



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA DIFERENCIACIÓN
DE LAS ESPECIES DE *SHIGELLA* SSP.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

GLORIA ABIGAIL MILLÁN ZAMUDIO

DIRECTOR DE TESIS

HUGO GILDARDO CASTELÁN SÁNCHEZ

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2017.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: AURORA IRMA ORTEGÓN ÁVILA**

VOCAL: **Profesor: JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA**

SECRETARIO: **Profesor: HUGO GILDARDO CASTELÁN SÁNCHEZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Trabajo realizado en el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) en la subdirección de Secuenciación y Bioinformática, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

ASESOR DEL TEMA:

HUGO GILDARDO CASTELÁN SÁNCHEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

ROBERTO DASSAEVT CARVENTE GARCÍA

SUSTENTANTE:

GLORIA ABIGAIL MILLÁN ZAMUDIO

ÍNDICE

Abreviaturas.....	3
Resumen.....	5
1.0 Introducción.....	6
2.0 Marco teórico.....	8
2.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).....	8
2.2 Género <i>Shigella</i>	9
2.2.1 Descubrimiento.....	10
2.2.2 Shigellosis (disentería bacilar).....	10
2.2.3 Epidemiología.....	12
2.2.4 Genoma de <i>Shigella</i>	14
2.2.5 Plásmido de virulencia.....	15
2.2.6 Patogenicidad.....	17
2.2.7 Identificación Microbiológica.....	18
2.2.8 Identificación molecular.....	19
2.2.8.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	19
2.2.8.2 Secuenciación.....	27
2.3 Antecedentes Particulares.....	31
2.3.1 Epidemiología en México.....	31
2.3.2 Relación entre <i>Shigella</i> y <i>Escherichia coli</i>	34
3.0 Justificación.....	36
4.0 Objetivos.....	37
5.0 Hipótesis.....	38
6.0 Metodología.....	39
6.1 Estrategia experimental.....	39
6.2 Materiales.....	42
6.2.1 Material Biológico.....	42
6.2.2 Selección de muestras.....	42
6.2.3 Software.....	42

6.3	Métodos.....	43
6.3.1	Búsqueda de genes en base de datos Shigella Data Base.....	43
6.3.2	Análisis de Pangenoma.....	43
6.3.3	Diseño de iniciadores y sondas.....	43
6.3.4	Extracción de ADN.....	45
6.3.5	PCR punto final genes <i>lacY</i> , <i>ipaH</i> , <i>S4646</i> , <i>SSO1290</i>	47
6.3.6	PCR multiplex.....	49
6.3.7	PCR tiempo real (qPCR).....	51
6.3.8	Secuenciación.....	53
6.3.9	Edición y análisis de las secuencias.....	53
7.0	Resultados.....	54
8.0	Discusión.....	88
9.0	Conclusiones.....	93
10.0	Prospectivas.....	94
11.0	Referencias.....	95
APENDICES		

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

BHI: Brain Heart Infusion

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

ddNTPs: Didesoxirribonucleótidos trifosfato

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

ETA: Enfermedades Transmitidas por Alimentos

InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

LDDOP: Laboratorio de Diagnostico para la Detección de Organismos Patógenos

mA: mili-ampere

Mg: Magnesio

mg: mili-gramos

min: minutos

mL: mili-litros

mM: Mili-mol

ng: nano-gramos

NGS: Next Generation Sequencing

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: Fósforo

pb: Pares de bases

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

rpm: Revoluciones por minuto

s: Segundos

SAGARPA: Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

SSA: Secretaria de Salud

TAE: Tris, Ácido acético, EDTA

TBE: Tris, Ácido Bórico, EDTA

u: unidades

UV: Ultra Violeta

v: volts

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Adquirida

μL: Micro litros

μM: Micro mol

RESUMEN

La bacteria *Shigella* spp. es causante de Shigelosis una enfermedad altamente transmisible; esta bacteria pertenece a la familia de las enterobacterias, misma a la que pertenece *Escherichia coli*, la cual se encuentra estrechamente relacionada, compartiendo características genotípicas y fenotípicas por lo que se ha sugerido que son de la misma especie. Debido a esta estrecha relación, la diferenciación mediante pruebas bioquímicas entre estos géneros se ha dificultado. Así mismo para el caso de las especies de *Shigella* se dificulta la diferenciación a través de pruebas bioquímicas.

Con base en lo antes mencionado, se identificaron marcadores moleculares específicos para la diferenciación de estas especies bacterianas, los cuales se probaron por medio de técnicas moleculares.

Así entonces se identificaron los genes *ipaH* y *lacY*; el primero es un gen multicopia de invasión encontrado en plásmido (antígeno H), mientras que el segundo aporta la capacidad de fermentar la lactosa. Estos genes son específicos para de las cepas de *Shigella* spp. y *E. coli*. respectivamente; con los cuales se logró el desarrollo y estandarización de una metodología basada en PCR multiplex y qPCR, permitiendo la diferenciación de las cepas en cuestión. De igual forma se identificaron dos genes únicos para las cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei*, ambas aisladas con mayor frecuencia en el mundo y de relevancia epidemiología en México. Los genes encontrados fueron S4646 y SSO1290 respectivamente, estos genes se encuentran involucrados en papeles biológicos importantes en las especies de *Shigella* antes mencionadas. Por lo tanto en este proyecto se identificaron genes específicos que permitieron la identificación y diferenciación de las cepas bacterianas ya mencionadas por medio de métodos moleculares los cuales ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad.

1.0 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas constituyen un problema severo de salud, estas son causadas por agentes patógenos, entre los que se encuentran microorganismos bacterianos, virales y parásitos. Dentro de los principales organismos causantes de este tipo de enfermedades se encuentra la bacteria *Shigella* spp. causante de Shigelosis, enfermedad altamente transmisible (<100 células viables pueden producir la enfermedad en adultos sanos), responsable de cerca de 165 millones de casos de disentería grave cada año [Niyogi, 2005]. El mayor número de casos se presenta en países en desarrollo, estimándose un 69 % de los episodios en niños menores a 5 años de edad [Kotloff *et al.*, 1999].

El hábitat de *Shigella* spp. es el colon del humano, siendo este mismo su principal reservorio. La forma de transmisión de esta bacteria es por contacto directo o indirecto, lo que incluye alimentos y líquidos contaminados con heces de personas infectadas.

La bacteria *Shigella* pertenece a la familia de las *Enterobacterias*, las cuales comparten características fenotípicas, sin embargo, existe un caso particular entre las bacterias *E. coli* y *Shigella* spp., ya que comparten características genotípicas y fenotípicas, lo cual ha sugerido que son de la misma especie [Lukjancenko *et al.*, 2010].

