades, y estas pueden transferirse fácilmente entre aislados de *Shigella* mediante plásmidos conjugativos clasificados en los grupos IncF, IncZ e Incl (**Kim et al., 2014**). Según el estudio de (**Li et al., 2015**) se observó que el elemento IS *Ecp1* estaba ubicado de manera contigua a todos los genes *bla*_{CTX}. en las cepas de *Shigella*, indicando así que desempeña un papel crucial en la movilización de los genes *bla*_{CTX}.

Los genes BLEE entre los aislados de *Shigella* podrían ser transferidos de aislados de *E. coli* a *Shigella* spp, particularmente a los aislados de *S. sonnei*, mediante el proceso de conjugación en el intestino humano. La adquisición de resistencia y la presencia de BLEE en *Shigella* spp. pueden ser responsables de los fallos en el tratamiento y, por ende, restringir las opciones terapéuticas disponibles (**Rashid & Harunur, 2015**).

β -Lactamasas Clase B: son enzimas que tienen la capacidad de descomponer el carbapenem y otros β -lactámicos, con la excepción del aztreonam. A diferencia de las β -lactamasas tradicionales, como el tazobactam y el ácido clavulánico, los cuales no pueden inhibirlas, estas enzimas son resistentes a los inhibidores clásicos. La metalo- β -lactamasa, inicialmente descubierta en un plásmido transferible de *Pseudomonas aeruginosa*, y la IMP-1, identificada por primera vez en varios tipos de bacilos gramnegativos en Japón (**Thamizhmani et al., 2015**).

En un estudio por (**Hara et al., 1998**) se dio a conocer la existencia de una nueva variedad de metalo- β -lactamasa llamada MET-1, la cual estaba mediada por un plásmido presente en *S. flexneri*. Los investigadores sugirieron que MET-1 podría ser un derivado de la β -lactamasa IMP-1. Dicho plásmido no solo otorgaba resistencia ante la kanamicina y sulfonamida, sino que también estaba asociado con la presencia de β -lactamasa. En otra investigación llevada a cabo por (**Iyobe et al., 2000**) se descubrió que MET-1 había experimentado dos cambios de aminoácidos en comparación con IMP-1. Como resultado, el gen fue reclasificado como IMP-3, considerándose así un ancestro de la β -lactamasa IMP-1. Además, se evidenció que este gen estaba ubicado en un casete insertado en un integrón de clase I, que estaba ampliamente distribuido entre varias especies de *Shigella*. Este integrón proporcionó resistencia a prácticamente todos los antibióticos β -lactámicos.

β -Lactamasas Clase C: Se sugiere la utilización de ceftriaxona en el tratamiento de *Shigella* que presenta resistencia a ciprofloxacina. No obstante, en la actualidad, ciertas cepas de *Shigella* spp. poseen un gen que las hace resistentes a las cefalosporinas. Las

enzimas de tipo AmpC, clasificadas como β -lactamasas de clase C, otorgan una resistencia sustancial a las cefalosporinas. La β -lactamasa AmpC está codificada por genes presentes tanto en plásmidos como en el cromosoma, y el primer reporte de la presencia de β -lactamasa AmpC de tipo CMY-2 codificada por plásmidos se identificó en cepas de *S. sonnei* resistentes ante ceftriaxona conseguidas de un brote de disentería bacilar en Taiwán (**Zamanlou et al., 2018**). En una investigación realizada en China por (**Zhang et al., 2014**) identificaron dos cepas de *Shigella* productoras de β -lactamasa AmpC, con *bla*_{CMY-2} y *bla*_{DHA-1} en pacientes con diarrea.

3.3.3 Mecanismos de resistencia de *Shigella* spp a Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son empleados en el tratamiento de una amplia variedad de infecciones. La inhibición de la síntesis de proteínas se lleva a cabo mediante aminoglucósidos. La resistencia a estos compuestos se vincula con la inactivación enzimática, modificaciones en el ribosoma y la actividad de bombas de eflujo. Entre estos mecanismos, las enzimas que modifican los aminoglucósidos prevalecen en el ámbito clínico. Estas enzimas se activan a través de tres reacciones generales, que dan lugar a la adenilación, acetilación o fosforilación. El aminoglucósido adeniltransferasa (gen *aadA*) es especialmente prevalente en enterobacterias, particularmente en aislados de *Shigella* y *Salmonella*, y otorga resistencia a la espectinomicina estreptomicina (**Iversen et al., 2003**).

En realidad, la resistencia a la estreptomicina está fuertemente asociada a los integrones, dado el alto índice de presencia de cassettes del gen *aadA* en los integrones de clase 1 y 2. Un integrón convencional de clase 2 se caracteriza por tener un cassette genético de 2,2 kb, que presenta una disposición relacionada a genes de resistencia (*dfrA1 – sat – aadA1*). Esto confiere resistencia al trimetoprim, estreptomicina y estreptotricina, correspondientemente. Es importante destacar que los integrones de clase 2 atípicos no contienen el gen *aadA1* (**Michael & Schwarz, 2016**).

Se han detectado integrones de clase 2 en el transposón Tn7, y su inserción ha ocurrido mayoritariamente en cromosomas con una frecuencia significativa (**Dutta et al., 2014**). Se ha identificado un integrón atípico de clase 1 con una secuencia conservada inusual que contiene una serie de casetes qacH - cmlA-aadA1 - aadA2 - estX – psp en diversas especies gramnegativas *Shigella* spp, *E. coli* y *Salmonella* de distintos hospedadores (humana, animal y alimentaria), períodos y regiones geográficas. Por lo tanto, la transferencia horizontal de estos integrones a través de plásmidos facilita la diseminación de genes de resistencia múltiple tanto en aislamientos esporádicos como en brotes de infecciones por *Shigella* (**Chang et al., 2011**).

