

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



DETECCIÓN DE GENES *sul* Y *dfr* EN PLÁSMIDOS DE CEPAS CHILENAS DE *Shigella sonnei* MULTIRRESISTENTES AISLADAS EN EL PERÍODO 2008- 2009.

BÁRBARA ANDREA ÁVILA SAAVEDRA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA

Director de Tesis: Prof. MSc. María Teresa Ulloa Flores

2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la tesis de Magíster presentada por la candidata

BÁRBARA ANDREA ÁVILA SAAVEDRA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Microbiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 16 de Octubre de 2015.

Directora de Tesis: Prof. MSc. María Teresa Ulloa Flores

Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Sergio Álvarez

Prof. Dr. Claudio Vásquez

Prof. Dra. Sandra Ampuero

**Prof. Dr. Gonzalo Osorio
Presidente Comisión**

A mi familia, por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por darme la fortaleza de seguir adelante cada vez que pensé en desistir.

A mis padres, por darme la oportunidad de seguir con mis estudios, por apoyarme en todos mis proyectos y ser un pilar fundamental en mi vida. A Carolina, por su ayuda, sus palabras y su cariño incondicional. Sin ustedes, nada de esto sería posible. Los amo.

Gracias a mi tutora, profesora M. Teresa Ulloa, por abrirme una vez más las puertas de su laboratorio, por brindarme su confianza y por ser mi guía en el desarrollo de este trabajo.

Al profesor Germán Hermosilla, por tener la mejor disposición para responder mis preguntas, por la paciencia y el cariño con el que siempre estuvo dispuesto a ayudar.

A mis compañeros de laboratorio, con quienes compartí durante los 7 años de paso por este lugar, especialmente a Gissela Castillo y Lina María Rivas, por su ayuda en el laboratorio y sus palabras de ánimo cada vez que lo necesité.

A mis compañeros del proyecto FONDECYT 1130394, por los gratos momentos compartidos, especialmente a mi amiga Tania, por motivarme a seguir adelante en los momentos más difíciles.

Gracias a todos mis amigos, a todas las personas que me brindaron su apoyo durante este tiempo, nombrar a todos sería un poco extenso y podría cometer algún olvido injusto, pero a todos ustedes, ¡muchas gracias!

“Antes de ser hombres de ciencia, deberíamos ser hombres.”

Albert Einstein.

Tesis financiada por el proyecto FONDECYT 1130394.

ÍNDICE GENERAL.

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
4. MARCO TEÓRICO.....	7
4.1 Generalidades de <i>Shigella</i> spp.....	7
4.2 Cuadro clínico y patogénesis.....	7
4.3 Epidemiología.....	8
4.4 Tratamiento.....	10
4.5 Resistencia de <i>Shigella</i> spp. a antimicrobianos.....	10
4.6 Trimetoprim– sulfametoxazol.....	13
4.7 Resistencia de <i>S. sonnei</i> a SXT en Chile.....	16
5. HIPÓTESIS.....	19
6. OBJETIVOS.....	19
6.1 Objetivo general.....	19
6.2 Objetivos específicos.....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1 Cepas.....	20
7.2 Identificación de genes que confieren resistencia a sulfametoxazol (<i>sul</i>) y trimetoprim (<i>dfr</i>) en cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas durante el período 2004- 2007 y 2008- 2009 en Chile.....	22
7.2.1 Extracción de DNA.....	22
7.2.2 Identificación de alelos de resistencia a sulfametoxazol: <i>sul1</i> , <i>sul2</i> y <i>sul3</i>	22
7.2.2.1 Partidores para identificación de alelos <i>sul</i>	22

7.2.2.2 PCR para la identificación de alelos <i>sul</i>	23
7.2.2.3 Análisis de los productos de PCR de alelos <i>sul</i>	24
7.2.2.4 Purificación de los productos de PCR de alelos <i>sul</i>	24
7.2.2.5 Secuenciación de los productos de PCR de alelos <i>sul</i>	24
7.2.2.6 Análisis de las secuencias de alelos <i>sul</i>	24
7.2.3 Identificación de alelos de resistencia a trimetoprim (<i>dfr</i>).....	25
7.2.3.1 Partidores para identificación de alelos <i>dfr</i>	25
7.2.3.2 PCR para identificación de alelos <i>dfr</i>	26
7.2.3.3 Análisis de los productos de PCR de alelos <i>dfr</i>	26
7.2.3.4 Purificación de los productos de PCR de alelos <i>dfr</i>	26
7.2.3.5 Secuenciación de los productos de PCR de alelos <i>dfr</i>	26
7.2.3.6 Análisis de las secuencias de alelos <i>dfr</i>	27
7.3 Detección de genes <i>sul</i> y/o <i>dfr</i> que confieren resistencia a sulfametoxazol y trimetoprim respectivamente, en el DNA plasmidial de cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas en el período 2008-2009 en Chile.....	27
7.3.1 Aislamiento del DNA plasmidial de cepas de <i>S. sonnei</i>	27
7.3.2 Detección de alelos <i>sul2</i> y <i>dfrA14</i> en el DNA plasmidial de las cepas en estudio.....	28
7.3.2.1 Partidores para detección de <i>sul2</i> y <i>dfrA14</i> en DNA plasmidial de <i>S. sonnei</i>	28
7.3.2.2 PCR para detección de <i>sul2</i> y <i>dfrA14</i> en DNA plasmidial de <i>S. sonnei</i>	29
7.3.2.3 Análisis de los productos de PCR de alelos <i>sul2</i> y <i>dfrA14</i>	29
7.3.3 Detección de un plásmido de resistencia a SXT de bajo tamaño molecular, en cepas de <i>S. sonnei</i> , período 2008- 2009, mediante PCR.....	29
7.3.3.1 Partidores para detección de plásmido de resistencia a SXT.....	29
7.3.3.2 PCR para la detección de plásmido de resistencia a SXT.....	30

7.3.3.3 Análisis de los productos de PCR de plásmido de resistencia a SXT.....	30
7.4 Asociación y organización de los genes <i>sul</i> y <i>dfr</i> al interior de un plásmido en particular (3,9- 4,8 MDa), en cepas de <i>S. sonnei</i> (2008- 2009).....	31
7.4.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5 α con plásmidos de 3,9 y 4,8 MDa.....	31
7.4.1.1 Extracción de plásmidos desde geles de agarosa.....	31
7.4.1.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	32
7.4.1.3 Selección de colonias transformantes.....	33
7.4.1.4 Análisis de <i>Escherichia coli</i> DH5 α transformantes.....	33
7.4.1.4.1 Detección de genes de resistencia, asociación <i>dfrA14</i> - plásmido e inserción de <i>dfrA14</i> en <i>strA</i>	33
7.4.1.4.2 Expresión del fenotipo de resistencia de las transformantes.....	34
7.4.2 Caracterización del plásmido en estudio.....	35
7.4.2.1 Comparación del perfil plasmidial de cepas de <i>S. sonnei</i> parentales (período 2008-2009) con perfil plasmidial de cepas transformantes.....	35
7.4.2.2 Análisis de RFLP con la enzima <i>SspI</i>	35
7.4.2.3 Secuenciación del <i>locus</i> de resistencia del plásmido en estudio.....	36
7.5 Determinación de la capacidad de transferencia del plásmido que contiene los genes <i>sul</i> y <i>dfr</i> desde cepas de <i>S. sonnei</i> a una célula receptora por conjugación.....	36
7.5.1 Cepas.....	36
7.5.2 Medios de cultivo	37
7.5.3 Conjugación en medio sólido.....	37
7.5.4 Control de los medios de cultivo y las cepas.....	38
7.5.5 Detección de los genes de resistencia <i>sul</i> y <i>dfr</i> en las transconjugantes por PCR.....	38
8. RESULTADOS.....	39

8.1 Detección de genes que confieren resistencia a sulfametoxazol (<i>sul</i>) y trimetoprim (<i>dfr</i>) en cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas durante el período 2004- 2007 y 2008- 2009 en Chile.....	39
8.1.1 Detección y confirmación de la identidad de alelos de resistencia a sulfametoxazol: <i>sul1</i> , <i>sul2</i> y <i>sul3</i>	39
8.1.2. Detección y confirmación de identidad de alelos de resistencia a trimetoprim (<i>dfr</i>).....	40
8.2 Detección de genes <i>sul</i> y/o <i>dfr</i> que confieren resistencia a sulfametoxazol y trimetoprim en el DNA plasmidial de cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas en el período 2008- 2009 en Chile.....	43
8.2.1 Aislamiento del DNA plasmidial de cepas de <i>S. sonnei</i>	43
8.2.2 Detección de genes <i>sul</i> y <i>dfr</i> en el DNA plasmidial de las cepas en estudio.....	44
8.2.3 Detección de plásmido de resistencia a SXT en el DNA plasmidial de las cepas en estudio.....	44
8.3 Asociación y organización de genes <i>sul</i> y <i>dfr</i> dentro de un plásmido en particular (3,9 y/o 4,8 MDa), en cepas de <i>S. sonnei</i> (2008- 2009).....	45
8.3.1 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con plásmidos de 3,9 y 4,8 MDa.....	45
8.3.2 Análisis de <i>E. coli</i> DH5 α transformantes.....	46
8.3.2.1 Detección de genes de resistencia, asociación <i>dfrA14</i> - plásmido e inserción de <i>dfrA14</i> en <i>strA</i>	46
8.3.2.2 Expresión del fenotipo de resistencia de las transformantes de <i>E. coli</i> DH5 α	48
8.3.3 Caracterización del plásmido en estudio.....	49
8.3.3.1 Comparación del perfil plasmidial de cepas de <i>S. sonnei</i> parentales (período 2008-2009) con perfil plasmidial de cepas transformantes.....	49
8.3.3.2 Análisis de RFLP del plásmido en estudio con la enzima <i>SspI</i>	50
8.3.3.3 Secuenciación del <i>locus</i> de resistencia del plásmido en estudio.....	50
8.4 Determinación de la capacidad de transferencia del plásmido que contiene los genes <i>sul</i> y <i>dfr</i> desde cepas de <i>S. sonnei</i> a una célula receptora por conjugación.....	51
9. DISCUSIÓN.....	53
10. CONCLUSIONES.....	61

11. BIBLIOGRAFÍA.....	62
12. ANEXO.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Evolución de la resistencia en <i>Shigella</i> spp.....	11
Figura 2. Resistencia a antimicrobianos en cepas de <i>S. sonnei</i> , aisladas de tres períodos (1995-1997; 2004-2007; 2008-2009) en la Región Metropolitana	12
Figura 3. Mecanismo de acción y de resistencia a trimetoprim- sulfametoxazol.....	14
Figura 4. Resistencia de cepas chilenas de <i>S. sonnei</i> a SXT 1995- 2013.....	17
Figura 5. Esquema representativo del plásmido en estudio.....	34
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de PCR del alelo <i>sul2</i>	39
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos amplificados para alelos <i>dfr</i> de los grupos IB (<i>dfrA8</i>) y IIA (<i>dfrA5</i> , <i>dfrA14</i> , <i>dfrA25</i> y <i>dfrA27</i>).....	41
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de PCR para el gen 16S rRNA.....	43
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de PCR para el alelo <i>sul2</i> y <i>dfrA14</i>	44
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR para el plásmido de resistencia a SXT.....	45
Figura 11. Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con plásmidos de 3,9 y 4,8 MDa.....	46
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el alelo <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i> y plásmido de resistencia.....	47
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR para la detección de <i>strA::dfrA14</i> y vínculo <i>dfrA14</i> - plásmido.....	48
Figura 14. Antibiograma de transformantes <i>E. coli</i> DH5 α	48
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de extractos plasmidiales de cepas de <i>S. sonnei</i> y <i>E. coli</i> DH5 α transformantes.....	49
Figura 16. Análisis de restricción del DNA plasmidial de las colonias transformantes DH5 α ...	50

Figura 17. Representación esquemática del <i>locus</i> de resistencia del plásmido pABC-3 en cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas en Chile en el período 2008- 2009.....	51
Figura 18. Conjugación de cepas de <i>S. sonnei</i> aisladas en el período 2008- 2009.....	52

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Listado de cepas de <i>S. sonnei</i> utilizadas en este estudio, aisladas durante los períodos 2004- 2007 y 2008- 2009 en Chile.....	21
Tabla 2. Secuencias de los partidores utilizados para la detección de alelos <i>sul</i>	23
Tabla 3. Secuencias de los partidores utilizados para la detección de alelos <i>dfr</i>	25
Tabla 4. Secuencia de los partidores utilizados para la detección del gen 16S rRNA.....	28
Tabla 5. Secuencia de los partidores utilizados para la detección del alelo <i>dfrA14</i>	28
Tabla 6. Secuencia de los partidores para la detección del plásmido de resistencia a SXT.....	30
Tabla 7. Secuencia de los partidores utilizados para la detección <i>dfrA14</i> - plásmido e inserción del <i>cassette dfrA14</i> en el gen <i>strA</i>	33

1. RESUMEN.

La shigelosis es una infección entérica aguda causada por serogrupos del género *Shigella*. El tratamiento antimicrobiano para la infección por *Shigella* spp. puede acortar la duración de los síntomas clínicos y reducir la propagación de la bacteria. Trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) es uno de los compuestos antimicrobianos de primera línea utilizado en el tratamiento de la shigelosis. Sin embargo, la resistencia a SXT ha aumentado significativamente en cepas de *S. sonnei* aisladas en Chile, desde un 50% en 1995 hasta un 100% en el 2009. Uno de los mecanismos de resistencia más importantes es la presencia de genes *sul* y *dfr*, los que codifican variantes enzimáticas de la dihidropteroato sintasa (DHPS) y dihidrofolato reductasa (DHFR), respectivamente. A la fecha se han descrito 3 alelos del gen *sul* y 33 alelos del gen *dfr*. Estos genes de resistencia pueden encontrarse en plásmidos y varían entre las cepas. En Chile, en el período estival 2008- 2009 se comunicó el surgimiento y diseminación de una cepa de *S. sonnei* resistente a varios antimicrobianos (ampicilina, estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina y SXT). En estas cepas los genes de resistencia *sul* y *dfr* no han sido estudiados aunque su perfil plasmidial reveló la presencia de 2 plásmidos de 3,9 y 4,8 MDa, cuyos tamaños coinciden con algunos plásmidos que contienen genes *sul* y *dfr* en otras especies y géneros bacterianos. En consecuencia, los objetivos de esta Tesis fueron: 1) detectar la presencia de los genes de resistencia a SXT (*sul* y *dfr*) en cepas de *S. sonnei* aisladas durante el período 2008- 2009 en Chile; 2) determinar la presencia de los genes de resistencia a SXT (*sul* y *dfr*) en el DNA plasmidial de estas cepas; 3) establecer la presencia y organización de estos genes en un plásmido de bajo tamaño molecular (3,9 o 4,8 MDa); 4) evaluar la capacidad de transferencia de este plásmido de resistencia.

Para ello, se estudiaron los genes *sul* y *dfr* (3 y 17 alelos, respectivamente) por PCR, tanto en el DNA total como en el DNA plasmidial. Posteriormente, se comprobó que cepas de *E. coli* DH5 α competentes se transformaron con el plásmido de 3,9 MDa y no con el de 4,8 MDa. El plásmido transformado fue denominado pABC-3 y se caracterizó por PCR *tiling*, RFLP y secuenciación. Finalmente, por conjugación, se evaluó la capacidad de pABC-3 de ser transferido a otra bacteria. Resultados: todas las cepas de *S. sonnei* aisladas el 2008-2009 poseen los alelos de resistencia *sul2* y *dfrA14*. Ambos genes están codificados en un plásmido probablemente no conjugativo, pABC-3. Estos resultados, en su conjunto, sugieren que la resistencia a SXT en cepas de *S. sonnei* aisladas durante el brote ocurrido en los años 2008-2009 está mediada por los alelos *sul2* y *dfrA14* codificados en un plásmido de 3,9 MDa probablemente no conjugativo que se denominó pABC-3. Este plásmido no ha sido descrito en *Shigella* spp.

2. ABSTRACT.

Shigellosis is an acute intestinal infection caused by serogroups of the genus *Shigella*. Antimicrobial treatment for *Shigella* infection may shorten the duration of clinical symptoms and reduces the spread of the bacteria. Trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) is one of the first-line antimicrobials used for the treatment of shigellosis. However, resistance to TMP-SMX has increased significantly among *Shigella sonnei* strains isolated in Chile from 50% in 1995 to 100% in 2009. An important resistance mechanism to TMP-SMX involves the *sul* and *dfr* genes, encoding dihydropteroate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR) insensitive enzymes, respectively. To date, 3 *sul* gene alleles and 33 *dfr* gene alleles have been described. These TMP-SMX resistance genes can be coded in plasmids and vary among strains. In Chile, the emergence and spread of several multidrug-resistant strains of *S. sonnei* (resistant to ampicillin, streptomycin, chloramphenicol, tetracycline and SXT) was reported in summer period 2008- 2009. In these strains, *sul* and *dfr* resistance genes have not been studied. Their plasmid profiles showed the presence of two plasmids of 3, 9 and 4, 8 MDa whose sizes are similar to plasmids coding *sul* and *dfr* genes that have been described in other bacterial species and genera. As a consequence, the aims of this thesis were: 1) to detect TMP-SMX resistance genes (*sul* and *dfr*) in *S. sonnei* strains isolated during the period 2008- 2009 in Chile; 2) to determine TMP-SMX resistance genes (*sul* and *dfr*) in plasmidial DNA of these strains; 3) to establish the presence and organization of these genes into a plasmid of low molecular size (3,9 or 4,8 MDa); 4) to evaluate the ability of these plasmids to transfer themselves. For this, *sul* and *dfr* genes (3 and 17 alleles, respectively) were searched by PCR, both in total DNA and plasmid DNA. Then, competent *E. coli* DH5a cells were transformed

chemically with the plasmid of 3,9 MDa. It was not possible to transform the *E. coli* DH5a with the plasmid of 4, 8 MDa. The transformed plasmid was named pABC-3 and it was characterized by PCR tiling, RFLP and sequencing. Finally, it was assessed by conjugation experiments the ability of the pABC-3 to transfer to another bacteria. Results: all of the strains of *S. sonnei* isolated in 2008- 2009 have the *sul2* and the *dfrA14* alleles. Both genes are coded in the probably non-conjugative plasmid pABC-3.