Debido a esta estrecha relación, la diferenciación entre las especies *Shigella* y *E. coli*, mediante pruebas bioquímicas dificultan su identificación, además de emplear más tiempo para su realización.

Con base en lo antes mencionado se decidió desarrollar una metodología aplicando técnicas moleculares que permitan la identificación y diferenciación entre las 2 especies de *Shigella* aisladas con mayor

frecuencia en el mundo (*S. flexneri* y *S. sonnei*) [Kotloff *et al.*, 1999], así como de la especie *E. coli*.

En el presente proyecto se propuso la identificación de marcadores moleculares con los cuales se llevó a cabo el desarrollo de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) tipo multiplex que permitió la identificación y diferenciación de las especies de *S. flexneri* y *S. sonnei*, y de éstas respecto a *E. coli*, para la implementación de una metodología más rápida y específica que podrá ser utilizada en el SENASICA logrando la identificación de las cepas bacterianas cuando estas sean recibidas en la institución pero en especial en los laboratorios móviles, permitiendo dar un diagnóstico más rápido y específico.

2.0 MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Los alimentos pueden contaminarse por acción de agentes físicos, químicos y biológicos, algunos alimentos por sus mismas características fisicoquímicas favorecen la supervivencia y multiplicación de microorganismos patógenos; su contaminación se origina desde la producción primaria hasta el consumo final por prácticas inadecuadas en la manipulación [Vásquez de Plata, 2003].

La transmisión de enfermedades mediante el consumo de alimentos es un problema ya conocido; sin embargo, recientemente en todo el mundo se ha constatado el aumento de su frecuencia. Las causas de estas enfermedades son diversas, el Comité de Expertos de la OMS plantea que la mayoría de las enfermedades por alimentos son de origen microbiano [Caballero, 2008].

Dentro de las principales bacterias causantes de esta enfermedad se encuentran *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, entre otras [Germani y Sansonetti, 2006]

En México estas enfermedades son una de las principales causas de gastroenteritis, lo que las convierte en un importante problema de salud pública, éstas se transmiten, ya sea por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados, afectando así principalmente a niños y ancianos [León, 2002]. Así mismo su incidencia y prevalencia se han visto asociados al nivel socioeconómico de la población.

La búsqueda e identificación en los laboratorios clínicos de México se centra principalmente en patógenos clásicos como: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Yersinia*. Sin embargo, existen otros géneros involucrados en estas enfermedades, como *Aeromonas*, que en otros países subdesarrollados se ha documentado como agente etiológico de enfermedades gastrointestinales y marcador de contaminación fecal en el agua [Hernández *et al.*, 2011].

2.2 Género *Shigella*

El género *Shigella* pertenecen a la familia de las *Enterobacterias*, es un bacilo Gram-negativo, no móvil, no esporulado y anaerobio facultativo [Niyogi, 2005].

Existen cuatro especies de *Shigella* clasificadas de acuerdo a sus características bioquímicas y serológicas: *S. dysenteriae* (Serogrupo A, que consta de 15 serotipos); *S. flexneri* (Serogrupo B, que consta de 19 serotipos incluidos los subserotipos); *S. boydii* (Serogrupo C, que consta de 20 serotipos); y *S. sonnei* (Serogrupo D, que consta de un solo serotipo) [Chung *et al.*, 2016]. Esta clasificación se basa en el componente de antígeno "O" de los lipopolisacáridos presentes en la membrana externa. Los serogrupos A, B, y C son fisiológicamente muy similares mientras que *Shigella sonnei* puede diferenciarse de los otros serogrupos por ser beta-D-galactosidasa y ornitina descarboxilasa positivo en pruebas bioquímicas [Pal *et al.*, 2013].

2.2.1 Descubrimiento.

S. dysenteriae serotipo 1 fue la primera especie de *Shigella* aislada, descubierta en 1896 por Kiyoshi Shiga, cuya investigación microbiológica fue dirigida a un brote de “sekiri”, (diarrea de color rojo” en japonés) que afectó a más de 91,000 personas con una tasa de mortalidad de más del 20 % [Niyogi, 2005]

Así entonces, el Dr. Shiga estudio a 36 pacientes de aquel brote, en el Instituto de Enfermedades Infecciosas de Japón, donde de las heces de los pacientes aisló un bacilo Gram-negativo que no fermentaba lactosa. Shiga continuó caracterizándolo y más adelante organismos con características similares fueron reportados por investigadores. En última instancia y taxonómicamente se definió como el género *Shigella* nombrando así a *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei* [Niyogi, 2005].

2.2.2 Shigellosis (Disentería bacilar)

Las especies de *Shigella* se encuentran entre las causas más comunes de las enfermedades diarreicas bacterianas [Ranjbar *et. al.*, 2014], se presentan aproximadamente 163 millones de episodios de shigelosis al año de las cuales 1.1 millones de los casos llegan hasta la muerte [Sahl *et. al.*, 2015].

Los seres humanos son el principal reservorio de la infección, la dosis infecciosa de *Shigella* es muy baja ya que menos de 100 células bacterianas pueden causar enfermedad en adultos sanos [Germani y Sansonetti, 2006], la transmisión se produce de persona a persona a

través de la vía fecal-oral, pudiéndose difundir a través alimentos y agua contaminados [Niyogi, 2005].

La Shigellosis es una infección bacteriana aguda que afecta el intestino grueso y la porción distal del intestino delgado, se caracteriza por diarrea acompañada de fiebre, náusea y algunas veces toxemia, además de vómito y cólicos. En los casos típicos, las heces contienen sangre y moco (disentería), que es el resultado de la confluencia de microabscesos causados por los microorganismos invasores; sin embargo, en la mayoría de los casos se presenta una diarrea acuosa como cuadro inicial. Las convulsiones pueden ser una complicación importante en los niños de corta edad [Grande *et al.*, 1998].

- Cuadro Clínico

Los pacientes que presentan diarrea acuosa y fiebre pueden sospechar de padecer shigelosis. Las enfermedades diarreicas no se pueden distinguir clínicamente tan fácil de otras infecciones como las virales, causadas por otras bacterias o las causadas por protozoos, las cuales pueden presentar vómitos y diarrea, sin embargo la presencia de heces mucoides con sangre es un indicativo alto de shigelosis. Aunque se sabe que la sangre es común en las heces de pacientes con amibiasis, por lo general es de color marrón oscuro, mientras que las causadas por *Shigella* son de color rojo brillante [Niyogi, 2005].