Se han reconocido diversos tipos de cassettes del gen *aadA* en las enterobacterias, aunque los tipos *aadA1* y *aadA2* son prominentes entre los aislamientos de *Shigella*. Los genes *strA* y *strB* más comúnmente distribuidos entre los aislados de *Shigella* mediante plásmidos, como IncFII y pNV-Y394 (**Gassama et al., 2010**). En concreto el gen que codifica *strA* se ha identificado en un 42,1% de los aislados de *Shigella* recuperados de pacientes con diarrea en Pakistán (**Muthuirulandi et al., 2019**). En un estudio realizado en la India por (**Tariq et al., 2012**), el 100 % y el 88 % de las cepas de *S. Dysenteriae* tipo 1 y *S. sonnei* albergaban genes *strA*, que codificaban la resistencia a la estreptomicina.

3.3.4 Mecanismos de resistencia de *Shigella* spp a Macrólidos

La Academia Estadounidense de Pediatría y la Sociedad Estadounidense de Enfermedades Infecciosas recomendaron la azitromicina como medicamento para el tratamiento de la shigelosis en niños, y también la OMS la introdujo como tratamiento de segunda línea en adultos. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades han registrado aproximadamente un 3% de resistencia a la azitromicina en los casos de *Shigella* examinados (**Salah et al., 2019**). En los brotes resistentes que involucran a *Shigella* spp, se observa que los aislamientos con susceptibilidad reducida a la azitromicina son fenómenos más recientes y continúan siendo identificados en

diversos países como Australia, Estados Unidos, América del Norte, Asia (**Yousfi et al., 2019**).

En informes recientes, se ha planteado la posibilidad de que la resistencia a la azitromicina en aislamientos de *Shigella* spp. esté relacionada con la existencia de genes como *mphA* o *ermB*, los cuales son transmitidos a través de plásmidos, ya sea de manera individual o combinada. La resistencia ante macrólidos se encuentra intervenida por cuatro principales mecanismos: inactivación enzimática por fosfotransferasas codificadas por genes *mph*; modificación del sitio objetivo mediante una ARNr metilasa codificada por genes *erm* ; mutaciones precisas en *rplV* que codifica la proteína ribosomal L22, *rplD* que codifica la proteína ribosomal L4 y *rrlH* (23S rRNA); y resistencia a los medicamentos mediada por bombas de eflujo, como *msrA*, *mefA*, *OmpW*, *OmpA* (**Liao et al., 2017**).

Todos los mecanismos de resistencia ante macrólidos tienen la capacidad de conferir resistencia tanto para azitromicina y eritromicina. El gen *mph(A)* fue inicialmente identificado en un aislado de *E. coli* originario de Japón, y desde entonces, se ha detectado en diversas bacterias como *Shigella* spp, *Stenotrophomonas* spp, *Pseudomonas* spp, *Aeromonas* spp y otros enteropatógenos (**Zhang et al., 2017**). La propagación y adquisición del mecanismo de resistencia a macrólidos *mphA* en *Shigella* spp se ha demostrado principalmente a través de la diseminación de plásmidos de *E. coli* (**Mannion et al., 2018**). Plásmidos asociados a *mphA* han sido identificados en aislamientos de *E. coli*, sugiriendo su papel como una fuente desde la cual puede surgir la resistencia a los antimicrobianos en *Shigella* spp. Este fenómeno ha sido previamente descrito en *E. coli*, donde la transferencia de *mphA* a *S. sonnei* ha sido documentada (**Darton et al., 2018**).

Recientemente, se ha descrito que un plásmido que porta genes de resistencia a la azitromicina, a saber, pKSR100 (plásmido R conjugativo) en *S. flexneri* serotipo 3a, está involucrado en la propagación intercontinental de RSA entre el linaje de brotes

asociados a hombres que tienen sexo con hombres (Dallman et al., 2015). Plásmidos similares a pKSR100 están predominantemente relacionados con el linaje de brotes asociados a hombres que tienen sexo con hombres (HSH) en Australia y otros lugares. Existe una cantidad significativa de investigaciones sobre la prevalencia de resistencia a los antibióticos en aislamientos de *Shigella* a nivel mundial, especialmente en HSH. Estos estudios han evidenciado la propagación a nivel global de un plásmido multirresistente, fuertemente vinculado a HSH, y que se encuentra presente en distintos continentes (Ingle et al., 2019).