Taken together, these results suggest that resistance to TMP-SMX of *S. sonnei* strains isolated during the 2008- 2009 Chilean shigellosis outbreak, is mediated by *sul2* and *dfrA14* alleles that are coded in the probably non-conjugative plasmid pABC-3 (3,9 MDa). To our knowledge, plasmid pABC-3 has not been reported previously in *Shigella* spp.

3. INTRODUCCIÓN.

La shigelosis es una infección entérica aguda, considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema de salud pública debido a su alta morbilidad y mortalidad. Se asocia a 164,7 millones de episodios de diarrea y a 600.000 muertes anuales, afectando principalmente a niños de 1 a 4 años^{1,2,3}. Tanto en los países desarrollados, como en los países en desarrollo, *Shigella sonnei* y *flexneri* son las especies aisladas con mayor frecuencia⁴ y Chile no es la excepción^{4,5}.

Las manifestaciones clínicas de esta infección pueden variar desde una diarrea acuosa leve hasta una diarrea grave disintérica, llegando incluso a la muerte del individuo afectado².

Para su tratamiento, se utilizan diversos antimicrobianos ya que disminuyen la gravedad y duración del cuadro clínico y además, acortan el período de excreción del patógeno, luego que los síntomas desaparecen⁴. Sin embargo, su efectividad se ha visto disminuida debido a la emergencia de cepas de *Shigella* resistentes a antimicrobianos^{1,3}. Diversos estudios realizados en nuestro país muestran esta tendencia, observándose elevados porcentajes de resistencia y multirresistencia a diversos antimicrobianos en las cepas de *S. sonnei*, entre los que se encuentra el trimetoprim- sulfametoxazol (SXT)⁴.

La resistencia a SXT se debe principalmente a la presencia de genes *sul* y *dfr*, los cuales codifican para variantes de la dihidropteroato sintasa (DHPS) y dihidrofolato reductasa (DHFR), correspondientes al sitio blanco del SXT, que inhibe a estas enzimas afectando la vía metabólica implicada en la síntesis de ácido fólico en la bacteria⁶.

Actualmente, en Chile, existen pocos estudios sobre los determinantes genéticos involucrados en la resistencia a SXT. Uno de ellos, realizado por Toro *et al.*⁷ (que estudió

solo genes de resistencia a trimetoprim) mostró la presencia del alelo *dfrA8* (ex *dhfrIIIc*) asociado a un plásmido conjugativo de gran tamaño (>80 kpb) en cepas de *S. sonnei* circulantes entre los años 1995- 1997.

La literatura internacional muestra que, tanto los genes *sul* y *dfr* se pueden encontrar en elementos genéticos móviles, como plásmidos e integrones y principalmente en plásmidos de bajo tamaño molecular ^{8,9}.

Estos antecedentes, sumado al notable aumento de la resistencia a este compuesto antimicrobiano en cepas chilenas de *S. sonnei*, 50% a 100%, desde 1995 al 2009 ⁴, han generado el interés por conocer cuáles son los determinantes genéticos que median esta resistencia.

El aporte de conocimiento respecto a los mecanismos moleculares implicados en la resistencia de *S. sonnei* a SXT en nuestra realidad local permitirá manejar mejor las alternativas de tratamiento en pacientes con shigelosis y considerar estos mecanismos para las medidas epidemiológicas.

4. MARCO TEÓRICO.

4.1 Generalidades de *Shigella* spp.

Shigella spp. es un bacilo Gram negativo inmóvil, no esporulado, oxidasa negativo, no fermentador de lactosa y anaerobio facultativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. El primer caso de aislamiento se realizó en 1896 por Kiyoshi Shiga ^{1,2}.

Shigella spp. es un patógeno intracelular cuyo principal hospedero es el hombre. Análisis evolutivos han demostrado que esta bacteria se encuentra estrechamente relacionada a *Escherichia coli*. Sin embargo, dada su relevancia clínica se ha mantenido como un género distinto, definido básicamente por sus fenotipos bioquímicos y serológicos ².

Existen 4 serogrupos de *Shigella*: *S. dysenteriae* (Serogrupo A), *S. flexneri* (Serogrupo B), *S. boydii* (Serogrupo C) y *S. sonnei* (Serogrupo D). Cada serogrupo posee diferentes serotipos, basados en el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la envoltura celular de la bacteria. Actualmente se han descrito 15 serotipos de *S. dysenteriae*, 14 de *S. flexneri*, 20 de *S. boydii* y 1 de *S. sonnei* ¹⁰.

4.2 Cuadro clínico y patogénesis.

Shigella spp. es responsable de producir una infección entérica aguda conocida como shigelosis o disentería bacilar, la que presenta un período de incubación de 1 a 4 días. Las manifestaciones clínicas más comunes de este cuadro infeccioso son diarrea (que puede ser disintérica), dolor abdominal, fiebre y tenesmo. En casos más graves se pueden producir perforaciones intestinales, septicemia y megacolon tóxico, que pueden llevar a la muerte del paciente. La gravedad del cuadro clínico depende de factores como edad del paciente, estado

nutricional, dosis infectante y serotipo. La transmisión ocurre vía fecal-oral a partir de un individuo infectado o por ingestión de agua y/o alimentos contaminados y se ve facilitada por la baja dosis infectiva de este microorganismo (10 -100 bacterias) ¹.

Shigella spp. ingresa al hospedero a través del tracto gastrointestinal, resiste el pH ácido del estómago y pasa al intestino ¹¹. En este lugar, induce su endocitosis por las células M y a continuación, es fagocitada por los macrófagos residentes. Una vez dentro del macrófago, *Shigella* spp. escapa desde el fagosoma hacia el citoplasma donde induce la muerte celular por piroptosis ². Posteriormente, la bacteria libre puede entrar a los enterocitos cercanos a través de la superficie basolateral. Al interior de la célula, *Shigella* spp. escapa de la vacuola y migra al citoplasma, donde prolifera y disemina hacia la célula vecina vía inducción de la polimerización de actina en uno de sus polos, iniciando así un nuevo ciclo de replicación. Este proceso genera una fuerte respuesta inflamatoria que atrae polimorfonucleares (PMN) hacia los tejidos infectados, lo que resulta en la desestabilización del epitelio intestinal produciendo la característica diarrea sanguinolenta con deposiciones mucosas ^{10, 12, 13, 14}.

4.3 Epidemiología.

La shigelosis se considera una infección endémica de países en vías de desarrollo y los brotes ocurren principalmente en primavera y verano. La OMS reconoce esta infección como un importante problema de salud pública debido a los 164,7 millones de episodios de diarrea y a las 600.000 muertes ocurridas anualmente asociadas a ella ³.

En los países en vías de desarrollo es común encontrar *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. dysenteriae*, en cambio en los países desarrollados, *S. sonnei* es la especie más prevalente ¹⁵.

Según un informe emitido por *Foodborne Diseases Active Surveillance Network*, la red de vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) de EEUU (2014), *Shigella* se encuentra entre los 3 agentes etiológicos bacterianos aislados con mayor frecuencia ¹⁶.

En nuestro país, específicamente en la Región Metropolitana, un estudio realizado por Alerte *et al.* mostró que de los agentes etiológicos involucrados en los brotes de ETA entre los años 2005 y 2010, el grupo clasificado como *Shigella* spp. y *S. sonnei* ocupan el segundo y tercer lugar (20,4% y 17,7%, respectivamente), siendo solo superado por *Salmonella* spp. ¹⁷.

El Laboratorio Nacional de Referencia de Agentes ETAs del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), informó en el boletín de vigilancia de *Shigella* spp. correspondiente al período 2010- 2012, que *S. sonnei* fue la especie identificada con mayor frecuencia (58%), seguida de *S. flexneri* 2a (21%). Además, *S. sonnei* aumentó un 34% durante el primer trimestre del año 2012, respecto de igual período del año 2011 y un 68% en comparación al año 2010 ⁵. Por otro lado, el boletín epidemiológico emitido por esta institución correspondiente al período 2010-2014, evidencia que *S. sonnei* sigue siendo la especie más frecuente aislada en Chile, con un 57,9% del total de cepas confirmadas como *Shigella* spp. durante este período ¹⁸.

Los grupos de edad que concentran el mayor número de infecciones por *Shigella* spp. corresponden a niños entre 5 a 9 años (21,4%), seguido por el grupo de 0 a 4 años (19,3%) ¹⁹.

¹⁸.

En los últimos años, *S. sonnei* se ha convertido en un importante problema de salud pública, debido a la limitación en la utilización de antimicrobianos de uso habitual para su tratamiento por la aparición y creciente resistencia a antimicrobianos en todo el mundo ²⁰⁻²⁵.

4.4 Tratamiento:

La shigelosis es una de las pocas infecciones entéricas en las que el tratamiento antibiótico es recomendado, ya que se ha comprobado que otorga beneficios: disminuye los síntomas, evita las complicaciones y acorta el período de excreción del patógeno, previniendo así la transmisión de la enfermedad ^{1, 26}. Históricamente, en la práctica clínica, los antimicrobianos comúnmente utilizados para el tratamiento de esta infección han sido ampicilina, trimetoprim- sulfametoxazol, cloranfenicol y ciprofloxacino. Las cefalosporinas se reservan para casos de shigelosis extra intestinal ²⁷.

Actualmente, la selección del antibiótico para el tratamiento de esta infección se ha transformado en un problema complicado para los clínicos debido al notable aumento de resistencia antimicrobiana, motivo por el cual, frecuentemente, se utiliza ciprofloxacino ²⁸.

4.5 Resistencia de *Shigella* spp. a antimicrobianos:

A pesar de las distintas opciones de antimicrobianos disponibles, el tratamiento de esta infección se ha complicado en las últimas décadas, debido al incremento de cepas resistentes a los antimicrobianos que antes constituían el tratamiento de primera línea.

Luego de desarrollar resistencia a sulfonamidas, este patógeno desarrolló resistencia a tetraciclina y cloranfenicol, por lo que el tratamiento de elección se convirtió en ampicilina. Sin embargo, a principios de 1980, aparecieron cepas resistentes a ampicilina, frente a lo cual, se comenzó a utilizar trimetoprim- sulfametoxazol ^{29, 30, 31} (Figura 1). Esta tendencia de aumento de resistencia a antimicrobianos se ha observado en todo el mundo ^{23, 32, 33, 34}. La gran preocupación a nivel mundial es que las cepas de *Shigella* spp. no solo presentan resistencia a

los antibióticos de primera línea (como ampicilina y trimetoprim- sulfametoxazol), sino también a los antibióticos de más amplio espectro, como las quinolonas ³⁵.

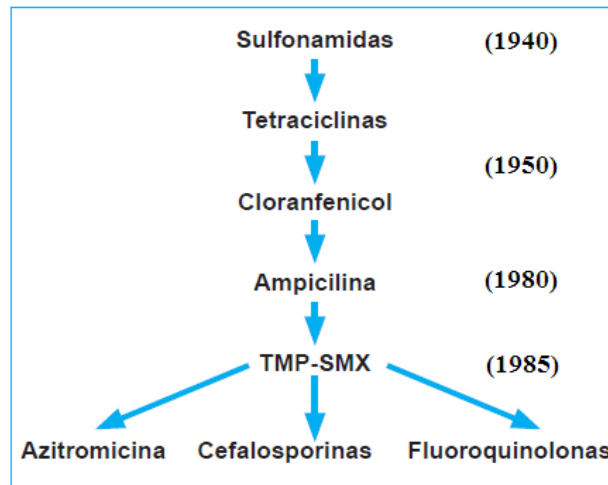


Figura 1. Evolución de la resistencia en *Shigella* spp.³¹.

Este panorama de aumento de la resistencia ha llevado a que se modifiquen periódicamente los antimicrobianos recomendados para tratar esta infección, tendencia que también se ha visto reflejada en nuestro país.

A nivel nacional, un estudio de Delpiano *et al.* ³⁶ que analizó la susceptibilidad *in vitro* de 163 cepas de *Shigella* aisladas en el laboratorio de bacteriología del Hospital Clínico San Borja Arriarán entre 1997 y 1999, evidenció que el 63% correspondía a *S. sonnei* y presentaba un aumento importante en el porcentaje de resistencia a antimicrobianos con respecto a años anteriores (1991- 1995) ³⁶. Estudios realizados en años posteriores, siguen dando cuenta de los elevados niveles de resistencia a antimicrobianos y el significativo aumento de cepas multirresistentes ³.

Un trabajo recientemente de Marcoleta *et al.* (2013) ⁴ analizó perfiles de susceptibilidad de cepas de *S. sonnei* recuperadas desde 1995 al 2009 y agrupadas en 3 períodos (I: 1995- 1997; II: 2004- 2007; III: 2008- 2009) en diversos centros de salud de la Región Metropolitana. Los resultados revelaron un aumento considerable de la resistencia a antibióticos y además un aumento de la multirresistencia, llegando a presentar 100% de multirresistencia (≥ 3 antimicrobianos) en las cepas del período 2008- 2009. Por otra parte, este estudio evidenció la sensibilidad que todavía existe frente a quinolonas, siendo el 100% de las cepas sensibles a este antimicrobiano ⁴ (Figura 2).

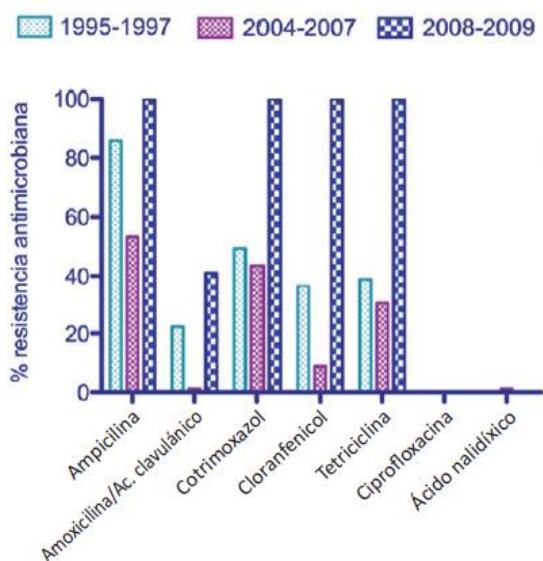


Figura 2. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *S. sonnei*, aisladas de tres períodos (1995-1997; 2004-2007; 2008-2009) en la Región Metropolitana ⁴.

4.6 Trimetoprim– sulfametoxazol:

Hasta hace algunos años y debido a su bajo costo y alta efectividad trimetoprim-sulfametoxazol era uno de los antimicrobianos de primera línea utilizado para el tratamiento de la shigelosis.

Este compuesto es una asociación de agentes antibacterianos sintéticos y ha sido usado durante varias décadas en todo el mundo, tanto en medicina humana como veterinaria ^{37,38}.

Las primeras sulfonamidas fueron usadas en 1932, mientras que el trimetoprim lo hizo por primera vez en 1962, en Inglaterra. A partir de 1968, se introdujo la combinación trimetoprim- sulfametoxazol, la que se ha usado ampliamente debido a su actividad sinérgica contra diferentes microorganismos ³⁹.

Mecanismo de acción:

Las sulfonamidas son drogas que actúan por analogía estructural con el ácido para-aminobenzoico (PABA) e impiden la utilización de este compuesto en la ruta de síntesis de ácido fólico. Inhiben competitivamente a la enzima bacteriana dihidropteroato sintasa (DHPS), impidiendo la formación de ácido dihidropteroico, en la secuencia de reacciones que llevan a la producción de ácido dihidrofólico, que es usado posteriormente como precursor del ácido tetrahidfólico (Figura 3) ³⁸. Por su parte, trimetoprim es el encargado de inhibir competitivamente a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), impidiendo la transformación de ácido dihidrofólico en ácido tetrahidfólico (Figura 3) ³⁸.

Esta secuencia de reacciones en la misma vía enzimática, ha permitido que la combinación de ambas drogas tenga un efecto sinérgico, impidiendo finalmente la formación de ácido tetrahidfólico (Figura 3) ³⁸. De esta manera, se origina un déficit metabólico en la

bacteria. Como el microorganismo no puede internalizarlo por difusión pasiva o por transportadores, la única opción de obtenerlo es vía síntesis a partir de PABA³⁸.



Figura 3. Mecanismo de acción y de resistencia a trimetoprim- sulfametoxazol.

Resistencia:

La resistencia a trimetoprim- sulfametoxazol en *S. sonnei* se debe principalmente a la presencia de genes que codifican para variantes enzimáticas de DHPS y DHFR. En el caso de las sulfonamidas, estos corresponden a los genes *sul*, mientras que para trimetoprim, son los genes *dfr*³⁸.

Se han descrito 3 alelos del gen *sul* que codifican para DHPS altamente resistentes a sulfonamidas: *sul1*, *sul2* y *sul3*. La principal ubicación de estos genes es en elementos genéticos móviles como plásmidos e integrones. El alelo *sul1* se encuentra generalmente ligado a otros genes de resistencia en el extremo 3' de integrones clase 1, mientras que *sul2* es

usualmente encontrado en plásmidos pequeños ^{38, 40}. El alelo *sul3* fue identificado en un estudio de detección de resistencia a sulfonamidas en aislados de *E. coli* enterotoxigénicas provenientes de cerdos y se ubica en un plásmido conjugativo de 54 kbp ⁴¹.