La enfermedad suele tener una duración de cuatro a siete días en promedio. La gravedad de la infección y la tasa de letalidad dependen del huésped (edad y estado de nutrición previo) y del serovar, *S. dysenteriae 1* (bacilo de Shiga) suele ocasionar cuadros y complicaciones graves, que incluyen megacolon tóxico y síndrome urémico-hemolítico; las tasas de

letalidad han llegado a 20 % entre los casos hospitalizados. Por el contrario, muchas infecciones por *S. sonnei* tienen una evolución clínica breve y una tasa de letalidad casi insignificante, a excepción de los huéspedes inmunodeficientes. En muchas regiones del mundo en desarrollo, la epidemia del VIH intersecta con la propagación de la shigelosis, como se sabe el VIH provoca una deficiencia en el sistema inmune de la persona infectada, lo cual conduce a un cuadro clínico más severo [Batchelor et al., 1996]. El período de incubación puede ser de 12 a 96 horas, sin embargo, se puede extender hasta una semana en el caso de *S. dysenteriae 1*. [González *et al.*, 1993].

2.2.3 Epidemiología

Como se mencionó anteriormente, la shigelosis es un problema mundial de salud humana. Hoy en día a más de 100 años después de su descubrimiento sigue siendo un problema de salud pública significativo, especialmente en los países en desarrollo, siendo responsable de aproximadamente el 10 % de los episodios de diarreas entre los niños menores de cinco años y hasta el 75 % de las muertes por diarrea [Kotloff *et al.*, 1999].

En Estados Unidos y Europa, las personas infectadas comúnmente son niños en guarderías, trabajadores migrantes, viajeros y hombres homosexuales. Las personas con diarrea sintomática son las principales responsables de la transmisión, también se puede dar, aunque con menos frecuencia, por alimentos contaminados, agua y fómites. Por otro lado, la mosca doméstica común también puede ser un vector para la transmisión de la shigelosis [Levine, 1991].

Por otra parte, diversas encuestas llevadas a cabo en los centros de tratamiento muestran que de los casos provocados por *Shigella*, entre el 5 % y 15 % presentan diarrea y de 30 % al 50 % presentan disentería. [Niyogi, 2005].

A pesar de que la bacteria *S. dysenteriae* fue responsable de grandes epidemias [Tuttle *et al.*, 1995], actualmente no es tan común encontrarla [Livio *et al.*, 2014]. Del mismo modo, *S. boydii* se ha aislado con poca frecuencia. Por lo que *S. flexneri* y *sonnei* son las más comunes en todo el mundo. *S. flexneri* ha sido aislada con mayor frecuencia en países con pocos recursos [Kotloff *et al.*, 1999]; mientras que *S. sonnei* es aislada con mayor frecuencia en las regiones con ingresos más altos (Figura 1) [Kotloff *et al.*, 1999; Ram *et al.*, 2008].

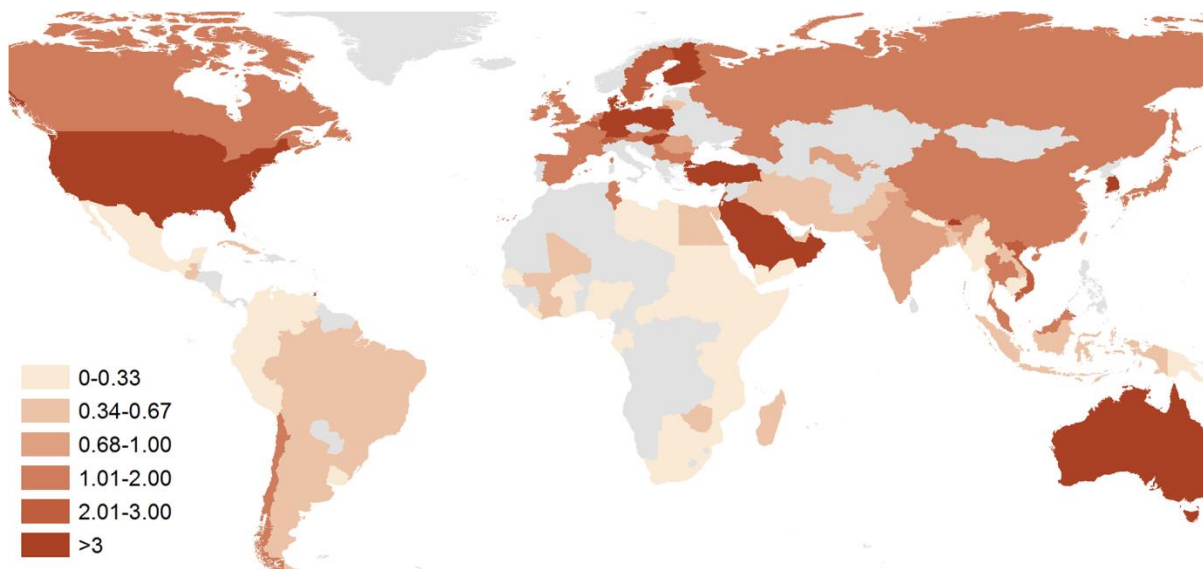


Figura. Proporción de *S. sonnei* y *S. flexneri* aisladas de 100 países entre 1990-2014. Cuanto más oscuro es el color, mayor es la proporción de *S. sonnei* aislada de cada país y entre más claro es el color es mayor la proporción de *S. flexneri*. Países de color gris no presentan información sobre las especies identificadas. [Thompson *et al.*, 2015].

2.2.4 Genoma de *Shigella*

El genoma de *Shigella* tiene un tamaño aproximado de 4.3 Mb y un plásmido de virulencia de 177 Kb, con un porcentaje de G-C del 50%.

Las especies de *Shigella* y la bacteria *E. coli* MG1655 probablemente tienen el mismo mecanismo de replicación, ya que cuentan con 2393 genes ortólogos compartidos entre las cuatro especies de *Shigella*. [Yang *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2016].

La distribución de los genes de virulencia muestra la diversidad entre los genomas de las cuatro especies *Shigella*. Ejemplo de ello es la isla de patogenicidad llamada SHI-1 que en *S. flexneri* codifica para tres proteínas: las proteasas auto transportadoras Pic y slgA, y de la enterotoxina ShET1. Sin embargo, la SHI-1 no se encuentra en *S. dysenteriae* cepa 197, *S. boydii* cepa 227 y *S. sonnei* cepa 046 [Yang *et al.*, 2005].

En general, la virulencia de las especies de *Shigella* tienen el siguiente orden: *S. dysenteriae* > *S. flexneri* > *S. sonnei*. La falta de ShET1 y de los genes Pic, y SEPA en *S. sonnei* cepa 046 la hace menos virulenta que *S. flexneri*, ya que estos son probablemente determinantes en la fase diarreica de la infección [Yang *et al.*, 2005].