3.4. Verificación de Hipótesis

Los resultados de esta investigación cumplen con la hipótesis alternativa, ya que las cepas de *Shigella* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua, muestra resistencia a los antibióticos (ciprofloxacina, Amoxicilina + ácido clavulánico, Ceftriaxona, Gentamicina y Azitromicina) utilizados en el estudio.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Las cepas de *Shigella* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato provincia de Tungurahua, mostraron una notable resistencia ante las fluoroquinolonas, seguida de resistencia ante los betalactámicos y en menor medida ante los aminoglucósidos y macrólidos, siendo estos últimos los más eficaces para enfrentar a la bacteria *Shigella* spp.
- 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 las dosis recomendadas por la CLSI, esto se atribuye al rápido desarrollo y mejora de los mecanismos de resistencia de *Shigella* spp, especialmente debido al uso inapropiado de antibióticos a nivel global.
- *Shigella* spp muestra diversos mecanismos moleculares de resistencia a una misma familia de antibióticos e inclusive ha desarrollado mecanismos específicos para resistir ante ciertos antibióticos, permitiéndole evadir, en algunos casos, de manera efectiva la acción farmacodinámica de estos medicamentos.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda llevar a cabo investigaciones experimentales sobre los genes de resistencia que podrían manifestar las cepas de *Shigella* spp analizadas en este estudio, con especial énfasis en la diferenciación entre especies, como *S. sonnei*, *S. flexneri* y *S. dysenteriae*, ya que se han observado diferencias significativas en sus mecanismos de acción.
- Se aconseja utilizar medicamentos solo cuando resulten imprescindibles, considerando tanto su mecanismo de acción como su espectro de actividad. Asimismo, se sugiere, siempre que sea viable, complementar el tratamiento con un antibiograma que identifique la sensibilidad del patógeno ante el antimicrobiano, con el fin de prevenir el aumento de la resistencia bacteriana.
- Se sugiere llevar a cabo una investigación detallada en la ciudad de Ambato con el propósito de identificar de manera precisa el punto de contaminación. Además, es importante implementar programas sanitarios e higiénicos durante el proceso de faenamiento de aves, con el objetivo de prevenir la contaminación bacteriana que podría representar un riesgo patógeno para el humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, A., Wajahat, S., & Shad, A. (2021). Shigella sonnei : virulence and antibiotic resistance. *Archives of Microbiology*, 203(1), 45–58.
<https://doi.org/10.1007/s00203-020-02034-3>
- Ali, S., & Alsayeqh, A. F. (2022). Review of major meat-borne zoonotic bacterial pathogens. *Front Public Health*, 10(1045599), 1–17.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9799061/pdf/fpubh-10-1045599.pdf>
- Anderson, M. C., Vonaesch, P., Saffarian, A., Marteyn, B. S., & Sansonetti, P. J. (2017). Shigella sonnei codifica un T6SS funcional utilizado para la competencia interbacteriana y la ocupación de nichos. *Cell Host and Microbe*, 21(6), 769-776.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.05.004>
- Anselmo, R. J., Ojeda, P. A., & Barrios, H. A. (2020). Detection and antimicrobial susceptibility of Shigella spp. In prepared, ready to eat salads. *Informacion Tecnologica*, 31(1), 13–20. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642020000100013>
- Astocondor, L. (2018). Artículo de revisión betalactamasas: la evolución del problema. *Revista Peruana de Investigación En Salud*, 2(2), 42–49.
<file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/Dialnet-Betalactamasas-7174441.pdf>
- Azmi, I., Khajanchi, B., Akter, F., Hasan, T., Shahnaij, Mohammad Akter, M., Banik, A., & Sultana, H. (2014). Mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas de Shigella flexneri aislados en Bangladesh. *Plos One*, 9(7), e102533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102533>
- Baker, K. S., Dallman, T. J., Field, N., Childs, T., Mitchell, H., Day, M., Weill, F., Lefèvre, S., Tourdjman, M., Hughes, G., Jenkins, C., & Thomson, N. (2018). La transferencia horizontal de resistencia a los antimicrobianos impulsa epidemias de múltiples especies de Shigella. *Nature Communications*, 9(1462), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03949-8>
- Bantawa, K., Rai, K., Limbu, D. S., & Khanal, H. (2018). Food - borne bacterial pathogens in marketed raw meat of Dharan , eastern Nepal. *BMC Research*

Notes, 11(618), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3722-x>

- Bantawa, K., Sah, S. N., Subba Limbu, D., Subba, P., & Ghimire, A. (2019). Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Vibrio* isolated from chicken, pork, buffalo and goat meat in eastern Nepal. *BMC Research Notes*, 12(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4798-7>
- Bialvaei, A. Z., Poulak, T., Aghamali, M., Asgharzadeh, M., Gholizadeh, P., & Kafil, H. S. (2017). La prevalencia de β -lactamasas de espectro extendido CTX-M-15 entre *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. Aislado de tres hospitales iraníes. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 7(2), 133–137. <https://doi.org/10.1556/1886.2017.00004>
- Bliven, K., & Lampel, K. (2017). *Shigella*: taxonomía. In *Enfermedades transmitidas por los alimentos* (Tercera, pp. 171–188). <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/shigella>
- Bowen, A., Hurd, J., Hoover, Cora Khachaourian, Yvette Traphagen, E., Libby, T., & Ehlers, S. (2015). Importación y transmisión nacional de *Shigella sonnei* resistente a la ciprofloxacina - Estados Unidos, mayo de 2014 a febrero de 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 64(12), 318–320. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25837241>
- Britanialab. (2021). *Guía de Medios Britanialab*. <https://www.britanialab.com/home>
- Calcuttawala, F., Hariharan, C., Pazhani, G., Ghosh, S., & Ramamurthy, T. (2015). Espectro de actividad de las colicinas producidas por *Shigella sonnei* y mecanismo genético de resistencia a las colicinas en *S. sonnei* Cepas y *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(1), 152–158. <https://doi.org/10.1128%2FAAC.04122-14>
- Carrillo, J., Flores, F., & Rodríguez, A. (2018). Actualización en la prescripción de fluoroquinolonas. *Med Int Méx*, 34(1), 89–105.
- Chang, C., Lu, P., Lin, C., Lee, T., Tsai, M., & Chang, L. (2011). Tipos de integrones, casetes de genes, genes de resistencia a los antimicrobianos y

plásmidos de aislamientos de *Shigella sonnei* de brotes y casos esporádicos en Taiwán. *J Med Microbiol*, 30(2), 197–204.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.022517-0>

Chung, H., & Baker, S. (2018). Out of Asia : the independent rise and global spread of fluoroquinolone-resistant *Shigella*. *Microb Genom*, 4(4).