En la literatura también se ha descrito que la resistencia a sulfametoxazol puede generarse por la mutación del gen *folP* (codifica la DHPS bacteriana). Sin embargo, es importante mencionar que este tipo de mutaciones son frecuentemente descritas en otro tipo de microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*, mientras que, en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son muy escasas ³⁸.

Por otro lado, la resistencia a trimetoprim puede deberse a varios mecanismos: auxotrofia para timina/timidina, disminución de la permeabilidad, bombas de eflujo, alteraciones en la DHFR cromosómica y/o la presencia de una DHFR resistente a trimetoprim codificada por un plásmido. De todos los mecanismos mencionados, el último es el más frecuente, y resulta en altos niveles de resistencia a la droga ³⁸.

Se han descrito 33 alelos del gen *dfr*, los que codifican enzimas resistentes a trimetoprim y que además tienen la capacidad de moverse horizontalmente entre distintos microorganismos, ello debido a su ubicación en integrones, plásmidos u otros elementos genéticos de transferencia horizontal ⁶. Por otra parte, y aunque menos frecuente, también se encuentra resistencia cromosomal a trimetoprim debido a mutaciones en los genes *dfr* intrínsecos de la bacteria ³⁸.

La resistencia a ambas drogas en *S. sonnei* se ha diseminado amplia y rápidamente. Esto se debe principalmente al fenómeno de transferencia genética horizontal, por adquisición de elementos genéticos móviles que pueden ser intercambiados promiscuamente entre distintas

especies o géneros bacterianos ⁴². Algunos de estos elementos incluyen secuencias de inserción, transposones, integrones, bacteriófagos, islas de patogenicidad y plásmidos ⁴³.

4.7 Resistencia de *S. sonnei* a SXT en Chile.

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento de la shigelosis se ha complicado en las últimas décadas ^{29, 30, 31}. Los estudios de vigilancia de susceptibilidad *in vitro*, evidencian el aumento de los aislados de *S. sonnei* multirresistentes ⁴.

En este contexto, se destaca el incremento de la resistencia a SXT desde 50% hasta 100% en las cepas aisladas desde 1995 al 2009 (Figura 4). En nuestro país, son pocos los estudios respecto de las bases genéticas que sustentan la resistencia a SXT. Por un lado, no existen reportes de determinantes genéticos de resistencia a sulfonamidas y por otro, existe solo un estudio de genes de resistencia a trimetoprim (Toro *et al.* ⁷, 2005). Este estudio caracterizó molecularmente genes de resistencia en aislados chilenos de *S. sonnei* (1995-1997), en el cual se encontró únicamente la presencia del alelo *dfrA8* (ex *dhfrIIIc*). Este alelo se encuentra en un plásmido conjugativo de gran tamaño (>80 kpb), el que también posee el gen de resistencia a ampicilina *blaTEM* ⁷.

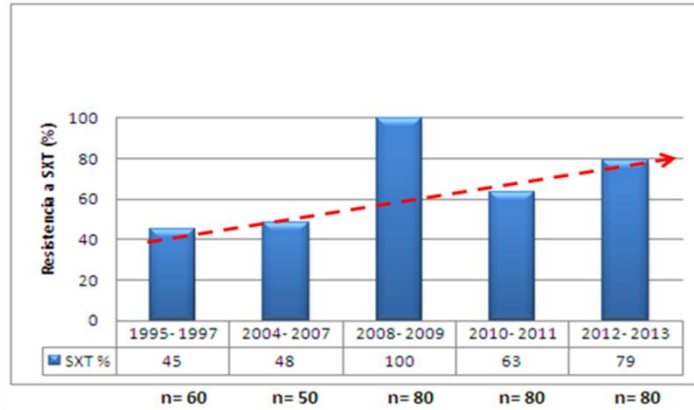


Figura 4. Resistencia de cepas chilenas de *S. sonnei* a SXT 1995- 2013.
Fuente: Proyecto FONDECYT 1130394. Resultados no publicados.

Sin embargo, no se conocen los determinantes genéticos que codifican la resistencia a SXT en cepas de *S. sonnei* aisladas en años posteriores, especialmente en cepas aisladas en el período 2008- 2009. Durante este período se comunicó el surgimiento y diseminación de una cepa de *S. sonnei* multirresistente, que alcanzó un 100% de resistencia a SXT (Figura 4).

Estudios realizados en nuestro laboratorio respecto del perfil plasmidial de 60 cepas de *S. sonnei* aisladas en los períodos 2004- 2007 y 2008- 2009, revelaron la presencia de 2 plásmidos de 3,9 y 4,8 MDa en las cepas del período 2008- 2009 y ausentes en las cepas del período 2004- 2007 (Unidad de Investigación, Bárbara Ávila, 2013). Este hallazgo coincide con datos de la literatura, en los que se han encontrado genes de resistencia *sul* y *dfr* en plásmidos de tamaños moleculares similares.: Ojo *et al.* describió un plásmido de 6,8 kbp que albergaba los alelos *sul2* y *dfrA14*, en cepas de *E. coli* uropatógenas aisladas de humanos en Nigeria ⁴⁴. Otro estudio realizado por Hu *et al.* evidenció la presencia de un plásmido de 7,3 kbp (equivalente a 4,8 MDa) en cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* que contenía el alelo *sul2* y alelos *dfrA12* y *dfrA17*, otorgándole una alta resistencia a SXT ⁸.

Una publicación de Iqbal *et al.* describe la existencia de un plásmido de 4,3 MDa presente en cepas de *S. flexneri* 2a resistentes a sulfametoxazol y ausente en cepas sensibles a este antibiótico. Experimentos realizados por estos investigadores demostraron que al curar este plásmido de las cepas, se perdía la resistencia a sulfametoxazol. Análisis posteriores por PCR mostraron la presencia del alelo *sul2* en este plásmido responsable de la resistencia al sulfametoxazol ⁹.

Considerando el aumento de resistencia a SXT en cepas de *S. sonnei* aisladas en los últimos años en Chile (especialmente en el período 2008 – 2009), el desconocimiento de las bases moleculares que sustentan esta resistencia y dado que existe evidencia en la literatura de genes *sul* y *dfr* presentes en plásmidos de tamaños moleculares similares a los encontrados en un grupo de nuestras cepas, se plantea la siguiente hipótesis:

5. HIPÓTESIS.

La resistencia a trimetoprim- sulfametoxazol en cepas chilenas de *S. sonnei* aisladas en el período 2008- 2009, se debe a la presencia de genes *sul* y/o *dfr* contenidos en plásmidos de bajo tamaño molecular (3,9- 4,8 MDa).

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo general

Determinar la presencia de genes de resistencia a sulfametoxazol (*sul*) y trimetoprim (*dfr*) en plásmidos de 3,9- 4,8 MDa de cepas de *S. sonnei* resistentes a trimetoprim- sulfametoxazol aisladas en el período 2008 -2009 en Chile.

6.2 Objetivos específicos

6.2.1 Identificar los genes que confieren resistencia a sulfametoxazol (*sul*) y trimetoprim (*dfr*) en cepas de *S. sonnei* aisladas durante los períodos 2004- 2007 y 2008- 2009 en Chile.

6.2.2 Detectar genes *sul* y/o *dfr* que confieren resistencia a trimetoprim- sulfametoxazol en el DNA plasmidial de cepas de *S. sonnei* aisladas en el período 2008- 2009 en Chile.

6.2.3 Establecer la asociación y la organización de los genes *sul* y *dfr* al interior de un plásmido en particular (3,9- 4,8 MDa), en cepas de *S. sonnei* (2008- 2009).

6.2.4 Determinar la capacidad de transferencia del plásmido que contiene los genes *sul* y *dfr* desde cepas de *S. sonnei* por conjugación a una célula receptora.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1.- Cepas.

Se estudiaron 28 cepas de *S. sonnei* aisladas de pacientes atendidos en centros asistenciales del norte y centro del país, 14 de ellas fueron aisladas entre los años 2004- 2007 y las otras 14 cepas aisladas entre los años 2008- 2009 (Tabla 1). Estas cepas están siendo estudiadas en el proyecto FONDECYT 1130394, “Population dynamics of *Shigella sonnei* strains in Chile: Emerging of a new pathogen?”. Su uso para esta investigación cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo 1).

La determinación de género se realizó utilizando el sistema automatizado Vitek2 (BioMérieux®). La especie se confirmó por reacción de aglutinación en lámina utilizando antiseros comerciales (Probac®). Estas cepas forman parte de una colección mantenida en el Laboratorio de Patógenos Entéricos y Resistencia Antimicrobiana del Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Para este estudio se utilizaron como criterios de inclusión las siguientes características: resistencia fenotípica a trimetoprim- sulfametoxazol, determinada por el método de Kirby-Bauer (resultados interpretados según *Clinical & Laboratory Standards Institute* [CLSI] 2013), y perfil plasmidial previamente caracterizado, incluyendo en este estudio, una cepa representante de cada perfil plasmidial (Unidad de Investigación, Bárbara Ávila, 2013).

Tabla 1. Listado de cepas de *S. sonnei* utilizadas en este estudio, aisladas durante los períodos 2004- 2007 y 2008- 2009 en Chile.

Nº cepa	Procedencia	Comuna	Año de aislamiento
b0050	H.C. San Bernardo	San Bernardo	2005
b0061	H.C. San Bernardo	San Bernardo	2005
b0069	H.C San Bernardo	San Bernardo	2005
b0110	H.C. San Bernardo	San Bernardo	2005
b0130	H.C. San Bernardo	San Bernardo	2005
b0200	H. Padre Hurtado	P. Aguirre Cerda	2005
b0515	Consultorio Colina	Colina	2004
b0516	Consultorio Colina	Colina	2004
b0566	Consultorio Colina	Colina	2005
b0569	Consultorio Colina	Colina	2004
b0570	Consultorio Colina	Colina	2004
b0571	Consultorio Colina	Colina	2004
b0582	Consultorio Colina	Colina	2005
b0583	H.C San Bernardo	San Bernardo	2005
c0027	H. Dr. Leonardo Guzmán	Antofagasta	2008
c0121	Clínica Antofagasta	Antofagasta	2008
c0719	H. Dr. Leonardo Guzmán	Antofagasta	2008
c0723	H. Dr. Leonardo Guzmán	Antofagasta	2008
c0736	H. Dr. Leonardo Guzmán	Antofagasta	2008
c8006	Integramédica	Huechuraba	2009
c8034	Integramédica	Cerrillos	2009
c8055	Integramédica	La Florida	2009
c8072	Integramédica	Puente Alto	2009
c8200	Integramédica	Buin	2009
c8236	Integramédica	Puente Alto	2008
c8302	Integramédica	Huechuraba	2009
c8774	Integramédica	Puente Alto	2009
c8848	Integramédica	Santiago	2009

7.2 Identificación de genes que confieren resistencia a sulfametoxazol (*sul*) y trimetoprim (*dfr*) en cepas de *S. sonnei* aisladas durante el período 2004- 2007 y 2008- 2009 en Chile.

La identificación de genes que confieren resistencia a sulfametoxazol y trimetoprim se realizó por PCR en cepas aisladas de ambos períodos, la que contempló las siguientes actividades:

7.2.1 Extracción de DNA.

Para realizar la extracción de DNA, las cepas fueron sembradas en agar Mac Conkey e incubadas a 37 °C por 18- 24 h en atmósfera normal. Posteriormente, se realizó la extracción por el método de lisis por calor ⁴⁵, según el siguiente protocolo: se preparó una suspensión a partir de 2- 3 colonias en 200 µl de agua destilada estéril, calentó a 100 °C por 15 m, colocó la suspensión en hielo por 3 m y se centrifugó a 13.000 rpm por 3 m colectando el sobrenadante que contiene el DNA.

7.2.2 Identificación de alelos de resistencia a sulfametoxazol: *sul1*, *sul2* y *sul3*.

7.2.2.1 Partidores para detección de alelos *sul*.

La secuencia de los partidores utilizados para amplificar los alelos *sul* fue obtenida de la literatura. Las secuencias de cada uno de ellos, así como sus referencias, se señalan en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de los partidores utilizados para la detección de alelos *sul*.

Partidor	Secuencia 5´- 3´	Tamaño del producto (pb)	T _m (°C)	Referencia
Sul1-F	CGGCGTGGGCTACCTGAACG	433	63	Vrints <i>et al.</i> , 2009
Sul1-R	GCCGATCGCGTGAAGTTCCG			
Sul2-F	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	293	58	Vrints <i>et al.</i> , 2009
Sul2-R	GCGTTTGATACCGGCACCCGT			
Sul3-F	GAGCAAGATTTTTGGAATCG	790	51	Perreten y Boerlin, 2003.
Sul3-R	CTAACCTAGGGCTTTGGA			

7.2.2.2 PCR para la identificación de alelos *sul*.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el kit GoTaq® Flexi Polymerase (Promega). A continuación se indican las condiciones y las concentraciones finales en cada tubo: Buffer 5X (1X), MgCl₂ (3 mM), dNTP (2 mM), partidores (0,4 µM), Taq DNA Polimerasa Promega® (1U) y DNA genómico (2 ng/µl), en un volumen final de 25 µl. Los ciclos, las temperaturas y los tiempos de la reacción fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 m, 30 ciclos de 94 °C por 1 m, alineamiento por 1 m según la *T_m* de los partidores (Tabla 2) y extensión a 72 °C por 1 m. Se concluyó con 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 10 m.

Se empleó como control positivo las siguientes cepas: *E. coli* 1605 (otorgada gentilmente por el laboratorio de microbiología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile), en la que se detectó el alelo *sul1* (confirmado por secuenciación); *S. sonnei* c8006, en la que se detectó el alelo *sul2* (confirmado por secuenciación). Como control positivo del alelo *sul3* se utilizó la cepa *E. coli* r10044, cedida gentilmente por el Dr. Patrick Boerlin (Departamento de Patobiología, Universidad de Guelph, Canadá).

7.2.2.3 Análisis de los productos de PCR de alelos *sul*.

La visualización de los productos de amplificación se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X, utilizando como estándar de tamaño molecular el marcador de 100 pb (*New England Biolabs*®). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml) y fotografiados bajo luz ultravioleta, utilizando el programa Kodak (Kodak, Sistema EDAS 290, Software Kodak 1D3-6).

7.2.2.4 Purificación de los productos de PCR de alelos *sul*.

Los productos amplificados por PCR con la enzima de alta fidelidad High Fidelity PCR Enzyme Mix Fermentas® fueron purificados usando E.Z.N.A® Cycle-Pure Kit OMEGA bio-tek, según instrucciones de manufactura.

7.2.2.5 Secuenciación de los productos de PCR de alelos *sul*.

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en *Macrogen Sequencing System* - Corea por el método de Sanger, utilizando los partidores *forward* y *reverse* correspondientes.

7.2.2.6 Análisis de las secuencias de alelos *sul*.

El análisis de las secuencias se realizó mediante los programas Geneious® y ClustalW2 (*online*).

7.2.3 Identificación de alelos de resistencia a trimetoprim (*dfr*).

7.2.3.1 Partidores para identificación de alelos *dfr*.

Dado que a la fecha se han descrito 33 alelos *dfr*, su identificación se realizó por el protocolo de Seputiéné *et al.* ⁶ modificado, que consiste en realizar PCR con partidores degenerados, diseñados en base a la similitud genética de las secuencias de los alelos *dfr* depositadas en GenBank. De los 16 grupos de alelos descritos por Seputiéné *et al.*, se estudió los 5 primeros grupos, dado que éstos contienen los alelos *dfr* más frecuentemente descritos en *Shigella* spp., tanto a nivel nacional como internacional. Estos grupos fueron denominados “IA”, “IB”, “IC”, “IIA” y “IIB”, y contienen 17 alelos *dfr*. Las secuencias de los partidores utilizados y los tamaños del producto de PCR esperado para estos 5 grupos se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de los partidores utilizados para la identificación de alelos *dfr* (Seputiéné *et al.*, 2010).

Grupo (Partidor)	Secuencia 5- 3'	Tamaño del producto (pb)	Alelos
“IA”	GTGAAACTATCACTAATGG ACCCTTTTGCCAGATTTG	471	<i>dfrA1, dfrA15, dfrA15b, dfrA16, dfrA16b, dfrA28</i>
“IB”	TTGGGAAGGACAACGCACTT ACCATTTTCGGCCAGATCAAC	382	<i>dfrA8</i>
“IC”	GGTGAGCARAAGATYTTTTCGC TGGGAAGAAGGCGTCACCCCTC	309	<i>dfrA12, dfrA13, dfrA21, dfrA22</i>
“IIA”	GCBAAAGGDGARCAGCT TTMCCAYATTTGATAGC	394	<i>dfrA5, dfrA14, dfrA25, dfrA27</i>
“IIB”	AAAATTTTCATTGATTTCTGCA TTAGCCTTTTTTCCAAATCT	471	<i>dfrA7, dfrA17</i>

7.2.3.2 PCR para identificación de alelos *dfr*.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el kit GoTaq® Flexi Polymerase (Promega). A continuación se indican las condiciones y las concentraciones finales en cada tubo: Buffer 5X (1X), MgCl₂ (3 mM), dNTP (2 mM), partidores (0,4 μM), Taq DNA Polimerasa Promega® (1 U) y DNA genómico (2 ng/μL), en un volumen final de 25 μL. Los ciclos, las temperaturas y los tiempos de la reacción fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 m, 30 ciclos de 94 °C por 1 m, alineamiento por 1 m según *T_m* de los partidores (Tabla 3) y extensión a 72 °C por 1 m. Se concluyó con 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 10 m.