Los genomas de las cuatro especies de *Shigella* presentan elementos de inserción o IS (insertion sequence) que son probablemente la causa principal de muchos de los reordenamientos del genoma. Por ejemplo la secuencia de inserción denominada "IS1" en *S. flexneri* cepa 301, *S. sonnei* cepa 046 y *S. boydii* cepa 227, se asocia con reordenamientos de ADN [Yang *et al.*, 2005].

Por otra parte, dentro de los cuatro genomas de *Shigella* se ha estudiado que la delección y la presencia de pseudogenes son mecanismos eficaces para la pérdida de funciones, y la inactivación de genes, por ejemplo *ompT* cuya función es la reducción de la expresión de un gen llamado ICSEA, el cual codifica para una proteína de membrana, la cual es directamente responsable de la capacidad de la bacteria de moverse libremente en el citoplasma de la célula infectada, necesaria para la propagación intra e inter-celular de estas bacterias y *cadA* responsable de convertir la lisina a cadaverina han sido eliminados. Similar a este caso es la eliminación de la capacidad flagelar y la capacidad de fermentar lactosa [Yang et al., 2005].

En resumen, se menciona que los genomas de las *Shigella* comparten características con *E. coli*, proponiendo que han evolucionado de manera convergente implicando la ganancia y la pérdida de las funciones [Yang et al., 2005; Chung The et al., 2016].

2.2.5 Plásmido de virulencia

La información genética que constituyen los fenotipos de *Shigella* spp está codificada en el cromosoma bacteriano y en un gran plásmido de virulencia. Este plásmido es determinante para la virulencia de *Shigella* spp y codifica la maquinaria molecular necesaria para la invasión de tejidos [Sansonetti et al., 1982].

La secuenciación de los plásmidos de virulencia de diferentes cepas de *Shigella* ha revelado que éstos tienen un tamaño aproximado de 220 kb y contienen alrededor de 100 genes asociados [Jiang et al., 2005]. El plásmido es esencial en el proceso de invasión; las cepas que carecen de él son incapaces de promover su internalización, y cuando es transferido

experimentalmente a otras especies, se obtienen cepas transformadas capaces de ingresar a las células HeLa (línea celular de cáncer cérvico-uterino humano) [Maurelli *et al.*, 1985]. De acuerdo a esto, el plásmido de virulencia es fundamental en las siguientes funciones bacterianas:

- Producción de adhesinas e invasinas.
- Diseminación intercelular de la bacteria.
- Secreción de diversos factores de virulencia.

La región plasmídica que determina la entrada bacteriana a la célula hospedadora codifica para la síntesis de las proteínas Ipa (Invasion Plasmid Antigens), de su chaperón molecular IpgC y un sistema de secreción de las Ipa, conocido como Mxi-Spa (Membrane excretion of Ipa and surface presentation of Ipa) [Buysse *et al.*, 1987].

Las proteínas IpaA, IpaB, IpaC e IpaD son indispensables para la adherencia e invasión de *Shigella*; IpaD funciona como la adhesina primaria, en tanto que IpaB e IpaC actúan como invasinas [Ménard *et al.*, 1994].

El Mxi-Spa corresponde a un sistema clásico de secreción proteica tipo III; además, incluye la participación de IpgC, para estabilizar a IpaB e impedir que ésta interactúe con IpaC en el citoplasma bacteriano, ya que ello impediría el traslado y la exportación de ambas moléculas [Blocker *et al.*, 1999].

2.2.6 Patogenicidad

La mayoría de los conocimientos actuales sobre los mecanismos de patogenicidad de *Shigella* se derivan de estudios de *S. flexneri*. [Schroeder y Hilb, 2008], bacteria con la cual se han estudiado los mecanismos de patogenicidad.

El mecanismo de patogenicidad conlleva varias etapas, primero para que *Shigella* tenga acceso a la mucosa intestinal cruza el epitelio, dando su captación en las células M del colon, donde las bacterias son tomadas en un inicio por las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas) y posteriormente invaden los enterocitos, donde se liberan del fagosoma, se multiplican en citoplasma y diseminan a células adyacentes.

El sistema de secreción tipo III (TTSS por sus siglas en inglés), un sistema de translocación de proteínas conservado en bacterias patógenas Gram-negativas y que está codificado en plásmido, es un factor clave en la virulencia de *S. flexneri*. El TTSS se encarga, mediante sus proteínas efectoras, de los procesos de citotoxicidad de macrófagos, la invasión a enterocitos y la modulación de la respuesta inmune celular [Schroeder y Hilb, 2008].

Por su parte, las toxinas de Shiga (Stx) son una familia de proteínas estructurales y funcionalmente relacionadas que se expresan en *S. dysenteriae* serotipo 1 y en varios serotipos de *E. coli*; penetran los enterocitos e inhiben la síntesis proteica por inactivación catalítica de los ribosomas eucariotes, aunque también desencadenan apoptosis en diversos tipos celulares [Loughlin y Robins, 2001].

2.2.7 Identificación Microbiológica

El diagnóstico depende del aislamiento e identificación de la bacteria a partir de heces fecales. La bacteria *Shigella* permanece viable durante un tiempo limitado fuera del cuerpo humano, las muestras fecales deben ser tomadas en las primeras etapas de la enfermedad ya que es cuando por lo general se presentan en gran número, y preferiblemente antes de tomar algún antibiótico. El aislamiento se realiza en medios selectivos generalmente, para lo cual se utilizan medio MacConkey, Hektoen, agar Desoxicolato Citrato (DCA), Desoxicolato Xilosa Lisina [Niyogi, 2005].

Las especies de *Shigella* se clasifican de acuerdo al antígeno "O" en serotipos. Así mismo, se utilizan pruebas bioquímicas para la identificación de las especies. Las principales son uso de manitol, descarboxilación de ornitina y con frecuencia se incluye la producción de indol [Farmer et al., 1991]. Sin embargo, como se puede apreciar en la tabla 1, con estas pruebas no es posible diferenciar de manera precisa entre las cuatro especies.

Especie	Prueba de Manitol	Prueba Descarboxilación de Ornitina
<i>Shigella dysenteriae</i>	Negativo	Negativo
<i>Shigella sonnei</i>	Positivo	Positivo
<i>Shigella flexneri</i>	Positivo	Negativo
<i>Shigella boydii</i>	Positivo	Negativo*

*Con excepción de *S. boydii* serotipo 13

Tabla 1. Pruebas bioquímicas empleadas para la diferenciación entre especies de *Shigella* [Pupo et al., 2000]

Por otra parte, uno de los indicadores más importantes a considerar es la fermentación de lactosa, esto porque, *Shigella* spp. no la fermenta. Esta característica ha sido empleada para diferenciarla de algunas especies de *E. coli*. Sin embargo, algunos otros coliformes como la *E. coli* enteroinvasiva es muy similar a *Shigella spp.*, por lo que se necesita de una técnica más sensible y rápida para su detección, proponiéndose así una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), considerando genes específicos de estas bacterias [Niyogi, 2005].