<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000171>

CLSI. (2016). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (26th ed.). file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/CLSI-2016 (1).pdf

Conave. (2019). *Estadísticas del sector Avícola*. <https://conave.org/informacion-sector-avicola-publico/>

Dallman, T., Ashton, P., Baker, K., Day, M., Hughes, G., Crook, P. D., Gilbert, V., Zittermann, S., Allen, V., Howden, B., Tomita, T., Valcanis, M., Harris, S., Connor, T., Sintchenko, V., Howard, P., Brown, J. D., Petty, N. K., Gouali, M., ... Thomson, N. (2015). Difusión intercontinental de shigelosis resistente a azitromicina a través de transmisión sexual: un estudio transversal. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(8), 913–921. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00002-X)

Darton, T., Tuyen, H., Chung, H., Newton, P., Danza, D., Phetsouvanh, R., Davong, V., Campbell, J., Thanh, D., & Barker, E. (2018). Resistencia a azitromicina en *Shigella* spp. en el sudeste asiático. *Agentes Antimicrobianos Quimioterápicos*, 62(4), 1–11. <https://doi.org/10.1128%2FAAC.01748-17>

Das, A., & Mandal, J. (2019). Caracterización molecular y tipificación de replicones basada en PCR de aislados de *Shigella sonnei* resistentes a múltiples fármacos de un brote en Thimphu, Bután. *Gut Pathogens*, 11(33), 1–8.

<https://doi.org/10.1186/s13099-019-0314-9>

Das, A., Natarajan, M., & Mandal, J. (2016). La aparición de *Shigella sonnei* resistente a las quinolonas , Pondicherry, India. *PLoS One*, 11(8), e0160290.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27494616>

De la Fuente, Norma Villarreal, J., Díaz, M., & García, A. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia

bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(2), 7–16.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007&lng=es

Del Valle, A., Grenón, S., Leguizamón, L., Pallares, S., Salvi-Grabulosa, M., & Von-Spech, M. (2022). Prevalence and antimicrobial profile of *Shigella* causing acute diarrheal disease in pediatrics in Posadas, Misiones. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 38, 71–75.

<https://www.fceqyn.unam.edu.ar/recyt/index.php/recyt/article/view/722/748>

Dinaol, B., Kamau, P., Gobena, T., Hald, T., & Gobena, T. (2021). Prevalence and epidemiological distribution of selected foodborne pathogens in human and different environmental samples in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *One Health Outlook*, 3(19).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7969299/>

Dota, C. (2017). *Resistencia a antibióticos de uso veterinario en Enterobacterias y Campylobacter aisladas de pollos faenados expendidos en el Mercado “El Arenal” de Cuenca*.

<https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/7556/1/13438.pdf>

Duarte, R., Hernández, C., Delgado, Z., García, D., Bermúdez, R., & Meras, R. (2021). Resistencia antimicrobiana de cepas de *Shigella* aisladas en el Hospital Pediátrico Universitario “José Luis Miranda.” *Acta Médica Del Centro*, 15(2), 270–279. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2709-79272021000200270&lng=es&tlng=es

Dutta, S., Jain, P., Nandy, S., Matsushita, S., & Yoshida, S. (2014). Caracterización molecular de serovares provisionales serológicamente atípicos de aislados de *Shigella* de Calcuta, India. *J Med Microbiol*, 63(12), 1696–1703.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.081307-0>

GAD-Cevallos, M. del C. C. (2011). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Cevallos. *Chasqui: Revista Latinoamericana de Comunicación*.

<http://www.cevallos.gob.ec/index.php/component/phocadownload/category/170-plan-de-ordenamiento-y-desarrollo-territorial-pdot%0Ahttp://www.cevallos.gob.ec/index.php/component/phocadownload/cat>