Se emplearon como controles de los alelos *dfr* las siguientes cepas: *S. sonnei* a0144: *dfrA1* y *dfrA8* (Toro *et al.*, 2005); *E. coli* 1610 y *E. coli* 1636: *dfrA12* y *dfrA17*.

7.2.3.3 Análisis de los productos de PCR de alelos *dfr*.

La visualización de los productos de amplificación se realizó bajo las mismas condiciones utilizadas en el punto 7.2.2.3.

7.2.3.4 Purificación de los productos de PCR de alelos *dfr*.

Los productos amplificados por PCR fueron purificados bajo las mismas condiciones utilizadas en el punto 7.2.2.4.

7.2.3.5 Secuenciación de los productos de PCR de alelos *dfr*.

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados bajo las mismas condiciones utilizadas en el punto 7.2.2.5.

7.2.3.6 Análisis de las secuencias de alelos *dfr*.

El análisis de las secuencias se realizó bajo las mismas condiciones utilizadas en el punto 7.2.2.6.

7.3 Detección de genes *sul* y/o *dfr* que confieren resistencia a sulfametoxazol y trimetoprim respectivamente, en el DNA plasmidial de cepas de *S. sonnei* aisladas en el período 2008- 2009 en Chile.

La detección de genes que confieren resistencia a sulfametoxazol y trimetoprim en el DNA plasmidial de cepas aisladas en el período 2008- 2009 en Chile, contempló las siguientes actividades:

7.3.1 Aislamiento del DNA plasmidial de cepas de *S. sonnei*.

Para la extracción del DNA plasmidial se utilizó el kit comercial E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini kit II OMEGA bio-tek, kit que extrae de manera óptima los plásmidos <10 kpb (para el caso de estas cepas, corresponde a 5- 6 plásmidos), según las instrucciones de manufactura. El DNA plasmidial obtenido fue diluido 1:512 y tratado *overnight* con Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase (enzima que hidroliza el DNA cromosomal contaminante). Posteriormente, la enzima fue inactivada a 70 °C por 30 m. Para corroborar la pureza del DNA plasmidial obtenido, se realizó PCR del 16S rRNA, cuyos partidores se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de los partidores utilizados para la detección del gen 16S rRNA.

Partidor	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del producto (pb)	Tm (°C)	Referencia
16S1-F	CCAAGTCTCAAGAGTGAACACG	896 pb	58	Proyecto FONDECYT 1130394
16S1-R	CCTCCAAGTCGACATCGTTT			

7.3.2 Detección de alelos *sul2* y *dfrA14* en el DNA plasmidial de las cepas en estudio*.

* La detección dirigida de alelos *sul2* y *dfrA14* fue decidida a partir de los resultados del objetivo 1.

7.3.2.1 Partidores para detección de *sul2* y *dfrA14* en DNA plasmidial de *S. sonnei*.

Los partidores utilizados para amplificar el alelo *sul2* a partir de DNA plasmidial, fueron los mismos utilizados en el punto 7.2.2.1 (Tabla 2).

Para la detección del alelo *dfrA14*, se diseñó partidores específicos a partir de la secuencia del plásmido de resistencia, obtenida en la Tesis de pregrado (en ejecución) del alumno Alfonso Miranda (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencia de los partidores utilizados para la detección del alelo *dfrA14*.

Partidor	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del producto (pb)	Tm (°C)	Referencia
dfrA14-F	TTAACCCAGGATGAGAACCT	510	55	Miranda A. Proyecto FONDECYT 1130394
dfrA14-R	CGATTGCATAGCTTTGTAA			

7.3.2.2 PCR para detección de *sul2* y *dfrA14* en DNA plasmidial de *S. sonnei*.

La reacción de PCR para la amplificación del alelo *sul2* a partir de DNA plasmidial, se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad en el punto 7.2.2.2.

La reacción de PCR para la amplificación del alelo *dfrA14* a partir de DNA plasmidial se realizó utilizando el kit GoTaq® Flexi Polymerase (Promega). A continuación se indican las condiciones y las concentraciones finales en cada tubo: Buffer 5X (1X), MgCl₂ (3 mM), dNTP (2 mM), partidores (0,4 µM), Taq DNA Polimerasa Promega® (1U) y DNA plasmidial (2 ng/µL), en un volumen final de 25 µL. Los ciclos, las temperaturas y los tiempos de la reacción fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 92 °C por 3 m, 30 ciclos de 92 °C por 1 m, alineamiento por 30 s según la *Tm* de los partidores (Tabla 5) y extensión a 72 °C por 1 m. Se concluyó con 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 10 m.

7.3.2.3 Análisis de los productos de PCR de alelos *sul2* y *dfrA14*.

El análisis de los productos de PCR se realizó según protocolo descrito con anterioridad en el punto 7.2.2.3.

7.3.3 Detección de un plásmido de resistencia a SXT de bajo tamaño molecular, en cepas de *S. sonnei*, período 2008- 2009, mediante PCR.

7.3.3.1 Partidores para detección de plásmido de resistencia a SXT.

Durante el desarrollo de esta Tesis, en una investigación paralela del proyecto FONDECYT 1130394, a partir de la cepa de *S. sonnei* c8225 (también perteneciente al período 2008- 2009), se obtuvo por clonamiento un inserto de tamaño aproximado 6- 7 kpb, el

que fue secuenciado. Esta secuencia resultó ser un plásmido de resistencia, el que contiene los alelos *sul2* y *dfrA14* que otorgan resistencia a SXT (tesis en ejecución, Alfonso Miranda, 2015) y a partir de ella, se diseñó partidores para la detección de este plásmido en el contenido plasmidial de las cepas de *S. sonnei* 2008- 2009, correspondientes a este estudio (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencia de los partidores para la detección del plásmido de resistencia a SXT.

Partidor	Secuencia 5´- 3´	Tamaño del producto (pb)	Tm (°C)	Referencia
pCLON3-F	CACTCCCCTCTTACATTGT	2849	53	Miranda A. Proyecto FONDECYT 1130394
pCLON3-R	GGTTTAACCGTAATCAACAG			

7.3.3.2 PCR para la detección de plásmido de resistencia a SXT.

La reacción de PCR para la detección del plásmido se realizó utilizando el kit GoTaq® Flexi Polymerase (Promega). A continuación se indican las condiciones y las concentraciones finales en cada tubo: Buffer 5X (1X), MgCl₂ (3,5 mM), dNTP (2 mM), partidores (0,4 µM), Taq DNA Polimerasa Promega® (1 U) y DNA plasmidial (3 ng/µL), en un volumen final de 50 µL. Los ciclos, las temperaturas y los tiempos de la reacción fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 1 m, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, alineamiento por 45 s según la *Tm* de los partidores (Tabla 6) y extensión a 72 °C por 1 m. Se concluyó con 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 10 m.

7.3.3.3 Análisis de los productos de PCR de plásmido de resistencia a SXT.

La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, utilizando como estándar de tamaño molecular el

marcador de 1 kpb (*New England Biolabs*®). Los geles fueron teñidos con 1 µg/ml de bromuro de etidio y fotografiados bajo luz ultravioleta, utilizando el programa Kodak (Kodak, Sistema EDAS 290, Software Kodak 1D3-6).

7.4 Asociación y organización de los genes *sul* y *dfr* al interior de un plásmido en particular (3,9- 4,8 MDa), en cepas de *S. sonnei* (2008- 2009).

Para definir cuál de los dos plásmidos de bajo tamaño molecular (3,9 o 4,8 MDa) detectados en las cepas de *S. sonnei* 2008- 2009 es el portador de los alelos *sul2* y *dfrA14*, y determinar la organización de estos alelos en su interior, se realizaron las siguientes actividades:

7.4.1 Transformación de *Escherichia coli* DH5α con plásmidos de 3,9 y 4,8 MDa.

7.4.1.1 Extracción de plásmidos desde geles de agarosa.

Para la extracción de DNA plasmidial a partir de la cepa de *S. sonnei* c8302, se utilizó el kit comercial E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini kit II OMEGA bio-tek, según instrucciones de manufactura. La preparación de plásmidos fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 1% a 60 V, por 1.5 h en buffer TAE 1X. Los plásmidos fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados por luz UV. Se utilizaron como marcadores de tamaño molecular la cepa *E. coli* 39R861 y *ladder* 1 kpb (*New England Biolabs*®). Posteriormente, los plásmidos fueron purificados desde el gel de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN®, según instrucciones de manufactura.

7.4.1.2 Transformación de *Escherichia coli* DH5 α .

Para asociar los alelos *sul2* y *dfrA14* a un plásmido en particular se transformó *E. coli* DH5 α con las bandas de 3,9 y 4,8 MDa. Para realizar esta actividad, se preparó células quimiocompetentes por el método adaptado de Inoue *et al.*⁴⁶ (1990). Este método consiste en: a partir de un cultivo fresco se inoculó un matraz con medio LB, el que fue incubado a 37 °C con agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ ~ 0,3. Una vez obtenida la densidad óptica deseada, se mantuvo el matraz en hielo durante 10 m y se colectó las células por centrifugación a 4 °C, por 10 m a 3.000 rpm. Las células fueron suspendidas suavemente en 40 ml de solución de Inoue fría (PIPES 10 mM; CaCl₂ 15 mM; KCl 250 mM, ajustada a pH 6,7). Después de mantener la suspensión en hielo por 10 m, se centrifugó a 3.000 rpm por 10 m, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se suspendió en 4 ml de solución de Inoue fría. Finalmente, fueron almacenadas a –80 °C⁴⁶.

Para la transformación, se tomó una alícuota de 200 μ l de células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes descongeladas y mantenidas en hielo y se mezcló con 30 μ l de DNA plasmidial (bandas de 3,9 y 4,8 MDa, concentración: 8,4 ng/ μ l). La mezcla se dejó 30 m en hielo. Luego se incubó por 45 s en baño maría a 42 °C y se pasó a hielo por 2 m. Posteriormente, se agregó 900 μ l de caldo SOC (caldo LB, Glucosa 9,9 mM, MgCl₂ 9,9 mM) y se incubó por 1 h a 37 °C con agitación (180 rpm). Finalmente, se plaquearon 200 μ l de la mezcla en placas de medio LB trimetoprim (25 μ g/ml) y se incubaron por un máximo de 18 h a 37 °C.

7.4.1.3 Selección de colonias transformantes.

La selección de las colonias transformadas se realizó en placas de LB trimetoprim (25 µg/ml) incubadas a 37 °C durante 18 h en atmósfera normal.

7.4.1.4 Análisis de *Escherichia coli* DH5α transformantes.

7.4.1.4.1 Detección de genes de resistencia, asociación dfrA14- plásmido e inserción de dfrA14 en strA.

Los genes de resistencia a SXT se detectaron en las colonias transformantes de *E. coli* DH5α por PCR, utilizando los partidores *sul2* (Tabla 2 y Figura 5) y *dfrA14* (Tabla 5 y Figura 5). Para detectar la presencia del plásmido de resistencia en las transformantes, se utilizaron los partidores pCLON-3 (Tabla 6 y Figura 5). Las condiciones para realizar estas reacciones fueron similares a las descritas en los puntos 7.2.2.2, 7.3.2.2 y 7.3.3.2, respectivamente.

Además, con la finalidad de detectar la asociación de *dfrA14* con el plásmido y la inserción del *cassette dfrA14* en el gen *strA*, se realizó PCR *tiling* utilizando las siguientes combinaciones de partidores: *dfrA14-F* - *pdfrA141-R* y *pdfrA142-F-dfrA14-R*, respectivamente (Tabla 7 y Figura 5).

Tabla 7. Secuencia de los partidores utilizados para la detección *dfrA14*- plásmido e inserción del *cassette dfrA14* en el gen *strA*.

Partidor	Secuencia 5´- 3´	Tamaño del producto (pb)	Tm (°C)	Referencia
<i>dfrA14-F</i>	TTAACCCAGGATGAGAACCT	1984 pb	56	Proyecto FONDECYT 1130394
<i>pdfrA141-R</i>	GTAGAAAGCCATGCTCCAGC			
<i>pdfrA142-F</i>	TGACTGGTTGCCTGTCAGA	985 pb		
<i>dfrA14-R</i>	CGATTGCATAGCTTTGTAA			

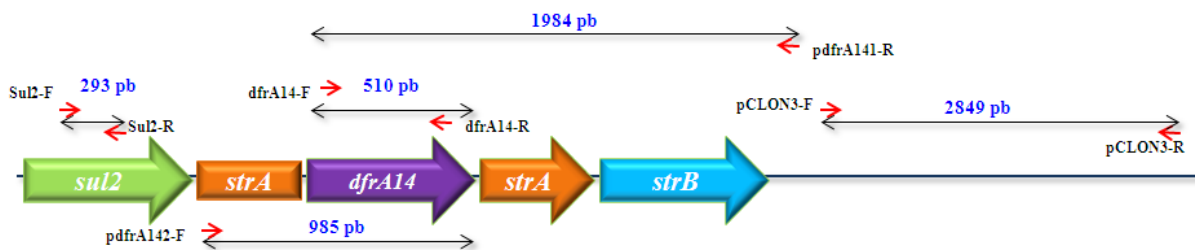


Figura 5. Esquema representativo del plásmido en estudio (esperado). Se indica la posición de los partidores utilizados y el tamaño esperado para cada amplicón. La línea azul representa parte del plásmido distinto al *locus* de resistencia.

La reacción de PCR para la detección de la asociación *dfrA14*- plásmido se realizó utilizando el kit GoTaq® Flexi Polymerase (Promega). A continuación se indican las condiciones y las concentraciones finales en cada tubo: Buffer 5X (1X), MgCl₂ (3 mM), dNTP (2 mM), partidores (0,4 μM), Taq DNA Polimerasa Promega® (1 U) y DNA genómico (2 ng/μL), en un volumen final de 25 μL. Los ciclos, las temperaturas y los tiempos de la reacción fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 m, 30 ciclos de 94 °C por 1 m, alineamiento a 56 °C por 30 s (Tabla 7) y extensión a 72 °C por 1 m. Se concluyó con 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 7 m.

Todas las reacciones anteriormente descritas, fueron realizadas a un *pool* de transformantes (5 grupos). Posteriormente, se eligió una transformante de cada *pool*, para la repetición de las detecciones.

7.4.1.4.2 Expresión del fenotipo de resistencia de las transformantes.

Para evaluar la expresión de la resistencia en *E. coli* DH5α transformante, se realizó un antibiograma por el método de difusión en agar (Kirby- Bauer). Para ello, se preparó un inóculo de la cepa transformante a 0,5 Mc Farland. Luego, este inóculo se sembró en agar

Müller-Hinton y se pusieron discos de SXT (trimetoprim 1,25 µg/sulfametoxazol 23,75 µg), trimetoprim (5 µg) y estreptomicina (10 µg). Se incubó a 37 °C por 18- 24 h en atmósfera normal y se midieron los halos correspondientes de cada disco. Los resultados fueron interpretados según CLSI 2013.

7.4.2 Caracterización del plásmido en estudio.

La caracterización del plásmido en estudio, se realizó mediante 3 actividades:

7.4.2.1 Comparación del perfil plasmidial de cepas de *S. sonnei* parentales (período 2008-2009) con perfil plasmidial de cepas transformantes.

A partir de cepas de *S. sonnei* pertenecientes a este estudio (2008- 2009) y las transformantes obtenidas en el punto anterior, se realizó extracción de DNA plasmidial con el kit comercial E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini kit II OMEGA bio- tek, según instrucciones de manufactura. La preparación de plásmidos fue sometida a electroforesis en gel de agarosa bajo las mismas condiciones descritas en el punto 7.4.1.1.

7.4.2.2 Análisis de RFLP con la enzima *SspI*.

Se realizó un análisis de RFLP con la enzima *SspI* (Fermentas®), según indicaciones del fabricante. Los productos de restricción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (0,8%), utilizando el marcador de tamaño molecular de 1 kpb (*New England Biolabs*®).

7.4.2.3 Secuenciación del *locus* de resistencia del plásmido en estudio.

Finalmente, con el propósito de confirmar la estructura del *locus* de resistencia del plásmido estudiado, éste fue purificado con el kit comercial E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini kit II OMEGA bio-tek, y enviado para su secuenciación a *Macrogen Sequencing System* – Corea, utilizando los partidores *sul2-F*, *dfrA14-R*, *dfrA14-F* y *pdfrA141-R* (Figura 5).

El análisis de las secuencias se realizó con el módulo ContigExpress® utilizando el programa Vector NTI Advance™ 10.3.0, con el que se generó un *contig* a partir de los 2 fragmentos obtenidos en la secuenciación. De esta manera, se obtuvo una secuencia única de consenso. El posterior alineamiento de las secuencias se hizo con el programa ClustalW2 (*online*).

7.5 Determinación de la capacidad de transferencia del plásmido que contiene los genes *sul* y *dfr* desde cepas de *S. sonnei* a una célula receptora por conjugación.

7.5.1 Cepas

Para comprobar la capacidad de transferencia genética horizontal de los alelos *sul2* y *dfrA14* mediante el plásmido de resistencia, confirmado en la actividad 7.4, se eligieron como donantes dos cepas de *S. sonnei* pertenecientes al brote 2008- 2009, una aislada en Antofagasta (c0027) y la otra en la Región Metropolitana (c8006). Ambas cepas son resistentes a trimetoprim- sulfametoxazol y sensibles a ácido nalidíxico. Como cepa receptora del plásmido se eligió *E. coli* DH5 α . Esta cepa se encuentra libre de plásmidos y es sensible a trimetoprim- sulfametoxazol y resistente a ácido nalidíxico.