2.2.8 Identificación Molecular

2.2.8.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) desarrollada por Kary Mullis en 1986 [Mullis, 1990], es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Esta técnica se caracteriza por ser de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, generando resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. Por ello, se ha convertido en el método de elección para los estudios genéticos y de biología molecular, incluso es una técnica que nos permite diferenciar entre especies de un mismo género, ya que podemos utilizar genes específicos de cada cepa que nos ayuden a diferenciarlas entre si [Tamay *et al.*, 2013].

En la PCR, mediante una reacción enzimática se amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa termoestable, que proviene de una bacteria termófila "*Thermus aquaticus*", la cual vive en

condiciones altas de temperatura (79°C- 85°C), es por ello que tiene capacidad de mantener su funcionalidad a elevadas temperaturas considerándola como una enzima termoestable [Tamay *et al.*, 2013].

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima, los iniciadores, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg⁺), además de una solución amortiguadora o buffer, este último provee el ambiente fisicoquímico óptimo para la actividad enzimática [Tamay *et al.*, 2013].

Las etapas principales de las que se compone la PCR son: (Figura 2)

- a) **Desnaturalización:** En esta etapa la temperatura se eleva hasta 95°C durante 20-30 segundos logrando así la separación de las cadenas de ADN. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.
- b) **Alineamiento:** En esta etapa, los iniciadores se alinean al extremo **3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria**. Para que se forme el complejo templado-iniciadores, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima, para obtener una mayor estabilidad y especificidad, la cual va a depender del par de iniciadores, ésta generalmente oscila entre 50-60 °C.
- c) **Amplificación:** En esta etapa, la ADN polimerasa termoestable actúa sobre el complejo templado-iniciadores y empieza su función **catalítica; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN**. La extensión de las cadenas es en dirección de **la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'**. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) del templado.

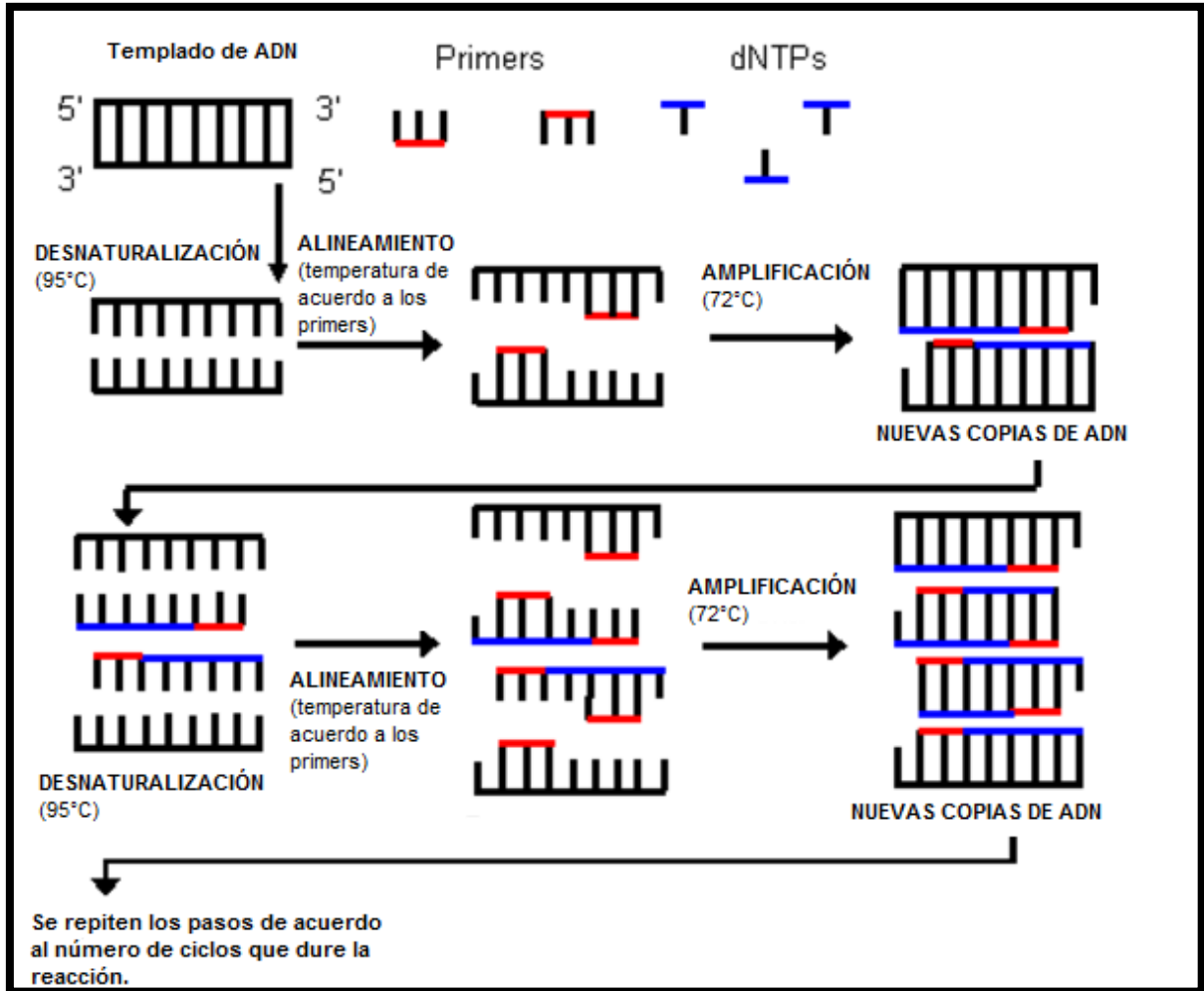


Figura 2. Etapas de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Disponible en <https://www.quora.com>

La amplificación de la secuencia blanco de interés o también llamado amplicón se corrobora mediante geles de agarosa a través de una electroforesis (Figura 3), la cual consiste en la separación de las moléculas de ácidos nucleicos mediante un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica, esta separación se hace utilizando buffer TAE o TBE, para el caso de los ácidos nucleicos, los cuales están cargados negativamente por el grupo fosfato que poseen, durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. El porcentaje del gel de agarosa depende del tamaño de los amplicones esperados se utilizará una concentración de

agarosa mayor o menor para obtener poros menos o más grandes y una mejor resolución de las bandas. Si no se conoce el tamaño, se puede empezar con agarosa al 1%, pero si se conoce, se puede utilizar la siguiente guía, que nos muestra el porcentaje de agarosa a utilizar de acuerdo al tamaño de producto de PCR esperado. Fuente: Tomado de Sosnick, 2003.