egory/170-plan-de-ordenamiento-y-desarrollo-territorial-pdot#

- Gassama, A., Aïdara, A., Barraud, O., Gatet, M., Denis, F., & Ploy, M. (2010). Alta prevalencia de casetes de resistencia a trimetoprima en integrones de clase 1 y 2 en aislados senegaleses de *Shigella* spp. *J Infect Dev Ctries*, 4(4), 207–2012. <https://doi.org/10.3855/jidc.583>
- Gavarrete, K., Guevara, V., & Rivas, M. (2021). *Frecuencia de serogrupos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de Shigella spp remitidas al cndr que fueron aisladas en los distintos departamentos de Nicaragua durante el periodo 2017-2020*. <https://repositorio.unan.edu.ni/15452/1/15452.pdf>
- Gebreegziabher, G., Asrat, D., Amanuel, Y., & Hagos, T. (2018). Isolation and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Shigella* and *Salmonella* Species from Children with Acute Diarrhoea in Mekelle Hospital and Semen Health Center , Ethiopia. *Ethiop J Health Sci*, 28(2), 197–206. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6016337/#R6>
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J., Morfín-Otero, M., Torres-López, F., & Alcántar-Curie, M. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156(2), 172–180. [10.24875/GMM.20005624](https://doi.org/10.24875/GMM.20005624)
- Gu, B., Qin, T., Fan, W., Bi, R., Chen, Y., Li, Y., & Ma, P. (2017). Nuevas mutaciones en *gyrA* y *parC* entre cepas de *Shigella sonnei* de la provincia china de Jiangsu, 2002-2011. *International Journal of Infectious Diseases*, 59, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.023>
- Hara, K., Haruta, S., Sawai, T., Tsunoda, M., & Iyobe, S. (1998). Nueva metalo beta-lactamasa mediada por un plásmido de *Shigella flexneri*. *FEMS Microbiol Lett*, 162(2), 201–206. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12999.x>
- Ingle, D., Easton, M., Valcanis, M., Seemann, T., Kwong, J., Stephens, N., Carter, G., Gonçalves Da Silva, A., Adamopoulos, J., Baines, S., Holt, K., Chow, E., Fairley, C., Chen, M., Kirk, M., Howden, B., & Williamson, D. (2019). Co-circulation of Multidrug-resistant *Shigella* among Men Who Have Sex with Men in Australia. *Clinical Infectious Diseases*, 69(9), 1535–1544.

<https://doi.org/10.1093/cid/ciz005>

Iversen, J., Sandvang, D., Srijan, A., Cam, P., & Dalsgaard, A. (2003).

Caracterización de resistencia antimicrobiana, plásmidos y casetes de genes en *Shigella* spp. de pacientes en Vietnam. *Microb Drug Resist*, *1*(1), 17–24.

<https://doi.org/10.1089/107662903322541856>

Iyobe, S., Kusadokoro, H., Ozaki, J., Matsumura, N., Minami, S., Haruta, S., Sawai,

T., & O'Hara, K. (2000). Sustituciones de aminoácidos en una variante de la metalo- β -lactamasa IMP-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(8), 2023–2027. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.8.2023-2027.2000>

Julqarnain, S. M., Bose, P., Rahman, Z., Khatun, M., & Islam, A. (2022).

Bacteriological quality and prevalence of foodborne bacteria in broiler meat sold at live bird markets at Mymensingh City in Bangladesh. *Javar*, *9*, 405–411.

Juneja, V., Sehgal, S., & Singh, P. (2023). Bacteria: *Shigella* clasificación y

características. In G. W. Smithers (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety (Second Edition)* (Segunda, pp. 293–302).

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/shigella>

Kim, J. ., Kim, J., Jeon, S., Kim, S., Kim, N., Hong, S., Kang, Y., Han, S., & Ghung,

G. (2014). Secuencia de nucleótidos completa del plásmido IncII pSH4469 que codifica la β -lactamasa de espectro extendido CTX-M-15 en un aislado clínico de *Shigella sonnei* de un brote en la República de Corea. *Agentes Antimicrobianos Int J*, *44*(6), 533–537.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.08.007>

Kim, J., Kim, S., Jeon, S., Park, M., Rhie, H., & Lee, B. (2008). Resistencia a las

fluoroquinolonas mediante la combinación de mutaciones en el sitio objetivo y expresión mejorada de genes para bombas de eflujo en cepas de *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* aisladas en Corea. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(8), 760–765. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02033.x>

Lampel, K., Formal, S., & Maurelli, A. (2018). A Brief History of *Shigella*. *Ecosal*

Plus, *8*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1128%2Fecosalplus.ESP-0006-2017>

- Li, J., Li, B., Ni, Y., & Sun, J. (2015). Caracterización molecular de *Shigella* spp. productora de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE). En shangai. *J Clin Microbiol Infect Dis*, 34(3), 447–451. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2244-2>
- Liao, Y., Liu, Y., Lo, Y., & Chiou, C. (2017). *Shigella flexneri* 3a no susceptible a azitromicina en hombres que tienen sexo con hombres, Taiwán, 2015-2016. *Enfermedad Infecciosa Emergente*, 23(2), 345–346. <https://doi.org/10.3201%2Fid2302.161260>
- Lopardo, H. (2020). Antibióticos: Clasificación, Estructura, Mecanismos De Acción Y Resistencia. In *Libros de Cátedra*. <https://doi.org/10.35537/10915/103061>
- Mahato, A., Mahato, S., & Dhakal, K. (2020). Investigating the Diversity of Spoilage and Food Intoxicating Bacteria from Chicken Meat of Biratnagar ., *J Bacteriol Mycol*, 7(5), 1–5. <https://austinpublishinggroup.com/bacteriology/fulltext/bacteriology-v7-id1141.pdf>
- Mama, M., & Alemu, G. (2016). Prevalence , antimicrobial susceptibility patterns and associated risk factors of *Shigella* and *Salmonella* among food handlers in Arba Minch University , South. *BMC Infectious Diseases*, 16(686), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2035-8>
- Mannion, A. J., Martin, H. R., Shen, Z., Buckley, E. M., Dzik-fox, J. L., Garcia, A., Marini, R. P., Patterson, M. M., & Fox, J. G. (2018). Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos en *Shigella flexneri* aislada de macacos. *Front Microbiol*, 9, 311. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00311>
- Marami, D., Hailu, K., & Tolera, M. (2018). Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of *Salmonella* and *Shigella* species among asymptomatic food handlers working in Haramaya University cafeterias, Eastern Ethiopia. *BMC Research Notes*, 11(1), 7–12. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3189-9>
- Marcoleta, A., Toro, C., Prado, V., Serrano, M., Fernández, P., Benadof, D., Camponovo, Rossana Campos, V., Porte, L., Zamorano, J., Ortega, C., Urqueta, B., & Ulloa, T. (2013). Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de