7.5.2 Medios de cultivo

Para los ensayos de conjugación se utilizó agar Luria Bertani (LB) sin antibiótico y agar LB con trimetoprim (25 µg/ml) más ácido nalidíxico (15 µg/ml). La selección de la cepa control positivo se realizó en agar LB con ampicilina (100 µg/ml) más ácido nalidíxico (15 µg/ml).

7.5.3 Conjugación en medio sólido.

Ambas cepas (donante y receptora) se incubaron independientemente en caldo LB a 37 °C durante la noche, con agitación a 180 rpm. Posteriormente, se mezcló la cepa donante *S. sonnei* (resistente a SXT y sensible a ácido nalidíxico) con la cepa receptora *E. coli* DH5α en una relación donante- receptor de 1:2. La mezcla fue centrifugada a 7.000 rpm por 5 m a temperatura ambiente y se suspendió el *pellet* en 80 µl de caldo LB. El contenido fue depositado en una placa de agar LB y luego incubado por 2 h a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se recuperó todo el contenido de la placa con una tórula y se depositó en un tubo Eppendorf con 250 µl de caldo LB. Se sembró 50 µl en una placa de agar LB sin antibiótico (control de crecimiento) y 200 µl en una placa de agar LB suplementado con trimetoprim (25 µg/ml) y ácido nalidíxico (15 µg/ml), y se incubaron por 18- 24 h a 37 °C en atmósfera normal.

Como control positivo del ensayo de conjugación se realizó en paralelo la conjugación de la cepa *S. sonnei* a0214 donante y la cepa *E. coli* DH5α como receptora. La cepa de *S. sonnei* a0214 posee resistencia a ampicilina debido al gen *blaTEM* ubicado en un plásmido conjugativo de gran tamaño (Toro *et al.*⁷, 2005).

7.5.4 Control de los medios de cultivo y las cepas.

Para controlar el funcionamiento, tanto de los medios de cultivo como de las cepas, previo a la conjugación, se sembraron las cepas de *S. sonnei* (donantes) y la cepa *E. coli* DH5 α (receptora), en placas de agar LB suplementado con trimetoprim (25 μ g/ml) más ácido nalidíxico (15 μ g/ml).

7.5.5 Detección de los genes de resistencia *sul* y *dfr* en las transconjugantes por PCR.

Con el objetivo de detectar los alelos *sul2* y *dfrA14* en las transconjugantes, se realizó PCR con los mismos partidores utilizados en el punto 7.2.2.1 y 7.3.2.1.

Las reacciones de PCR se realizaron según protocolo descrito en los puntos 7.2.2.2 y 7.3.2.2.

8. RESULTADOS.

8.1 Identificación de genes que confieren resistencia a sulfametoxazol (*sul*) y trimetoprim (*dfr*) en cepas de *S. sonnei* aisladas durante el período 2004- 2007 y 2008- 2009 en Chile.

8.1.1 Identificación y confirmación de la identidad de alelos de resistencia a sulfametoxazol: *sul1*, *sul2* y *sul3*.

La identificación de los alelos de resistencia a sulfametoxazol *sul1*, *sul2* y *sul3* se llevó a cabo por PCR. Las 28 cepas (100%) pertenecientes a ambos períodos (2004-2007 y 2008-2009) amplificaron un producto de aproximadamente 293 pb, compatible con el alelo *sul2* (Figura 6).

Es importante mencionar que no hubo amplificación para los alelos *sul1* y *sul3* con los partidores utilizados en este estudio.

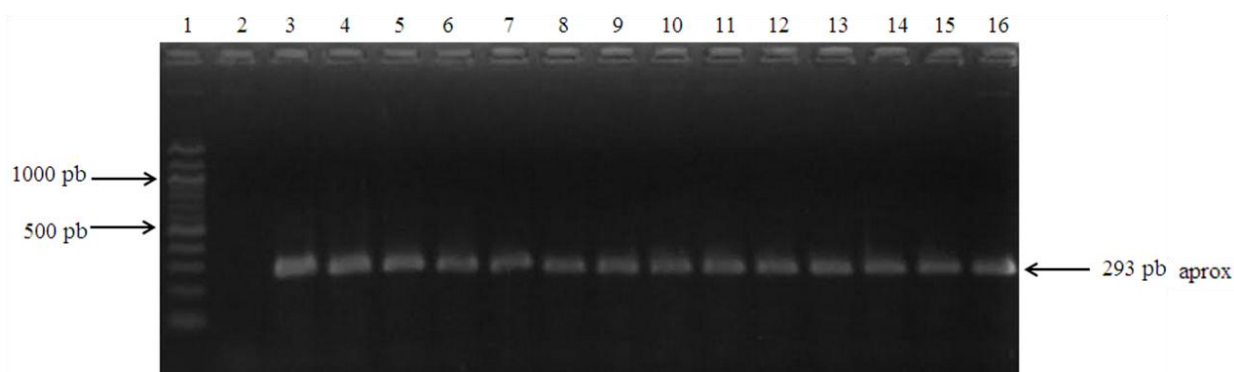


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de PCR del alelo *sul2*. (1): Marcador de tamaño molecular 100 pb (*New England Biolabs*®); (2): Control -: H₂O; (3) Control +: c8006; (4) b0061; (5) b0069; (6) b0110; (7) b0130; (8) b0566; (9) b0569; (10) b0570; (11) c8034; (12) c8055; (13) c8072; (14) c8200; (15) c8236; (16) c8302.

Con el propósito de conocer la identidad de los productos amplificados, se envió a secuenciar una de las cepas (c8006). Posteriormente, se realizó un alineamiento de la secuencia consenso de la cepa en estudio (c8006), versus la secuencia del alelo *sul2* disponible en GenBank (N° acceso: M36657.1). Este alineamiento indicó como resultado un 99,5% de identidad.

8.1.2. Identificación y confirmación de identidad de alelos de resistencia a trimetoprim (*dfp*).

La detección de los alelos *dfp* de los grupos “IA”, “IB”, “IC”, “IIA” y “IIB”, que contienen los 17 alelos *dfp* más frecuentemente descritos en *Shigella* spp., se realizó por PCR utilizando partidores degenerados descritos en la literatura por Seputiené *et al.* ⁶.

De las 14 cepas correspondientes al período 2004- 2007, 13 (92,9%) amplificaron un producto de aproximadamente 382 pb, con los partidores del grupo “IB”, lo que resulta compatible con el alelo *dfpA8* (Figura 7a).

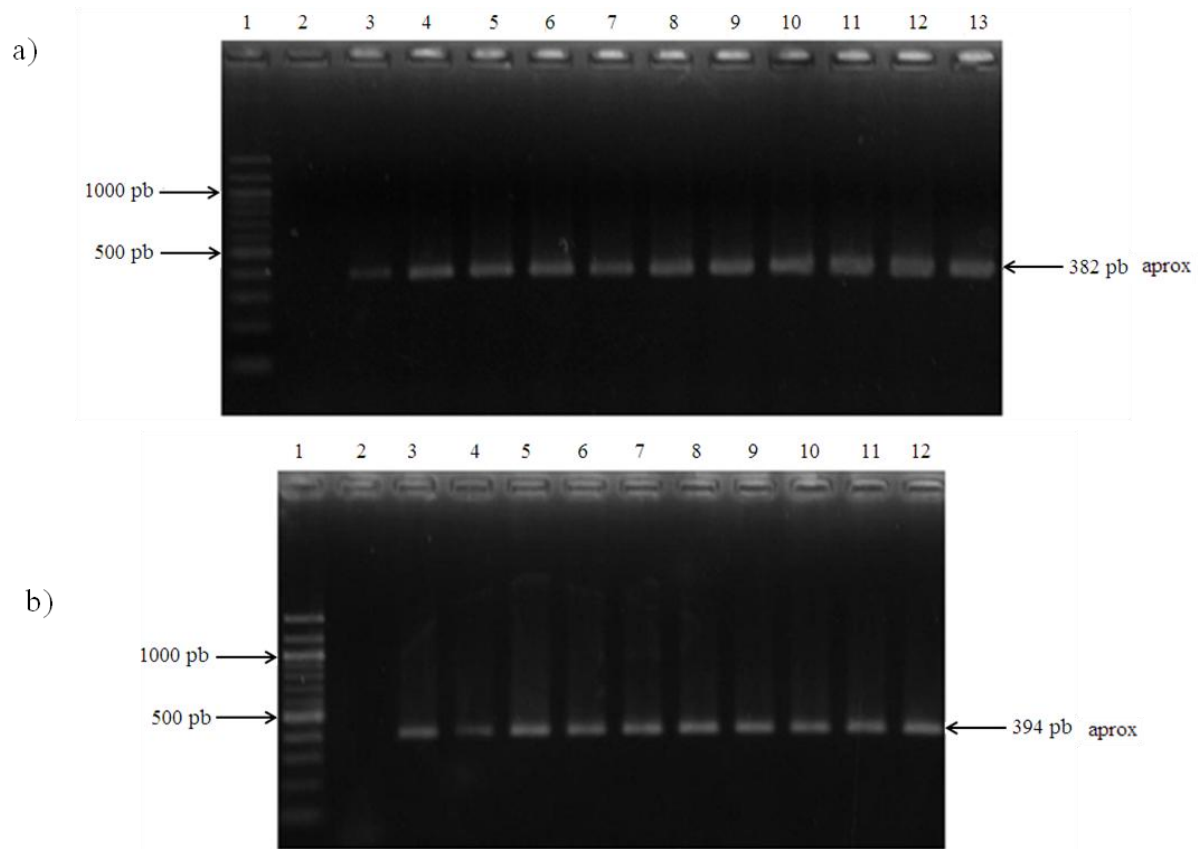


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos amplificados para alelos *dfr* de los grupos IB (*dfrA8*) (a) y IIA (*dfrA5*, *dfrA14*, *dfrA25* y *dfrA27*) (b). (a) (1) Marcador de tamaño molecular 100 pb (*New England Biolabs*®); (2) Control -: H₂O; (3) Control +: *S. sonnei* a0144; (4) b0569; (5) b0570; (6) b0571; (7) b0582; (8) b0061; (9) b0069; (10) b0110; (11) b0130; (12) b0050; (13) b0566. (b) (1) Marcador de tamaño molecular 100 pb (*New England Biolabs*®); (2) Control -: H₂O; (3) Control +: c8006; (4) c8034; (5) c8055; (6) c8072; (7) c8200; (8) c 8236; (9) c8302; (10) c8774; (11) c8848; (12) c0027.

Con el propósito de conocer la identidad de los productos amplificados, cinco amplicones elegidos al azar, fueron enviados a secuenciación (b0050; b0069; b0110; b0130; b0566). Posteriormente, se realizó un alineamiento de las secuencias consenso de los amplicones de las cepas en estudio, versus la secuencia del alelo *dfrA8* disponible en GenBank (Nº acceso: U09273). Todos los alineamientos realizados mostraron como resultado un 99,9% de identidad.

La cepa restante del período 2004- 2007 así como las 14 cepas pertenecientes al período 2008- 2009 (100%), amplificaron un fragmento de aproximadamente 394 pb, con los partidores del grupo “IIA”. Este amplicón podría corresponder a uno de los siguientes alelos de resistencia: *dfrA5*, *dfrA14*, *dfrA25* o *dfrA27* (Figura 7b).

Con el propósito de conocer la identidad de los productos amplificados, cinco amplicones elegidos al azar, fueron enviados a secuenciación (c8006, c8034, c8055, c8302, c0027). Posteriormente, se realizó un alineamiento de las secuencias consenso de los amplicones de las cepas en estudio, versus la secuencia disponible en GenBank para cada uno de los alelos (*dfrA5* N° acceso: X12868; *dfrA14* N° acceso: Z50804; *dfrA25* N° acceso: DQ267940; *dfrA27* N° acceso: FM957879), y los resultados fueron los siguientes: el alineamiento de las secuencias consenso de 5 cepas representativas del período 2008-2009 con la secuencia *dfrA14* (GenBank) dio como resultado entre 99,4% y 99,7% de identidad. Con la secuencia *dfrA5* (GenBank) un 87,4% de identidad para las cepas. Con la secuencia *dfrA25* (GenBank) entre 76,3% y 76,8%, de identidad. Por último, con la secuencia *dfrA27* (GenBank) entre 69,4% y 70,4% de identidad. Estos resultados indican que lo más probable es que el alelo detectado en las cepas pertenecientes al período 2008- 2009 y en una cepa del período 2004-2007 corresponda al alelo de resistencia *dfrA14*.

Es importante mencionar que no hubo amplificación con ninguno de los otros pares de partidores de grupo utilizados.

8.2 Detección de genes *sul* y/o *dfr* que confieren resistencia a sulfametoxazol y trimetoprim en el DNA plasmidial de cepas de *S. sonnei* aisladas en el período 2008- 2009 en Chile.

Según los resultados obtenidos en el objetivo 1, se analizó la presencia de los alelos de resistencia *sul2* y *dfrA14* en el DNA plasmidial de las cepas aisladas en el período 2008- 2009.

8.2.1 Aislamiento del DNA plasmidial de cepas de *S. sonnei*.

Para comprobar la pureza del DNA plasmidial respecto de la contaminación con DNA cromosomal, se realizó PCR del gen 16S rRNA, cuyo resultado fue negativo para todos los extractos plasmidiales y positivo para el extracto de DNA total (Figura 8).

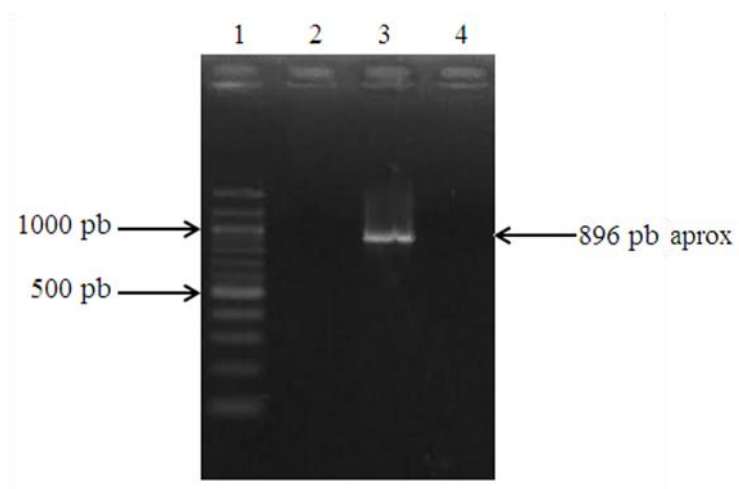


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de PCR para el gen 16S rRNA. (1): Marcador de tamaño molecular 100 pb (*New England Biolabs*); (2): Control -: H₂O; (3): DNA total de *S. sonnei* (Control +); (4): DNA plasmidial de cepa c8006 diluido 1:512 tratado con enzima Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase.

8.2.2 Detección de genes *sul* y *dfr* en el DNA plasmidial de las cepas en estudio.

Una vez obtenido el DNA plasmidial puro, se realizó la detección de los alelos *sul2* y *dfrA14*.

El alelo de resistencia a sulfametoxazol *sul2* fue detectado en el DNA plasmidial de las 14 cepas de *S. sonnei* pertenecientes al período 2008- 2009 (100%) (Figura 9a).

El alelo de resistencia a trimetoprim *dfrA14* fue detectado en el DNA plasmidial de las 14 cepas aisladas en el período 2008- 2009 (100%) (Figura 9b).

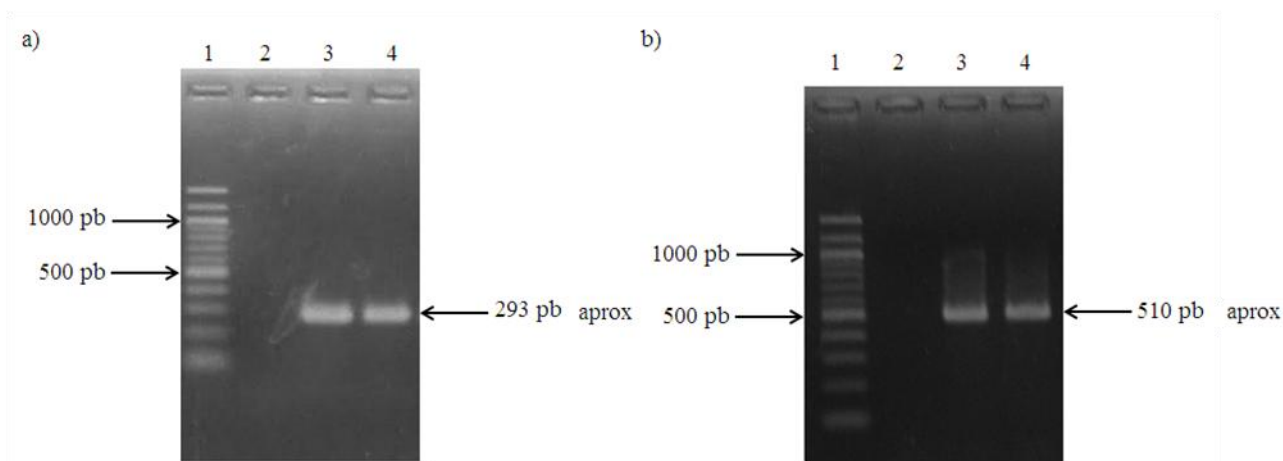


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de PCR para el alelo *sul2* (a) y *dfrA14* (b). (a). (1) Marcador de tamaño molecular 100 pb (*New England Biolabs*®); (2) Control -: H₂O; (3) Control +: DNA total c8006; (4) DNA plasmidial de cepa c8006 diluido 1:512 tratado con enzima Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase. (b) (1) Marcador de tamaño molecular 100 pb (*New England Biolabs*®); (2) Control -: H₂O; (3) Control +: DNA total c8006; (4) DNA plasmidial de cepa c8006 diluido 1:512 tratado con enzima Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase.