Rango efectivo de separación (kb)	Agarosa (%)
30-1	0.5
12- 0.8	0.7
10-0.5	1.0
7- 0.4	1.2
3-0.2	1.5

Por otro parte, para poder visualizar el amplicón se utiliza bromuro de etidio el cual se intercala en la molécula de ADN y al ser excitado con luz UV emite una señal permitiendo así la visualización de los amplicones en forma de bandas con el tamaño esperado, de igual forma se pueden utilizar otros intercalantes como el SYBR para lograr la visualización de las bandas [Lee *et al.*, 2012].

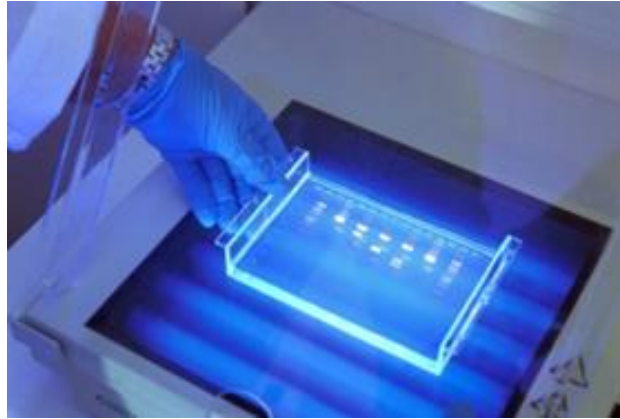


Figura 3. Ejemplo de visualización de los productos de PCR en gel de agarosa.

Fuete. promegabiotechiberica.es. Consultado 21/septiembre/2016.

Tipos de PCR

- a) **PCR múltiple.** Es un método en el cual se incluye a más de un par de cebadores en la mezcla de PCR, obteniéndose de esta forma más de un producto de amplificación específico en una sola reacción (Figura 4). Desde su inicio (1988) este método ha sido exitosamente aplicado a numerosas áreas como la identificación de patógenos, análisis mutaciones, detección de RNA y estudios forenses [Liu *et al.*, 2008].

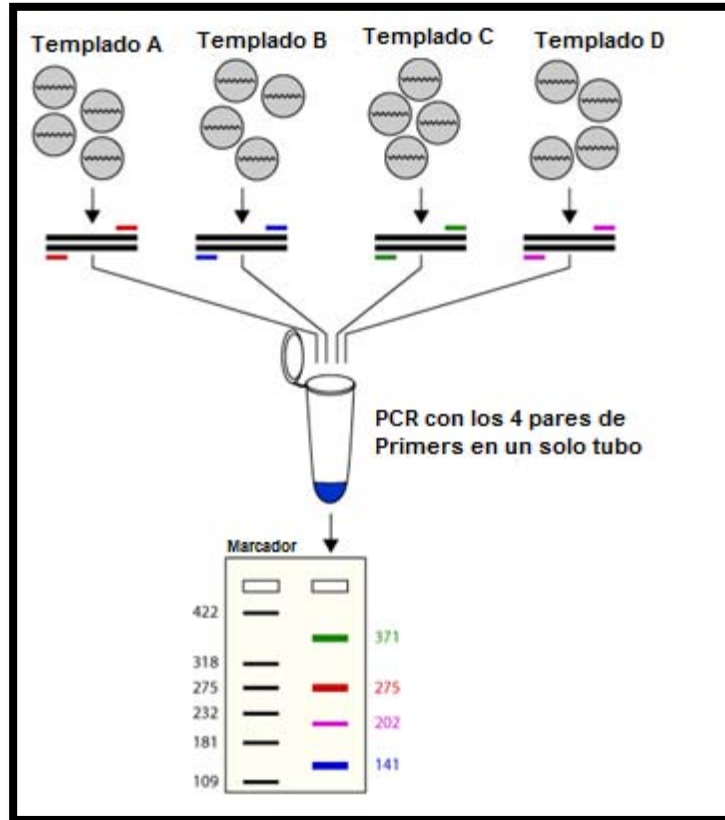


Figura 4. PCR múltiple. En este tipo de reacción se utilizan múltiples cadenas molde con varios conjuntos de iniciadores en el mismo tubo de reacción. Fuente. <http://www.premierbiosoft.com>

b) **PCR cuantitativa o tiempo real.** Detecta y cuantifica las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. Existen métodos no específicos y específicos:

-No Específico: Utiliza moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente (Figura 5). La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. El reportero más usado para estos fines se llama SYBR Green [Zipper *et al.*, 2004].

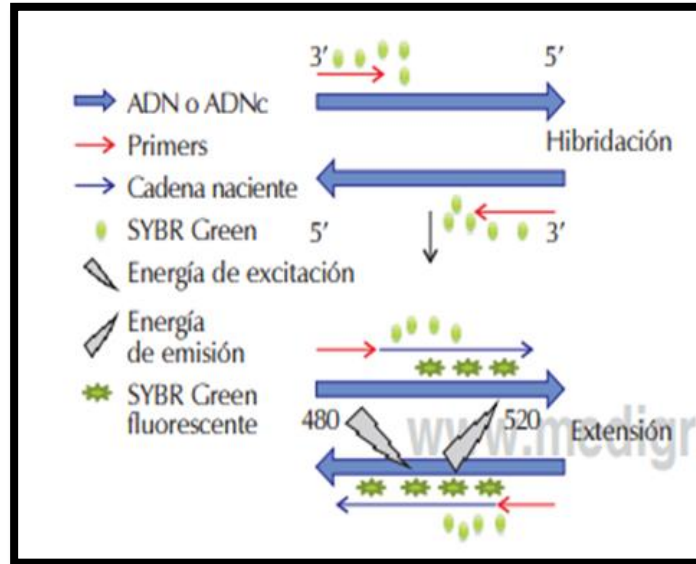


Figura 5. Método no específico. El SYBR Green está unido al ADN de doble cadena, es excitado a una longitud de onda de 480 nm con una longitud de onda de emisión de 520 nm [Tamay et al., 2013].

- Específico: Estos métodos siguen el principio conocido como «transferencia de energía de resonancia fluorescente» (FRET, por sus siglas en inglés) para generar la señal; este método consiste en transferir energía desde un donador o reportero fluorescente a un aceptor o “quencher”.