- Shigella sonnei aisladas durante tres períodos diferentes en la región metropolitana, Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 30(6), 616–621.
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000600007>
- Mattock, E., & Blocker, A. (2017). How Do the Virulence Factors of Shigella Work Together to Cause Disease? *Front Cell Infect Microbiol*, 7(64), 1–24.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00064>
- Michael, G., & Schwarz, S. (2016). Resistencia a los antimicrobianos en Salmonella zoonótica no tifoidea: ¿una tendencia alarmante? *Clin Microbiol Infect*, 22(12), 968–974. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.033>
- Ministerio de Salud. (2019). Vigilancia de Laboratorio de Shigella spp . Chile 2014-2018. *Boletín Vigilancia de Laboratorio*, 9(10), 3–4.
https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletínShigella-final_2019_0.pdf
- Muthuirulandi, D., Anandan, S., Devanga, N., Gajendiran, R., & Kuroda, Makoto Veeraraghavan, B. (2019). Plásmido IncFII que porta genes de resistencia a los antimicrobianos en Shigella flexneri: vehículo de diseminación. *Resistencia Antimicrobiana J Glob*, 16, 215–219. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.10.014>
- NCBI. (2023). *Taxonomy Browser. Shigella*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/tree/?taxon=620>
- OMS. (2022). *Infecciones por Shigella sonnei extensamente resistente - Región Europea (EURO)*. <https://www.who.int/es>
- Pakbin, B., Amani, Z., Allahyari, S., Mousavi, S., Mahmoudi, R., Brück, W. M., & Peymani, A. (2021). Genetic diversity and antibiotic resistance of Shigella spp. isolates from food products. *Food Science and Nutrition*, 9(11), 6362–6371.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.2603>
- Pakbin, B., Brück, W. M., & Brück, T. B. (2023). Mecanismos moleculares de la patogénesis de Shigella ; Avances recientes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms24032448>
- Pakbin, B., Didban, A., Monfared, Y. K., Mahmoudi, R., & Peymani, A. (2021). Antibiotic susceptibility and genetic relatedness of Shigella species isolated

- from food and human stool samples in Qazvin ,. *BMC Research Notes*, *14*, 1–6.
<https://doi.org/10.1186/s13104-021-05554-3>
- Partridge, S. (2011). Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol*, *35*(5), 820–855. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x>
- Pozo, Á., Arana, D., Fuentes, M., & Alós, J. (2014). Sensibilidad a azitromicina y otros antibióticos en aislados recientes de Salmonella , Shigella y Yersinia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *32*(6), 369–371.
<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X14000639>
- Pulido, M., & Reporter, R. (2013). Brote de infecciones causadas por Shigella sonnei con menor susceptibilidad a la azitromicina. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, *62*(9), 171. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4604789/>
- Puzari, M., Sharma, M., & Chetia, P. (2018). Emergence of antibiotic resistant Shigella species: A matter of concern. *Journal of Infection and Public Health*, *11*(4), 451–454. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.025>
- Rabins, L. (2021). Epidemiological Study on Shigella from Meat and its Public Health Significance. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *10*(12), 433–443.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1012.048>
- Rahman, M., Shoma, S., Rashid, H., Siddique, K., Nair, B., & Sack, D. A. (2004). Resistencia a cefalosporinas de tercera generación mediada por beta-lactamasas de espectro extendido en aislados de Shigella en Bangladesh. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *54*(4), 846–847.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkh413>
- Ranjbar, R., & Farahani, A. (2019). Shigella: Antibiotic-resistance mechanisms and new horizons for treatment. *Dovepress Infection and Drug Resistance*, *12*, 3137–3167. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219755>
- Rashid, H., & Harunur, R. (2015). Posible transferencia de resistencia a cefalosporinas de tercera generación mediada por plásmidos entre Escherichia

coli y *Shigella sonnei* en el intestino humano. *Infect Genet Evol*, 30, 15–18.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.023>

Rodríguez, E., Herrera, S., Gómez, E., Navarro, J. M., & Gutiérrez, J. (2023). Shigellosis attended in the emergency department of a regional hospital in southeastern Spain: from their presence to multiresistance. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 36(3), 282–290. <https://doi.org/10.37201/req/121.2022>

Salah, M., Shtayeh, I., Ghneim, R., Al-qass, R., Sabateen, A., Marzouqa, H., Hospital, A. V., & Jerusalem, E. (2019). Evaluación de valores de corte epidemiológicos CLSI de azitromicina de especies de *Shigella* y genes de resistencia a macrólidos. *Journal Clinical Microbiology*, 57(4), 1–7.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30700507>

Silveira, L., & Machado, J. (2018). *Caracterización fenotípica de Shigella spp entre 2015 y 2017* [Repositorio Científico del Instituto Nacional de Salud].
https://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/5550/1/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_N21_2018_artigo5.pdf

Tamanna, & Ramana, J. (2016). Conocimientos estructurales sobre el mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas de la ADN girasa y la topoisomerasa IV de *Shigella flexneri*. *Microb Drug Resist*, 22(5), 404–411.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0018>