8.2.3 Detección de un plásmido de resistencia a SXT en el DNA plasmidial de las cepas en estudio.

A partir del DNA plasmidial de las 14 cepas de *S. sonnei* estudiadas (100%), se logró amplificar un producto de aproximadamente 2849 pb, lo que resulta compatible con la

presencia de un plásmido de resistencia a SXT que contiene los alelos *sul2* y *dfrA14* (Figura 10).

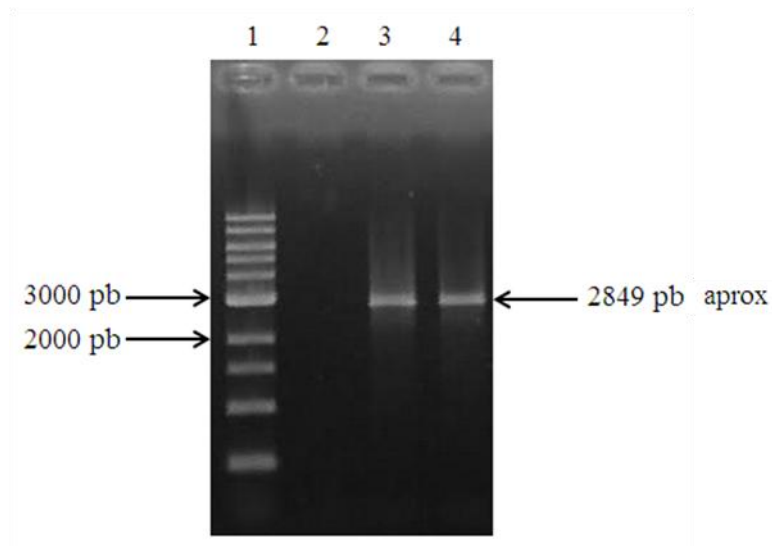


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR para el plásmido de resistencia a SXT: (1) Marcador de tamaño molecular 1 kpb (*New England Biolabs*®); (2) Control -: H₂O; (3) Control +: DNA total de cepa c8225; (4): DNA plasmidial de cepa c8006 diluido 1:512 tratado con enzima Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase.

8.3 Asociación y organización de genes *sul* y *dfr* dentro de un plásmido en particular (3,9 y/o 4,8 MDa), en cepas de *S. sonnei* (2008- 2009).

8.3.1 Transformación de *E. coli* DH5α con plásmidos de 3,9 y 4,8 MDa.

La transformación de *E. coli* DH5α con las bandas de bajo peso molecular de *S. sonnei* c8302 (período 2008- 2009), entregó como resultado 26 colonias transformantes (Figura 11) y la eficiencia de la transformación fue $1,7 \times 10^4$ ufc/μg. Como control de la transformación se utilizó el plásmido pBAD24 (posee resistencia a ampicilina).

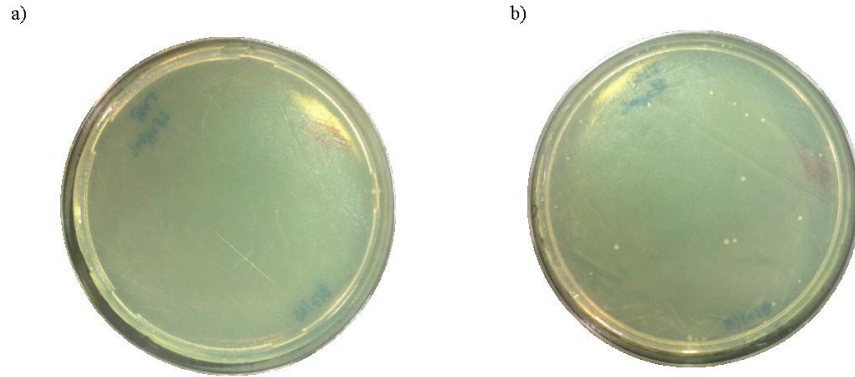


Figura 11. Transformación de *E. coli* DH5 α con plásmidos de 3,9 y 4,8 MDa. a) Control negativo. b) Colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con plásmidos de bajo tamaño molecular provenientes de la cepa *S. sonnei* c8302.

8.3.2 Análisis de *E. coli* DH5 α transformantes.

8.3.2.1 Detección de genes de resistencia, asociación *dfrA14*- plásmido e inserción de *dfrA14* en *strA*.

La detección de los alelos de resistencia a SXT *sul2* y *dfrA14*, tanto para los *pooles* de transformantes, como para las transformantes individuales, fue positiva (Figuras 12a y 12b, respectivamente).

El resultado de PCR para verificar la presencia del plásmido en estudio en *E. coli* DH5 α transformantes fue positivo, tanto para los *pooles* de transformantes, como para las transformantes individuales (Figura 12c).

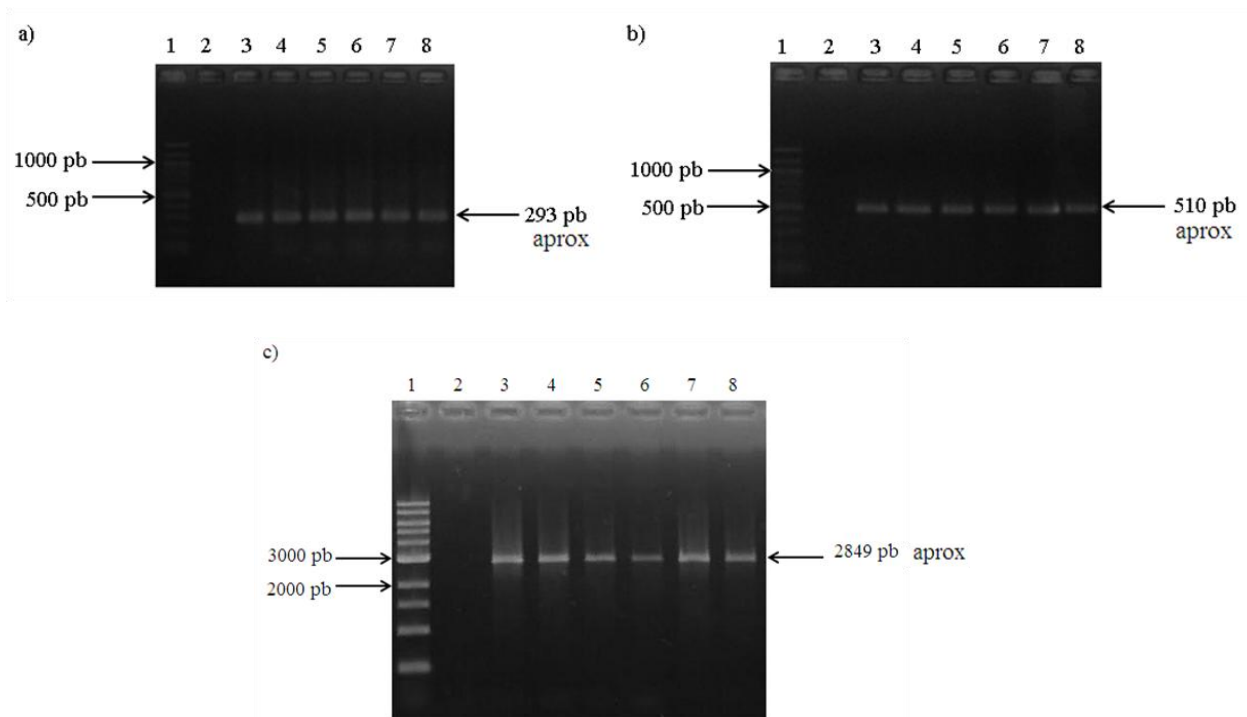


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para el alelo *sul2* (a), *dfrA14* (b) y plásmido de resistencia (c). (a): (1) Marcador de tamaño molecular 100 pb (*New England Biolabs*®); (2) Control -: H₂O; (3) Control +: c8006; (4- 8) *E. coli* DH5α transformantes. (b): (1) Marcador de tamaño molecular 100 pb (*New England Biolabs*®); (2) Control -: H₂O; (3) Control +: c8006; (4- 8) *E. coli* DH5α transformantes. (c): (1) Marcador de tamaño molecular 1 kpb (*New England Biolabs*®); (2) Control -: H₂O; (3) Control +: c8225; (4- 8) *E. coli* DH5α transformantes.

Tanto los *pooles* de transformantes, como las transformantes individuales, amplificaron un producto de 985 pb, con la combinación de partidores pdfrA142-F y dfrA14-R, lo que da cuenta de la inserción del alelo *dfrA14* en *strA* (Figura 13a). Por otro lado, utilizando los partidores dfrA14-F y pdfrA141-R, todos los *pooles* de transformantes, así como las transformantes individuales, amplificaron un producto de 1984 pb (Figura 13b), lo que da cuenta de la asociación del *cassette dfrA14* con el plásmido de resistencia.

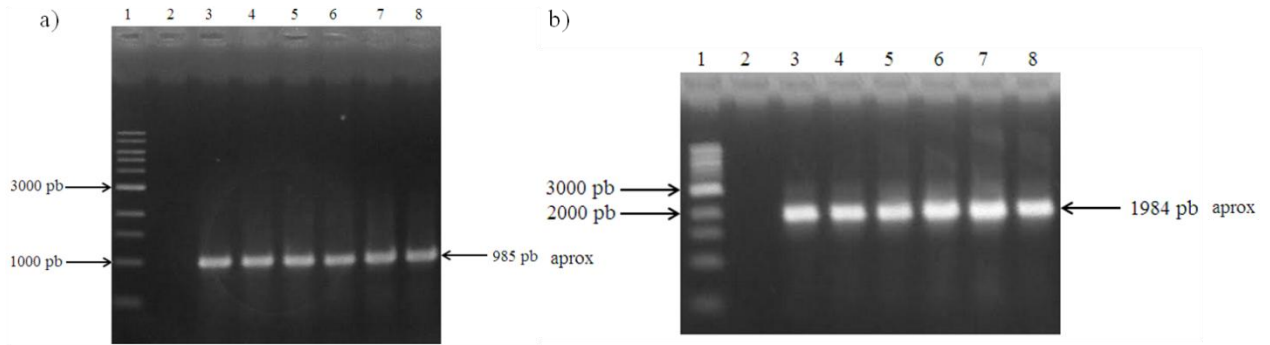


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR para la detección de *strA::dfrA14* (a) y vínculo *dfrA14*- plásmido (b). (a): (1) Marcador de tamaño molecular 1 kpb (*New England Biolabs*®); (2) Control -: H₂O; (3) Control +: *S. sonnei* c8225; (4- 8) *E. coli* DH5α transformantes. (b): (1) Marcador de tamaño molecular 1 kpb (*New England Biolabs*®); (2) Control -: H₂O; (3) Control +: *S. sonnei* c8225 (4- 8) *E. coli* DH5α transformantes.

8.3.2.2 Expresión del fenotipo de resistencia de las transformantes de *E. coli* DH5α.

Los resultados del antibiograma mostraron que todas las transformantes obtenidas expresaron el fenotipo de resistencia asociado a la presencia del plásmido (SXT resistentes).

También se comprobó la sensibilidad de las transformantes frente a estreptomycin. Este fenómeno probablemente se debe a la pérdida de funcionalidad del gen *strA-strB*, debido a la interrupción provocada por la inserción del *cassette dfrA14* (Figura 14).

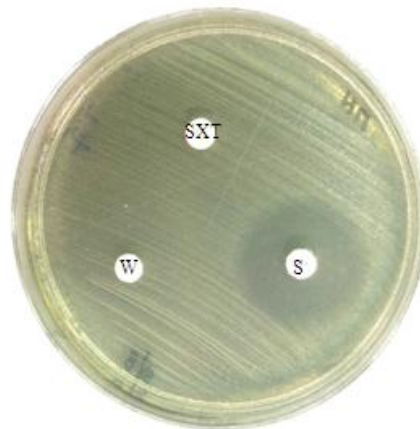


Figura 14. Antibiograma de transformantes *E. coli* DH5α. Se probó discos de SXT (trimetoprim 1,25 µg/sulfametoxazol 23,75 µg), trimetoprim (W) (5 µg) y estreptomycin (S) (10 µg).

8.3.3 Caracterización del plásmido en estudio.

8.3.3.1 Comparación del perfil plasmidial de cepas de *S. sonnei* parentales (período 2008-2009) con perfil plasmidial de cepas transformantes.

El resultado de la electroforesis en gel de agarosa realizado con extractos de DNA plasmidial de cepas parentales (*S. sonnei* 2008- 2009), junto a DNA plasmidial de las transformantes, se muestra en la Figura 15.

El resultado de este experimento demostró que el plásmido implicado en la portación de los genes de resistencia *sul* y *dfr* es el de menor tamaño molecular (3,9 MDa) (Figura 15).

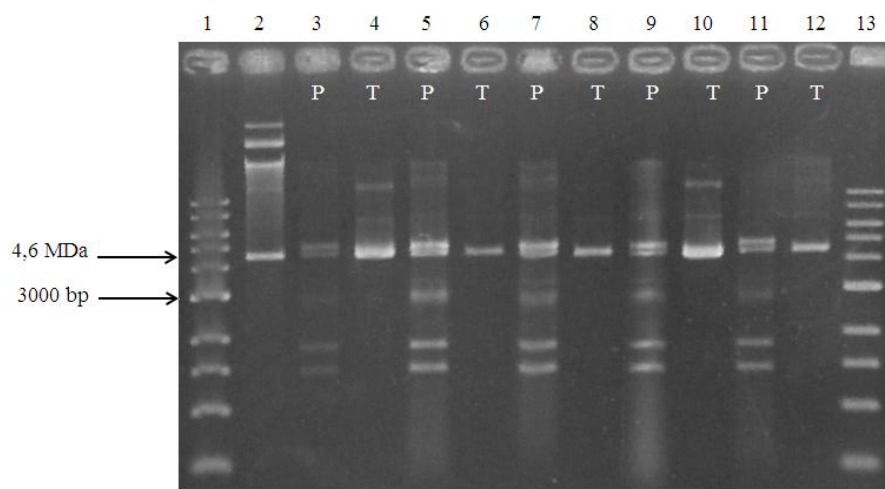


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de extractos plasmidiales de cepas de *S. sonnei* y *E. coli* DH5a transformantes. (1) Marcador de tamaño molecular 1 kpb (*New England Biolabs*®) ; (2) *E. coli* 39R861; (3) c0027; (4) T2; (5) c0700; (6) T7; (7) c0719; (8) T12; (9) C8072; (10) T19; (11) c8205; (12) T25; (13) Marcador de tamaño molecular 1 kpb (*New England Biolabs*®). P: Parental. T: Transformante.

8.3.3.2 Análisis de RFLP del plásmido en estudio con la enzima *SspI*.

El análisis de restricción del plásmido digerido con la enzima *SspI* reveló 3 fragmentos de 1516, 2343 y 2920 pb aproximadamente, tal como se esperaba según análisis *in silico* realizado previamente con la secuencia disponible del plásmido en estudio (Figura 16).

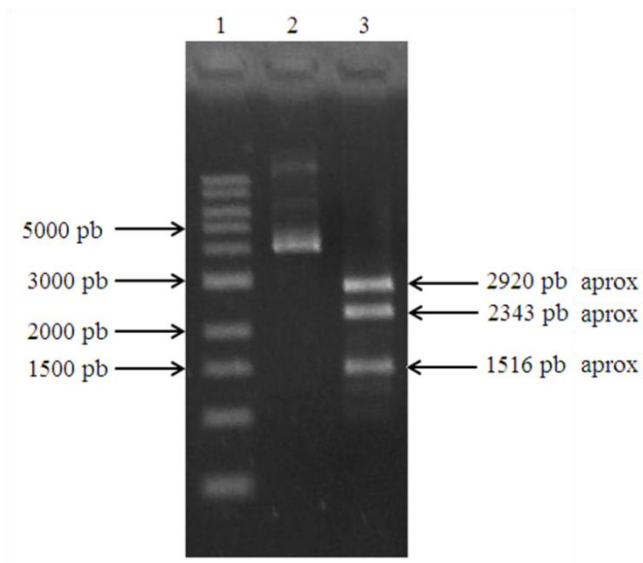


Figura 16. Análisis de restricción del DNA plasmidial de las colonias transformantes DH5 α . (1) Marcador de tamaño molecular 1 kpb (*New England Biolabs*®); (2) plásmido sin digerir; (3) Digestión de plásmido de resistencia con *SspI*.

8.3.3.3 Secuenciación del *locus* de resistencia del plásmido en estudio.

El resultado del alineamiento del *contig* obtenido por secuenciación en esta investigación, con la secuencia del plásmido obtenida a partir de clonamiento en la Tesis de Alfonso Miranda (en ejecución), mostró 99,9% de identidad.

Por otro lado, el resultado del alineamiento del *contig* obtenido por secuenciación en esta investigación, con la secuencia del plásmido pCERC1 disponible en GenBank (Nº acceso: JN012467.1) dio un 99,97% de identidad. Estos resultados confirman que la organización de

los genes de resistencia *sul2*, *strA*, *dfrA14* y *strB* al interior del plásmido de 3,9 MDa presente en las cepas de *S. sonnei* pertenecientes al período 2008- 2009, es idéntica al orden que presentan estos genes en el plásmido pCERC1 descrito en *E. coli* cepa S1.2.T2R⁴⁷ (Figura 17).