En el método específico existen 2 tipos de pruebas por hidrólisis y por hibridación: El método por **Hidrólisis** se basa en sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente y un “quencher”, ambos se encuentran en estrecha unión mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco, cuando ocurre la hibridación, se dan cambios conformacionales en el reportero y el “quencher”, permitiendo que la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa rompa esta unión, logrando que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo (Figura 6). Un ejemplo son las sondas comerciales TaqMan [Livak *et al.*, 1995].

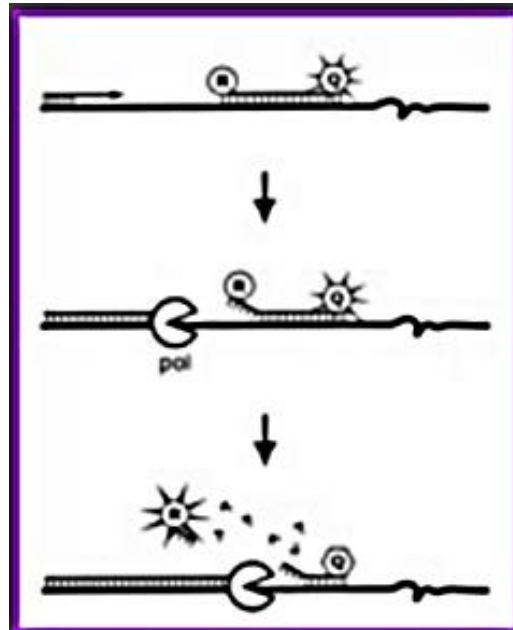


Figura 6. Método específico. Utilización de sondas TaqMan, la longitud de onda va a depender del fluoróforo seleccionado para la sonda. Fuente <http://slideplayer.es/slide/5304321/>. Consultado 21/Septiembre/2016.

Por otra parte, el método por **Hibridación** consiste en una sonda unida a un reportero fluorescente que está en estrecha proximidad con un aceptor fluorescente unido a otra sonda. Tanto el reportero como el aceptor presentan un espectro de excitación y de emisión similar, de tal forma que cuando las dos sondas hibridan a su templado blanco, el reportero es excitado y la señal emitida es transferida al aceptor, generando un incremento en la cantidad de fluorescencia (Figura 7). Un ejemplo de este método son las sondas moleculares Beacons [Tyagi y Kramer, 1996].

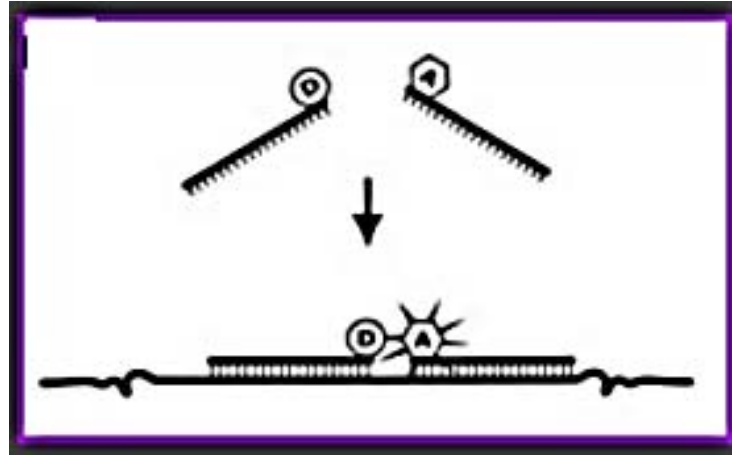


Figura 7. Método Específico. Utilización de sondas de hibridación, la longitud de onda va a depender del fluoróforo seleccionado para las sondas. Fuente <http://slideplayer.es/slide/5304321>

2.2.8.2 Secuenciación

En los inicios de la secuenciación, la obtención de una secuencia de un fragmento de 5 o 10 nucleótidos resultaba un proceso muy costoso y complicado, hoy en día los avances científicos y tecnológicos nos permiten tener una gran cantidad de secuencias con información de importancia médica, ecológica, fisiológica y evolutiva [Márquez *et al.*, 2004].

En 1977 surgen dos técnicas modernas de secuenciación de ADN: La primera se trataba de una secuenciación química propuesta por Maxam y Gilbert, en la cual el primer paso era llevar a cabo la desnaturalización de **la cadena de ADN, posteriormente se marcaba el extremo 5' con fosforo radiactivo (^{37}P)** y la muestra era dividida en cuatro alícuotas las cuales eran tratadas con diferentes reactivos químicos; estos cortaban al ADN en bases específicas (A, T, C, G), por lo que en cada alícuota quedaban fragmentos de ADN de diferente tamaño que terminaban en una base específica. Los fragmentos posteriormente se separaban

Sin embargo, el método que revolucionó a la biología molecular fue la secuenciación enzimática de Sanger, la cual se basa en la interrupción controlada de la replicación del ADN *in vitro*. Para el desarrollo de este tipo de secuenciación primero, se realiza una reacción con el fragmento que se va a secuenciar, en esta reacción se lleva a cabo la síntesis de ADN a partir del templado, a diferencia de una PCR convencional, se utiliza un solo iniciador y se agregan dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con radioactividad o con fluoróforos y que a su vez carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3', al no contener el grupo hidroxilo en el extremo 3', la polimerasa es incapaz de incorporar un nucleótido más. Cuando se incorpora un dideoxinucleótido a la cadena en elongación, se termina su amplificación, de tal manera que al final, se tienen fragmentos de diferente longitud, cada uno terminando en un ddNTPs (Figura 9).

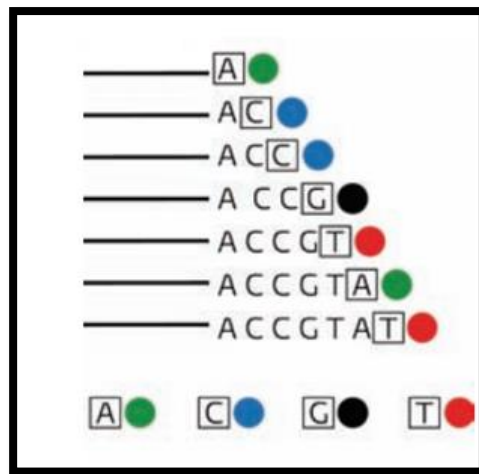


Figura 9. Fragmentos de ADN obtenidos después de la reacción de secuenciación. Se observan diferentes tamaños que terminan en una base marcada con un fluoróforos distintos [Márquez *et al.*, 2004].

Los fragmentos obtenidos, se separan y analizan electroforéticamente de manera manual o automática (Figura 10).