Taneja, N., Mishra, A., Kumar, A., Verma, G., & Sharma, M. (2015). Enhanced resistance to fluoroquinolones in laboratory-grown mutants & clinical isolates of *Shigella* due to synergism between efflux pump expression & mutations in quinolone resistance determining region. *Indian Journal of Medical Research, Supplement*, 141(1), 81–89. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.154508>

Tariq, A., Haque, A., Ali, A., Bashir, S., & Habeeb, Muhammad Salman, Muhammad Sarwar, Y. (2012). Perfil molecular de resistencia a los antimicrobianos y asociación de integrones de aislados clínicos multirresistentes de especies de *Shigella* de Faisalabad, Pakistán. *Can J Microbiol*, 58(9), 1047–1054. <https://doi.org/10.1139/w2012-085>

Thamizhmani, R., Rhagavan, R., Sugunan, A., & Vijayachari, P. (2015). *Shigella*

spp., productora de metalo- β -lactamasa de tipo VIM e IMP. en diarrea infantil de las Islas Andamán. *Infect Dis*, 47(10), 749–750.

<https://doi.org/10.3109/23744235.2015.1022874>

Tijerino, A., Oropeza, G., Vargas, J., Cortes, M., & Bolaños, H. (2019). *Informe de vigilancia basada en laboratorio : Shigella Costa Rica , enero – setiembre 2019*. 1–10.

[https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2019/Bacterias/Informe de vigilancia de laboratorio de Shigella Enero - Setiembre 2019.pdf](https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2019/Bacterias/Informe%20de%20vigilancia%20de%20laboratorio%20de%20Shigella%20Enero%20-%20Setiembre%202019.pdf)

TM MEDIA. (2014). *Agar tripticasa de soya*.

<https://labsupply.com.ec/producto/agar-tripticasa-soya/>

TM MEDIA. (2019a). *Brain heart infusion broth*. <https://www.tmmedia.in/wp-content/uploads/TD/TD-TM-362.pdf>

TM MEDIA. (2019b). *Mueller hinton agar*. <https://www.tmmedia.in/wp-content/uploads/TD/TD-TRM-339.pdf>

TM MEDIA. (2022). *Luria Bertani Broth, Miller (Miller Luria Bertani Broth)*.

Treviño, N., & Molina, N. (2022). Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. *Material de Cátedra Correspondiente a La Clase: Generalidades de Bacteriología*, 1–9. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/136280>

Uddin, J., Hossain, K., Hossain, S., Saha, K., Jubya, F. T., Haque, R., Billah, B., Talukder, A. A., Parvez, A. K., & Dey, S. K. (2019). Bacteriological assessments of foodborne pathogens in poultry meat at different super shops in Dhaka, Bangladesh. *Italian Journal of Food Safety*, 8(6720), 15–20.

<https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.6720>

Ulloa, F. (2015). *Análisis de los métodos para medir la turbidez de los inóculos y su influencia en el antibiograma de la bacteria E. coli en urocultivos*.

[https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10786/1/TESIS FREDDY ULLOA.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10786/1/TESIS%20FREDDY%20ULLOA.pdf)

Villacrés Granda, I., & Alcocer, I. (2015). Sensibilidad antimicrobiana entre los

serogrupos de Shigellae aislados en la ciudad de Quito-Ecuador. *ACI Avances En Ciencias e Ingenierías*, 7(2), 30–36. <https://doi.org/10.18272/aci.v7i2.255>

Yousfi, K., Gaudreau, C., Pilon, P., Lefebvre, B., Walker, M., Fournier, É., Doualla, Florence Martineau, Christine Longtin, J., & Bekal, S. (2019). Mecanismos genéticos detrás de la propagación de la susceptibilidad reducida a la azitromicina en cepas de Shigella aisladas de hombres que tienen sexo con hombres en Quebec, Canadá. *Antimicrob Agents Chemother*, 63(2). <https://doi.org/10.1128%2FAAC.01679-18>

Zamanlou, S., Rezaee, M., Aghazadeh, M., Ghotaslou, R., Babaie, F., & Khalili, Y. (2018). Caracterización de integrones, β -lactamasas de espectro extendido, cefalosporinasa AmpC, resistencia a quinolonas y tipificación molecular de Shigella spp. De Irán. *Infect Dis*, 50(8), 616–624. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1455222>

Zhang, C., Liu, Q., Wang, J., Chu, X., Shen, L., & Guo, Y. (2014). Epidemia y virulencia características de Shigella spp. con resistencia a cefalosporinas de espectro extendido en el distrito de Xiaoshan, Hangzhou, China. *BMC Infect Dis*, 14(260). <https://doi.org/10.1186%2F1471-2334-14-260>

Zhang, C., Qi, Y., Chu, X., Sun, J., & Liu, Q. (2017). Disminución de la susceptibilidad a la azitromicina entre aislados clínicos de Shigella procedentes de China. *Microb Drug Resist*, 23(5), 596–601. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0134>

Zhang, W., Chen, H., Xi, M., & Zhang, J. (2019). Mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas en aislados de Shigella en Shanghai, China, entre 2010 y 2015. *Resistencia Microbiana a Los Medicamentos*, 25(2), 212–218. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0113>

ANEXOS

Anexo 1. Tabulación resultados Fase 1 (Antibiorresistencia)