Este plásmido, no descrito antes en *Shigella*, se denominó pABC-3.

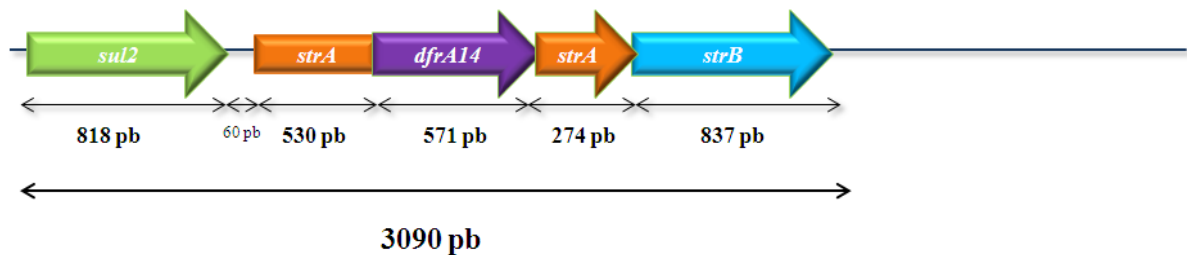


Figura 17. Representación esquemática del *locus* de resistencia del plásmido pABC-3 en cepas de *S. sonnei* aisladas en Chile en el período 2008- 2009. Se indica el tamaño de cada gen de resistencia y el tamaño total del *locus* de resistencia.

8.4 Determinación de la capacidad de transferencia del plásmido que contiene los genes *sul* y *dfr* desde cepas de *S. sonnei* a una célula receptora por conjugación.

Los ensayos de conjugación de 2 cepas de *S. sonnei*, una de Antofagasta (c0027) y una de la Región Metropolitana (c8006), demostraron que a través del método utilizado (conjugación en medio sólido), el plásmido no fue capaz de transferirse a una célula receptora *E. coli* DH5 α . Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la secuenciación, que demostraron que este plásmido no posee genes *tra* (Figura 18a).

La cepa control positivo *S. sonnei* a0214, conjugó. El crecimiento de las colonias transconjugantes en placas de agar LB suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) más ácido nalidíxico (15 μ g/ml) se muestra en la Figura 18b.

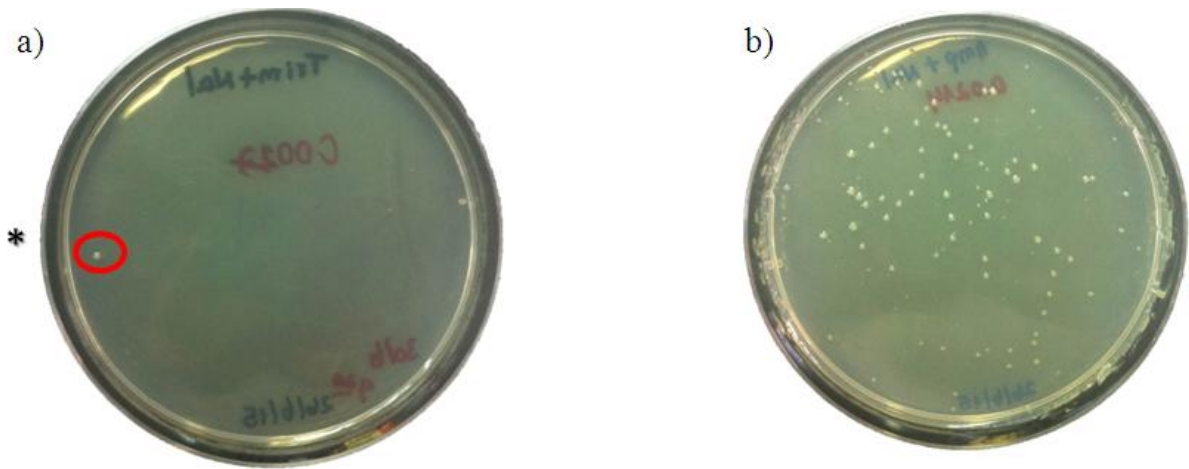


Figura 18. Conjugación de cepas de *S. sonnei* aisladas en el período 2008- 2009. a) Resultado de conjugación, cepa donante: *S. sonnei* período 2008- 2009. b) Control positivo de conjugación (*S. sonnei* a0214).

*Colonia confirmada como *S. sonnei* mediante aglutinación con antisuero comercial (Probac®).

9. DISCUSIÓN.

S. sonnei es uno de los principales agentes etiológicos de shigelosis en el mundo, y una de las especies más frecuentemente aisladas en países desarrollados y en vías de desarrollo, como el nuestro^{4,5}. La shigelosis se caracteriza por ser una infección entérica aguda en la cual el tratamiento antibiótico está recomendado, ya que disminuye los síntomas, evita las complicaciones y la diseminación del patógeno. La baja dosis infectiva junto a la emergencia de cepas multirresistentes a antimicrobianos, potencia que *S. sonnei* sea considerado un importante problema de salud pública^{1,26}.

Entre los antimicrobianos a los cuales *Shigella* spp. ha aumentado drásticamente su resistencia en los últimos años, se encuentra el SXT. Este compuesto es una asociación de agentes antibacterianos, que hasta hace un tiempo era ampliamente utilizado, debido a su bajo costo y alta efectividad. Sin embargo, el gran aumento de cepas resistentes ha obligado a buscar otras alternativas de tratamiento, que muchas veces son demasiado costosas y de uso limitado en pediatría, que justamente es la población blanco de este tipo de infección^{33,48}.

Uno de los mecanismos de resistencia de *Shigella* spp. a SXT es la presencia de genes *sul* y *dfr* que codifican variantes de las enzimas DHPS y DHFR, respectivamente³⁸. La presencia de estos genes se ha asociado con elementos genéticos móviles como transposones, integrones y plásmidos, facilitando su diseminación^{8,9,44}.

Hasta ahora, no se manejaba información sobre los determinantes genéticos de resistencia a SXT en cepas de *Shigella* spp. en nuestro país, salvo un estudio realizado por Toro *et al.*, que analizó la presencia de 3 alelos *dfr* (*dfrA1*, *dfrA7* y *dfrA8*) en cepas de *Shigella*

spp. aisladas desde 1994 a 1997⁷, por lo tanto, este corresponde al primer estudio en el cual se investiga la presencia de alelos *sul* en cepas chilenas de *S. sonnei*.

Debido al aumento de la resistencia de este antimicrobiano, y a datos de la literatura extranjera que nos muestran la diversidad de los alelos de estos genes y su variabilidad en cuanto a temporalidad⁴⁹, se consideró importante estudiar los genes de resistencia a SXT de cepas de *S. sonnei* aisladas durante los últimos años en Chile.

En este contexto, los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que el 100% de las cepas estudiadas, de ambos períodos (2004- 2007 y 2008- 2009), poseen el alelo *sul2*. Como se mencionó anteriormente, en nuestro país no existían estudios moleculares de resistencia a sulfonamidas, por lo que este hallazgo contempla un nuevo antecedente. La amplia distribución de este alelo en nuestras cepas, coincide con lo descrito en la literatura, en la cual se observa que la presencia de alelos *sul1* y *sul2* es mayoritaria en comparación a la baja frecuencia del alelo *sul3*^{50, 51, 52, 53}. La alta prevalencia de *sul2* en nuestras cepas y en diversos estudios realizados en el extranjero, se podría explicar por su frecuente asociación con elementos genéticos móviles, principalmente plásmidos, lo que perpetúa su resistencia, cuya tendencia es ir aumentando en el tiempo⁵⁴.

Respecto a la presencia de genes de resistencia a trimetoprim, en el período 2004- 2007 se detectó el alelo *dfrA8* en el 92,9% de las cepas, similar a lo descrito por Toro *et al.* en cepas de *S. sonnei* y *S. flexneri* de años anteriores en nuestro país (1994- 1997), en las cuales se evidenció la presencia del alelo *dhfrIIIc* (actual *dfrA8*)⁷. La literatura describe a este alelo como uno de los pocos *dfr* no asociado a integrones⁶. Un estudio internacional muestra que *dfrA8* ha sido detectado en cepas de *S. sonnei* aisladas en Carolina del Norte, donde se comunicó asociado a un plásmido conjugativo de gran tamaño (> 90 kpb)⁵⁵, información que

coincide con lo descrito en nuestro país por Toro *et al.* Por otro lado, una cepa del período 2004- 2007 (7,1%) y el 100% de las cepas aisladas durante el período 2008- 2009, poseen el alelo *dfrA14*. Este hecho constituye un antecedente nuevo, ya que a la fecha, no existen datos de la detección de este alelo de resistencia en cepas de *Shigella* spp. aisladas en nuestro país. La literatura internacional indica que *dfrA14*, al igual que *dfrA8*, es uno de los pocos alelos *dfr* que no se asocia frecuentemente a integrones. Sin embargo, su presencia se ha visto asociada a plásmidos de bajo tamaño molecular, que contienen el gen *strA*^{6,44}.

Una diferencia fundamental observada entre las cepas del período 2004- 2007 y 2008- 2009 fue la presencia en estas últimas de 2 plásmidos de bajo tamaño molecular (3,9 y 4,8 MDa) (Unidad de Investigación, Bárbara Ávila, 2013). El presente estudio investigó la presencia de genes de resistencia *sul* y *dfr* y su asociación con estos plásmidos, en cepas de *S. sonnei* aisladas en el período 2008- 2009 en Chile, época en la que se detectó un gran aumento en la resistencia de este microorganismo al SXT.

Después de determinar que las cepas del período 2008- 2009 contienen los alelos *sul2* y *dfrA14*, se confirmó su presencia en el DNA plasmidial, comprobándose su localización a este nivel. Durante el desarrollo de una tesis paralela, enmarcada en el proyecto FONDECYT 1130394, cuyo objetivo fue buscar alelos de resistencia a trimetoprim, a partir de una cepa perteneciente al período 2008- 2009 (c8225), se obtuvo por clonamiento un inserto de tamaño aproximado 6- 7 kpb que fue secuenciado. Esta secuencia resultó ser similar a un plásmido descrito en la literatura identificado en una cepa de *E. coli* comensal S1.2.T2R denominado pCERC1. La única diferencia entre la secuencia de la cepa de *S. sonnei* c8225 y el plásmido de *E. coli* pCERC1 es una delección de 11 pb que presentó la secuencia obtenida desde *S. sonnei*. El plásmido pCERC1 tiene un tamaño de 6,8 kpb y posee un *locus* de resistencia cuya

distribución es: *sul2*- *strA*'-*dfrA14*'-*strA*- *strB*, y el *cassette dfrA14* se encuentra interrumpiendo el gen de resistencia a estreptomicina *strA* ⁴⁷.

Considerando este hallazgo se diseñó primers para detectar este plásmido, por amplificación de una zona distinta al *locus* de resistencia, evidenciándose en el 100% de las cepas estudiadas un producto de PCR. Estos resultados más la presencia de *sul2* y *dfrA14* en el DNA plasmidial sugieren la presencia de este plásmido en las cepas de *S. sonnei* del período 2008- 2009.

Para establecer cuál de los dos plásmidos (3,9 o 4,8 MDa) portaba estos genes de resistencia, se realizó un ensayo de transformación de *E. coli* DH5 α con ambas bandas plasmidiales utilizando como marcador de selección trimetoprim. Se evidenció mediante esta metodología que el plásmido portador de la resistencia resultó ser el de menor tamaño (3,9 MDa).

Un objetivo importante de esta investigación, además de asociar estos genes de resistencia a un plásmido en particular, fue estudiar la organización de estos genes al interior de él, lo que se realizó mediante PCR *tiling*. Los resultados evidenciaron que la organización es similar a la descrita para el plásmido encontrado en una cepa de *E. coli* comensal S1.2.T2R, denominado pCERC1: *sul2*- *strA*'-*dfrA14*'-*strA*- *strB*, lo que posteriormente fue confirmado por secuenciación. Por otro lado, se confirmó el fenotipo de resistencia a SXT en las cepas transformantes de *E. coli* DH5 α . Además, se evaluó la resistencia a estreptomicina de las transformantes, otorgada por los genes *strA*-*strB*, que son los encargados de codificar aminoglucósido- fosfotransferasas. Sin embargo, y dada la interrupción del gen *strA* por la inserción del *cassette dfrA14*, las cepas resultaron ser sensibles a este antibiótico ^{56, 57}, tal como se esperaba.

Estos análisis permitieron caracterizar este plásmido no descrito anteriormente en cepas de *Shigella* spp., el que se denominó pABC-3. La disposición particular de estos genes de resistencia, ha sido descrito en otros plásmidos en la literatura. Uno de ellos es el pSTOJO1, que fue obtenido de una *E. coli* uropatógena aislada en Nigeria ⁴⁴.

Por otra parte, en un trabajo publicado recientemente donde se estudiaron aislados de *Yersinia ruckeri* (patógeno de peces) en el noroeste de Alemania, se describió la presencia de un plásmido de 8,9 kpb, llamado pYR1521, cuya disposición de estos genes de resistencia fue similar a la descrita para pABC-3 ⁵⁷.

Un estudio recientemente realizado en Inglaterra, con cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, un importante patógeno respiratorio en cerdos, reveló la presencia de 2 plásmidos “movilizables” implicados en la resistencia de estas cepas a SXT. Uno de ellos, llamado pM3224T (6050 pb), posee la misma disposición de genes descrita anteriormente en pABC-3, pCERC1, pYR1521 y pSTOJO1.

El otro plásmido aislado de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, identificado como pM3389T (6101 pb), si bien posee la arquitectura *strA*´-*dfrA14*-´*strA*, tiene el *cassette sul2* en una ubicación diferente y además, carece de *strB* ⁵⁸.

A la fecha, en *S. sonnei* se han descrito 2 plásmidos de arquitectura parecida al plásmido pABC-3 descrito en este estudio, estos plásmidos corresponden a: pKKTET7 (8401 pb) y pSS4 (8384 pb), ambos presentes en cepas de *S. sonnei* aisladas en Corea, en la provincia de Gyeongbuk, en el año 1998 (Nº acceso: AF497970-1 y AF534183, respectivamente).

Si comparamos el plásmido pABC-3 con pKKTET7 y pSS4, se puede apreciar que todos ellos comparten un esqueleto parecido, siendo la diferencia más relevante la presencia de los *cassettes* de resistencia *tetR* y *tetA*, y la ausencia de *dfrA14*.

Por otra parte, un plásmido llamado pSFxv_3 (6200 pb), descrito en *S. flexneri*, mostró un elevado porcentaje de identidad con pKKTET-7, con una región *sul2-strA-strB* idéntica, sin embargo, pSFxv_3 carece de los *cassette tetR* y *tetA* ⁵⁹.

Estos estudios realizados en diversas áreas geográficas evidencian que el *cluster* de genes *sul2-strA-strB* albergado en plásmidos, se encuentra ampliamente propagado entre bacterias Gram negativo, en diferentes combinaciones con otros genes de resistencia, como *catA3*, *dfrA14* o *tet* ^{60,61}, lo que sugiere el intercambio de *cassettes* de resistencia entre ellos, manteniendo una misma estructura base.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esta sería la primera vez que se describe la combinación *sul2-strA'-dfrA14-strA-strB* en cepas de *S. sonnei*.

Los resultados demostraron que pABC-3 no fue capaz de transferir a una célula receptora *E. coli* DH5 α a través de conjugación en medio sólido y bajo las condiciones ensayadas, a pesar de que el experimento fue realizado en 3 oportunidades. Por otro lado, la secuenciación del plásmido no evidenció genes *tra*, que son los encargados de codificar funciones relacionadas con la transferencia conjugativa. Estos resultados sugieren que el plásmido pABC-3 no sería conjugativo. Una de las hipótesis que se plantea para explicar cómo el plásmido pCERC1 (muy similar al pABC-3) ha difundido ampliamente entre bacterias Gram negativo a pesar de su incapacidad de conjugarse, es la transformación natural, pero no ha sido mayormente comprobada ⁴⁷.

Durante los períodos posteriores al brote (2010- 2011 y 2012- 2013) se observó una disminución de la resistencia a SXT de un 100% a un 63% y 79%, respectivamente, debido a la coexistencia de cepas fenotípicamente sensibles y resistentes a este antimicrobiano. Probablemente medidas generales frente al control del brote epidémico, colaboraron a la disminución de esta cepa, la cual ha sido paulatinamente reemplazada por los otros fenotipos tanto sensibles como resistentes.

Estudios realizados en las cepas resistentes a SXT enmarcados en el proyecto FONDECYT muestran que en el período 2010-2011 la cepa responsable del brote epidémico portadora del plásmido pABC-3, disminuyó a un 65% y que el otro 35% correspondió a cepas de *S. sonnei* que poseen el alelo *dfrA1*. Respecto del período 2012- 2013 la cepa portadora del plásmido pABC-3, con el alelo *dfrA14* disminuyó a 45% coexistiendo en igual proporción (45%) con las cepas que poseen el *dfrA1* y además apareció un 10% que tiene el alelo *dfrA8*, y una cepa que tiene el alelo *dfrA1* y *dfrA14* simultáneamente (tesis de pregrado, Alfonso Miranda, 2015). A diferencia del alelo *dfrA14* que se encuentra en el plásmido pABC-3, la ubicación del alelo *dfrA1* en las cepas de los dos períodos posteriores se encuentra asociado a un integrón clase 2, con dos variantes (típico y atípico), cuya diferencia entre ambos es la ausencia del gen *aadA1* en el integrón clase 2 atípico (tesis de pregrado, Daniela Díaz, 2015). En la literatura se describe que este integrón se encuentra en el transposón Tn7, cuya ubicación en estas cepas es actualmente motivo de investigación.

Estos resultados en su conjunto evidencian la dinámica temporal de los genes de resistencia a trimetoprim en cepas de *S. sonnei* circulantes en nuestro medio y serán de gran aporte al conocimiento en Chile respecto de los determinantes genéticos de resistencia a SXT, de los cuales se conocía muy poco antes de la realización de estas investigaciones.

Todo esto permite concluir que es de suma relevancia mantener una constante actitud de vigilancia local frente a la emergencia de resistencia en cepas de *Shigella* spp., no solo frente a SXT, sino también a otros antimicrobianos, ya que actualmente, incluso se están comunicando cepas resistentes a quinolonas que es el tratamiento de elección ⁶².

El desafío a futuro es continuar desarrollando conocimiento acerca de los mecanismos moleculares y las bases genéticas que sustentan la resistencia a los antimicrobianos que presentan cepas de *Shigella* circulantes en nuestro país. Conocer cuáles son los determinantes genéticos de resistencia que portan estas cepas y su asociación a elementos genéticos móviles, permitirá manejar mejor las alternativas de tratamiento en pacientes con shigelosis.

10. CONCLUSIONES.

1. Cepas de *S. sonnei* aisladas de los períodos 2004- 2007 y 2008- 2009, en Chile, presentan diferencias en sus determinantes genéticos de resistencia a SXT (*sul* y *dfr*).

El alelo *sul2* se encuentra presente de manera transversal en las cepas de *S. sonnei* aisladas de ambos períodos en estudio, pero presenta diferencias en su ubicación. En las cepas aisladas en el período 2008- 2009, se ubica en un plásmido de bajo tamaño molecular y en las cepas 2004- 2007 su ubicación está en estudio.

Los genes de resistencia a trimetoprim (*dfr*), presentan un alelo diferente en cada período: las cepas pertenecientes al período 2004- 2007 poseen el alelo *dfrA8*, en cambio, las cepas del período 2008- 2009 presentan el alelo *dfrA14*.

2. En las cepas de *S. sonnei* aisladas durante el brote ocurrido en Chile entre los años 2008- 2009, se evidencia la presencia de un plásmido de bajo tamaño molecular (3,9 MDa), el cual posee los alelos de resistencia a SXT *sul2* y *dfrA14*, cuya organización es la siguiente: *sul2-strA'-dfrA14-strA-strB*. Este plásmido, probablemente no conjugativo, no ha sido descrito anteriormente en *Shigella* spp. y se denominó pABC-3.

3. Se demuestra que existe una dinámica temporal de los determinantes genéticos de resistencia a SXT (*sul* y *dfr*) en las cepas chilenas *S. sonnei*.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Niyogi, S.K. "Shigellosis". J. Microbiol. 43:133–143, 2005.
2. Schroeder, G.N.; Hilbi H. "Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion". Clin. Microbiol. Rev. 21: 134–156, 2008.
3. Hamilton-West, M.C.; Prado, J.V.; Hormazábal, J.C.; Lagos, Z.R.; Benadof, F. D.; Mendoza, N.C.; *et al.* "Epidemiología clínica y molecular de las infecciones por *Shigella* spp en niños de la Región Metropolitana durante el verano 2004-2005". Rev. Med. Chil. 135: 1388–1396, 2007.
4. Marcoleta, A.; Toro, C.; Prado, V.; Serrano, M.; Fernández, P.; *et al.* "Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Shigella sonnei* aisladas durante tres períodos diferentes en la Región Metropolitana". Rev. Chil. Infectol. 30: 616–621, 2013.
5. Ministerio de Salud Instituto de Salud Pública de Chile, Gobierno de Chile. Informe de resultados de laboratorio *Shigella* spp. ISP 2010-2012. Santiago: Instituto de Salud Pública; 2012.
6. Seputienė, V.; Povilonis, J.; Ruzauskas, M.; Pavilonis, A.; Suziedėlienė, E. "Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania". J. Med. Microbiol. 59: 315–322, 2010.
7. Toro, C.; Farfán, M.; Contreras, I.; Flores, O.; Navarro, N.; Mora, G.; *et al.* "Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children". Epidemiol. Infect. 133: 81–86, 2005.
8. Hu, L.; Chang, X.; Ye, Y.; Wang, Z.; Shao, Y.; Shi, W.; *et al.* "*Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron". Int. J. Antimicrob. Agents. 37: 230–234, 2011.
9. Iqbal, M.; Rahman, M.; Islam, R.; Banik, A.; Amin, M.; Akter, F.; *et al.* "Plasmid-mediated sulfamethoxazole resistance encoded by the *sul2* gene in the multidrug-resistant *Shigella flexneri* 2a isolated from patients with acute diarrhea in Dhaka, Bangladesh". PLoS One. 9: 1–6, 2014.
10. Marteyn, B.; Gazi, A.; Sansonetti, P. "*Shigella*: A model of virulence regulation in vivo". Gut Microbes. 3: 104–120, 2012.

11. Jennison, A.; Verma, N. "The acid-resistance pathways of *Shigella flexneri* 2457T". *Microbiology*. 153: 2593–2602, 2007.
12. Barrantes, K.; Achí, R. "Interacciones celulares en el proceso de invasión de *Shigella* sp.". *Rev. Panam. Infectol.* 11: 56–61, 2009.
13. Reis, R.; Horn, F. "Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Samonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases". *Gut Pathog.* 2: 1-12, 2010.
14. Torres, A. "Current aspects of *Shigella* pathogenesis". *Rev. Latinoam. Microbiol.* 46: 89–97, 2004.
15. León-Ramírez, S. "Shigelosis (disentería bacilar)". *Salud en Tabasco*. 8: 22–25, 2002.
16. Zlot, A.; Simckes, M.; Vines, J. "Healthy and Safe Swimming Week Norovirus Outbreak Associated with a Natural Lake Used for Recreation — Oregon, 2014". *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 64: 485-512, 2015.
17. Alerte, V.; Cortés, A.; Díaz, T.; Vollaire, Z.; Espinoza, M.; Solari, G.; *et al.* "Foodborne disease outbreaks around the urban Chilean areas from 2005 to 2010". *Rev. Chil. Infectol.* 29: 26–31, 2012.
18. Ministerio de Salud Instituto de Salud Pública de Chile, Vigilancia de Laboratorio, *Shigella* spp., 2010-2014. Santiago: Instituto de Salud Pública; 2014.
19. Carrasco, L.; Solari, G.; Prado, J.; Suazo, C.; Arellano, C.; Hernandez, C.; *et al.* "Brote de shigelosis en una escuela de educación básica". *Rev. Chil. Infectol.* 17:122–128, 2000.
20. McIver, C.; White, P.; Jones, L.; Karagiannis, T.; Harkness, J.; Marriott, D.; *et al.* "Epidemic strains of *Shigella sonnei* biotype g carrying integrons". *J. Clin. Microbiol.* 40:1538–1540, 2002.
21. Oh, J.; Yu, H.; Kim, S.; Seol, S.; Cho, D.; Lee, J. "Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* isolates from southwestern Korea during epidemic periods". *J. Clin. Microbiol.* 41: 421–423, 2003.
22. Delappe, N.; Halloran, F.; Fanning, S.; Cheasty, T.; Cormican, M. "Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from western Ireland, an area of low incidence of infection". *J. Clin. Microbiol.* 41: 1919–1924, 2003.
23. Seol, S.; Kim, Y.; Jeong Y.; Oh, J.; Kang, H.; Moon, D.; *et al.* "Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Shigella sonnei* isolates in Korea". *J. Med. Microbiol.* 55: 871–877, 2006.

24. Mammina, C.; Aleo, A.; Romani, C.; Nastasi, A. “*Shigella sonnei* biotype G carrying class 2 integrons in southern Italy: a retrospective typing study by pulsed field gel electrophoresis”. *BMC Infect. Dis.* 6:117, 2006.
25. Ranjbar, R.; Aleo, A.; Giammanco, G.; Dionisi, A.; Sadeghifard, N.; Mammina, C. “Genetic relatedness among isolates of *Shigella sonnei* carrying class 2 integrons in Tehran, Iran, 2002-2003”. *BMC Infect. Dis.* 7:62, 2007.
26. Chu, Y.; Houang, E.; Lyon, D.; Ling, J.; Ng, T.; Cheng, A. “Antimicrobial resistance in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* in Hong Kong, 1986 to 1995”. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42: 440–443, 1998.
27. Prince, C.; Kirubah, D.; Sushil, J.; Venkatesan, S. “Antibiotic therapy for *Shigella dysentery* (Review)”. *Cochrane Database Syst. Rev.* 4:8, 2010.
28. Khan, W.A.; Seas, C.; Dhar, U.; Salam, M.A.; Bennish, M.L. “Treatment of shigellosis: V. Comparison of azithromycin and ciprofloxacin: A double-blind, randomized, controlled trial”. *Ann. Intern. Med.* 126:697–703, 1997.
29. Ramírez, M.; Valdés, N.; Bravo L.; Fernández, A.; Castañeda, N. “Perfil plasmídico y resistencia antimicrobiana en cepas de *Shigella* aisladas en Cuba”. *Rev. Cubana Med. Trop.* 56:178–185, 2004.
30. Sivapalasingam, S.; Nelson, J.M.; Joyce, K.; Hoekstra, M.; Angulo, F.J.; Mintz, E.D. “High prevalence of antimicrobial resistance among *Shigella* isolates in the United States tested by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System from 1999 to 2002”. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50:49-54, 2006.
31. Salas, H.M. “Opciones de tratamiento en shigelosis”. *Rev. Soc. Bol. Ped.* 46:80–84, 2007.
32. Sandra, L.; Martínez, A.; Valero, K.; Avila, Y. “Prevalencia y resistencia antimicrobiana de especies de *Shigella* aisladas de niños con diarrea en Maracaibo Venezuela”. *Kasmera.* 30:7–16, 2002.
33. Vrints, M.; Mairiaux, E.; Van Meervenne, E.; Collard, J.M.; Bertrand, S. “Surveillance of antibiotic susceptibility patterns among *Shigella sonnei* strains isolated in Belgium during the 18-year period 1990 to 2007”. *J. Clin. Microbiol.* 47:1379–1385, 2009.
34. Bastos, F.C.; Loureiro, E.C.B.; “Antimicrobial Resistance of *Shigella* spp. isolated in the State of Pará, Brazil”. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44:607–610, 2011.
35. Zaidi, M.B.; Estrada- García, T. “*Shigella*: A Highly Virulent and Elusive Pathogen”. *Curr. Trop. Med. Rep.* 1:81- 87, 2014.

36. Delpiano, M. L.; Tejerina, M. H.; Cona, T. E.; Aviles, L. CL. "Patrones de sensibilidad in vitro y comportamiento clínico de *Shigella*". Rev. Chil. Infectol. 18:101–107, 2001.
37. Huovinen, P.; Sundstrom, L.; Swedberg, G.; Skold, O.; "Trimethoprim and sulfonamide resistance". Antimicrob. Agents. Chemother. 39:279–289,1995.
38. Sköld, O. "Resistance to trimethoprim and sulfonamides". Vet. Res. 32:261–273, 2001.
39. Huovinen, P. "Resistance to trimethoprim- sulfamethoxazole". Clin. Infect. Dis. 32:1109–1113, 2001.
40. Byrne-Bailey, K.G.; Gaze, W.H.; Kay, P.; Boxall, B.; Hawkey, P.M.; Wellington, E.M.H. "Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom". Antimicrob. Agents. Chemother. 53:696–702, 2009.
41. Perreten, V.; Boerlin, P. "A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland". Antimicrob. Agents. Chemother. 47:1169–1172, 2003.
42. Carattoli, A. "Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. Antimicrob. Agents. Chemother. 53:2227–2238, 2009.
43. Frost, L.S.; Leplae, R.; Summers, A.O.; Toussaint, A. "Mobile genetic elements: the agents of open source evolution". Nat. Rev. Microbiol. 3:722–732, 2005.
44. Ojo, K.K.; Kehrenberg, C.; Schwarz, S.; Odelola, H.A. "Identification of a complete *dfrA14* gene cassette integrated at a secondary site in a resistance plasmid of uropathogenic *Escherichia coli* from Nigeria". Antimicrob. Agents. Chemother. 46:2054–2055, 2002.
45. Guzmán, M.; Alonso, G. "Caracterización de la región variable de integrones clase 1 presentes en cepas nosocomiales de *Klebsiella pneumoniae*". Rev. Méd. Chile. 138: 322- 329, 2010.
46. Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids". Gene. 96:23–28, 1990.
47. Anantham, S.; Hall, R.M. "pCERC1, a small, globally disseminated plasmid carrying the *dfrA14* cassette in the *strA* gene of the *sul2-strA-strB* gene cluster". Microb. Drug. Resist. 18: 364-371, 2012.
48. Niyogi, S.K. "Increasing antimicrobial resistance - An emerging problem in the treatment of shigellosis". Clin. Microbiol. Infect. 13:1141–1143, 2007.

49. Brolund, A.; Sundqvist, M.; Kahlmeter, G.; Grape, M. “Molecular characterisation of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two year intervention on trimethoprim use”. PLoS One. 5: 1–5, 2010.
50. Bean, D.C.; Livermore, D.M.; Papa, I.; Hall, L.M.C. “Resistance among *Escherichia coli* to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man”. J. Antimicrob. Chemother. 56:962–964, 2005.
51. Adesiji, Y.O.; Deekshit, V.K.; Karunasagar, I. “Antimicrobial-resistant genes associated with *Salmonella* spp. isolated from human, poultry, and seafood sources”. Food Sci. Nutr. 2:436–442, 2014.
52. Blahna, M.T.; Zalewski, C.A.; Reuer, J.; Kahlmeter, G.; Foxman, B.; Marrs, C.F. “The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada”. J. Antimicrob. Chemother. 57:666–672, 2006.
53. Kern, M.B.; Klemmensen, T.; Frimodt-Møller, N.; Espersen, F. “Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance”. J. Antimicrob. Chemother. 50:513–516, 2002.
54. Teichmann, A.; Agra, H.N.D.C.; Nunes, L.D.S.; da Rocha, M.P.; Renner, J.D.P.; Possuelo, L.G. “Antibiotic resistance and detection of the *sul2* gene in urinary isolates of *Escherichia coli* in patients from Brazil”. J. Infect. Dev. Ctries. 8:39–43, 2014.
55. Barg, N.L.; Register, S.; Thomson, C.; Amyes, S. “Sequence identity with type VIII and association with IS176 of type IIIc dihydrofolate reductase from *Shigella sonnei*”. Antimicrob. Agents. Chemother. 39:112–116, 1995.
56. Chiou, C.S.; Jones, L. “Expression and identification of the *strA-strB* gene pair from streptomycin-resistant *Erwinia amylovora*”. Gene. 152:47–51, 1995.
57. Huang, Y.; Michael, G.B.; Becker, R.; Kaspar, H.; Mankertz, J.; Schwarz, S.; Runge M. “Pheno- and genotypic analysis of antimicrobial resistance properties of *Yersinia ruckeri* from fish”. Vet. Microbiol. 171:406–412, 2014.
58. Bossé, J.T.; Li, Y.; Walker, S.; Atherton, T.; Fernandez Crespo, R.; Williamson, S.M.; “Identification of *dfrA14* in two distinct plasmids conferring trimethoprim resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*”. J. Antimicrob. Chemother. 70:2217–2222, 2015.
59. Ye, C.; Lan, R.; Xia, S.; Zhang, J.; Sun, Q.; Zhang, S.; “Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*”. J. Clin Microbiol. 48:419–426, 2010.

60. Kehrenberg, C.; Schwarz, S. "Nucleotide sequence and organization of plasmid pMVSCS1 from *Mannheimia varigena*: identification of a multiresistance gene cluster". *J. Antimicrob. Chemother.* 49:383–386, 2002.
61. Kehrenberg, C.; Tham, N.T.T.; Schwarz, S. "New Plasmid-Borne Antibiotic Resistance Gene Cluster in *Pasteurella multocida*". *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47:2978–2980, 2003.
62. Mensa, L.; Marco, F.; Vila, J.; Gascón, J.; Ruiz, J. "Quinolone resistance among *Shigella* spp. isolated from travellers returning from India". *Clin. Microbiol. Infect.* 14:279–281, 2008.

12. ANEXO.



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

CERTIFICACIÓN

El Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos, en sesión del 11 de septiembre, certifica y autoriza la utilización de cepas de *Shigella sonnei*, durante la realización del proyecto titulado: **"Population dynamics of *Shigella sonnei* Strains in Chile: Emerging of a new pathogen?"**. (Dinámica de las poblaciones de cepas de *Shigella sonnei* circulantes en Chile. Un llamado de alerta a la aparición de patógenos emergentes)", cuyo Investigador Responsable es la **Dra. Cecilia Toro U.**, del Programa Disciplinario de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Este proyecto no involucra muestras de sangre, tejidos ni material biológico humanos. Se trabajará con alrededor de 400 cepas de *S. sonnei* que pertenecen a la colección del Programa de Microbiología y Micología, aisladas en distintos lugares de Chile y obtenidas en un periodo de casi 20 años (desde 1995 a la fecha), incluyendo en esta colección cepas cedidas por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) y cepas de otros lugares del mundo cedidas por el Dr. François-Xavier Weill, del Centro de Referencia Nacional Francés para *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella*, del Instituto Pasteur, Paris-Francia.

Se extiende el presente certificado a petición de la interesada, para ser presentado en el Concurso Fondecyt 2013.

Santiago, 13 de septiembre de 2012.

Sra. Marianne Gaudlitz H.
Vicepresidenta

MGH/mva