A	B	C	D	E
CEPA	DISCO	R1 mm	R2 mm	R3 mm
N18_ B 396	AZM	17	20	19
	CRO	25	27	28
	CIP	22	21	23
	AMC	18	19	19
	CN	15	19	19
N21_ B454	AZM	23	23	17
	CRO	0	0	0
	CIP	17	17	16
	AMC	18r	18r	17r
	CN	14r	13r	12r
N19	AZM	19	18	18
	CRO	29	28	29
	CIP	25r	26r	26r
	AMC	18r	19r	18r
	CN	18	18	19
N36_ B410	AZM	22	21	22
	CRO	27	27	27
	CIP	0	0	0
	AMC	18r	18r	18r
	CN	18	18	18
N37	AZM	22	21	23

Anexo 2. Resultado del cálculo estadístico, Fase 1

	Antibiótico	repeticiones	Sensibilidad escala (1-3)	
S. flexneri N18	Aislado 1	1	1	
ATCC 23903		1	2	1
		1	3	1
		2	1	1
		2	2	1
		2	3	1
		3	1	1
		3	2	1
		3	3	1
		4	1	1
		4	2	1
		4	3	1
		5	1	1
		5	2	1
		5	3	1
S. sonnei N21	Aislado 2	1	1	1
Uyi_30		1	2	1
		1	3	1
		2	1	3

Anexo 3. Actividades realizadas durante la fase 1



Refrescamiento de cepas de *Shigella* spp



Estriación en agar Trypticase de Soya



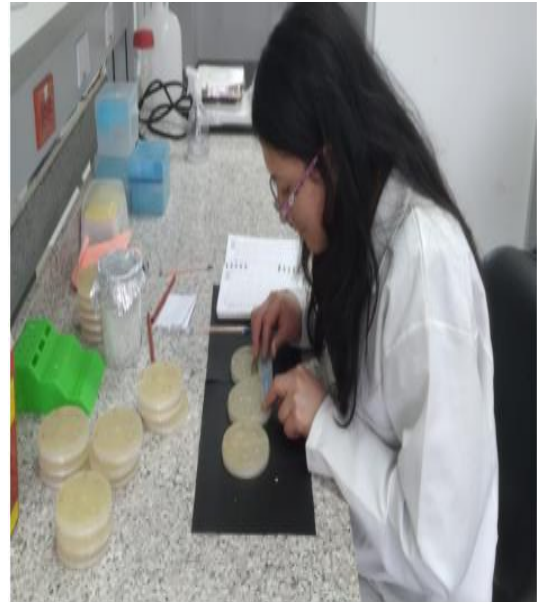
Siembra en infusión cerebro corazón



Estriación en agar Mueller Hinton



Colocación de los discos de antibióticos



Medición de los halos de inhibición

Anexo 4. Tabulación de resultados obtenidos en la segunda fase (CMI)

20 ATCC 29903															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
AZM	A	0,046	1,092	0,592	0,672	0,442	0,674	0,314	0,796	0,678	0,552	1,18	0,855	∞	
	B	0,055	0,974	0,572	0,65	0,423	0,713	0,339	0,768	0,635	0,56	1,165	0,878	∞	
	C	0,061	1,001	0,587	0,717	0,41	0,756	0,383	0,736	0,687	0,548	1,095	0,921	∞	
CV	D	0,064	0,979	0,601	0,599	0,337	0,618	0,426	0,919	0,632	0,628	1,126	1,095	∞	
	E	0,175	0,823	0,612	0,657	0,448	0,694	0,423	0,924	0,694	0,661	1,174	1,135	∞	
	F	0,064	0,937	0,676	0,562	0,35	0,701	0,456	0,933	0,614	0,612	0,95	1,133	∞	
	G													∞	
	H													∞	
														Media del control bacteria	
AZM	A	0,046	1,092	0,546	0,626	0,396	0,628	0,268	0,75	0,632	0,506	1,134	0,809	∞	1,022
	B	0,055	0,974	0,517	0,595	0,368	0,658	0,284	0,713	0,58	0,505	1,11	0,823	∞	
	C	0,061	1,001	0,526	0,656	0,349	0,695	0,322	0,675	0,626	0,487	1,034	0,86	∞	
CV	D	0,064	0,979	0,537	0,535	0,273	0,554	0,362	0,855	0,568	0,564	1,062	1,031	∞	0,913
	E	0,175	0,823	0,437	0,482	0,273	0,519	0,248	0,749	0,519	0,486	0,999	0,96	∞	
	F	0,064	0,937	0,612	0,498	0,286	0,637	0,392	0,869	0,55	0,548	0,886	1,069	∞	
	G													∞	
	H													∞	

Anexo 5. Media de los resultados de la segunda fase

Cepas	control bacteria	# pocillo	Dosis	AMC			0,834
				R1	R2	R3	
18 - ATCC29903	0,834	3	160µg/ml	0,292	0,311	0,359	0,321
		4	80µg/ml	0,34	0,346	0,62	0,435
		5	40µg/ml	0,283	0,322	0,358	0,321
		6	20µg/ml	0,381	0,441	0,474	0,432
		7	10µg/ml	0,683	0,736	0,726	0,715
		8	5µg/ml	0,605	0,648	0,723	0,659
		9	2,5µg/ml	0,728	0,706	0,69	0,708
		10	1,25µg/ml	0,729	0,719	0,792	0,747
		11	0,63µg/ml	0,976	0,952	0,929	0,952
		12	0,32µg/ml	0,916	0,941	0,94	0,932

Anexo 6. Actividades realizadas durante la segunda fase



Tomar el antibiótico con la pipeta



Colocar (LB) con la pipeta multicanal



Colocar la muestra en el lector de microplacas