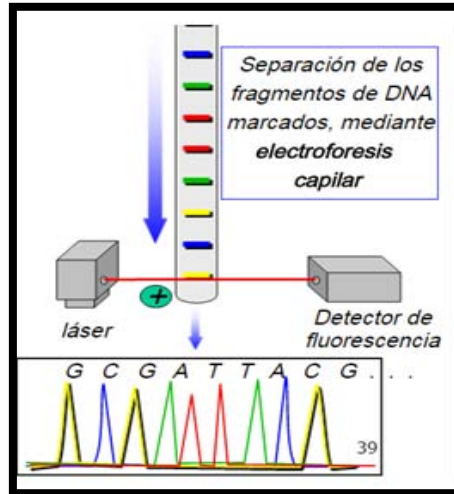


Figura 10. Separación de los productos de PCR de secuenciación mediante electroforesis. Los fragmentos migran de acuerdo a su tamaño, el fluoróforo con el que están marcados es detectado por el equipo, el cual lo representa esta señal en forma de un pico en un electroferograma. Fuente <http://slideplayer.es>.

Actualmente se ha desarrollado la Secuenciación de Nueva Generación (NGS Next Generation Sequencing, por sus siglas en inglés) una tecnología de secuenciación de ADN que ha revolucionado la investigación genómica, tan solo un ejemplo es que utilizando NGS se ha llegado a la secuenciación del genoma completo del ser humano. Sin embargo, hoy en día la secuenciación tipo Sanger continúa vigente en la clínica habitual y muchas más aplicaciones [Behjati y Tarpey, 2013].

2.3 ANTECEDENTES PARTICULARES

2.3.1 Epidemiología en México

En 2001, la Secretaría de Salud (SS) informó que las enfermedades gastrointestinales, ocasionadas por bacterias o parásitos, ocupaban la decimocuarta causa de fallecimientos a nivel nacional y que los estados con mayor incidencia eran: Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla, y el Distrito Federal [Hernández *et al.*, 2011].

En México, a través de un estudio gubernamental realizado en 2003 se reportaron 4556 decesos causados por infecciones intestinales [Paniagua *et al.*, 2007].

Dentro de estos casos la shigelosis es una enfermedad endémica en los climas tropicales y templados y en México la más frecuente es *S. flexneri*, con 60 % de aislamientos con serotipo 2a [Hernández *et al.*, 2011].

Paniagua y colaboradores encontraron una prevalencia de *Shigella* con 2.6 %, correspondiendo 1.6 % a *S. flexneri* y 1% a *S. sonnei* a los estudios realizados con muestras diarreicas de infantes y preescolares [Paniagua *et al.*, 2007].

En la gráfica 1 se muestran los datos de casos de shigelosis desde 2000 hasta 2008, en donde se observa una disminución de los mismos, pero esto no significa que el número de infecciones sea bajo, ya que continúan sobrepasando los 10 000 casos [Hernández *et al.*, 2011]

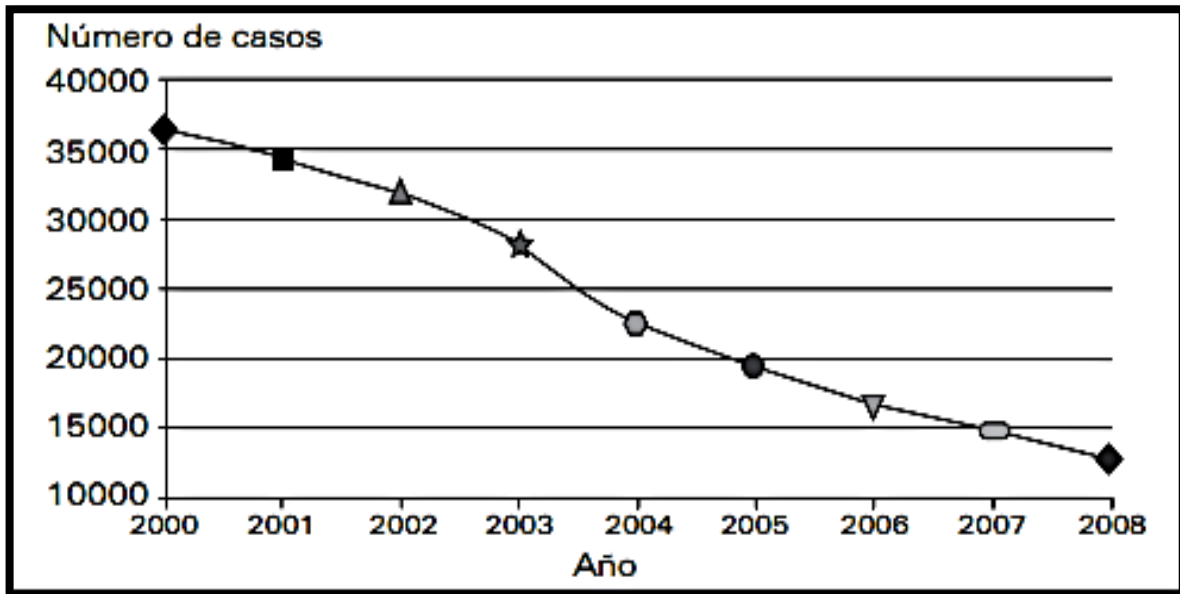


Gráfico 1. Distribución de casos de Shigelosis por año, de 2000 a 2008. Gráfica generada con datos obtenidos del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SS [Hernández *et al.*, 2011].

De acuerdo al boletín epidemiológico de la Secretaría de Salud del InDRE hasta la semana 30 del año 2016 se han presentado un total de 2,245 casos de disentería en el país, siendo Guerrero, Chiapas y Oaxaca los estados con el mayor número de casos (Tabla 2).

ENTIDAD FEDERATIVA	Shigelosis CIE-10ª REV. A03			
	Sem.	2016		2015
		Acum.		Acum.
		M	F	
Aguascalientes	1	16	18	11
Baja California	-	6	10	20
Baja California Sur	-	4	3	6
Campeche	2	17	15	59
Coahuila	-	15	11	21
Colima	-	1	3	8
Chiapas	23	141	217	482
Chihuahua	1	9	6	33
Distrito Federal	2	20	9	23
Durango	-	18	9	16
Guanajuato	-	8	6	31
Guerrero	16	204	258	581
Hidalgo	1	4	5	7
Jalisco	-	38	57	67
México	1	42	69	101
Michoacán	1	5	7	38
Morelos	-	3	5	12
Nayarit	-	14	12	56
Nuevo León	-	11	14	21
Oaxaca	6	126	156	238
Puebla	1	59	60	175
Querétaro	-	4	4	22
Quintana Roo	-	7	12	13
San Luis Potosí	-	13	19	47
Sinaloa	-	7	7	20
Sonora	-	18	36	23
Tabasco	-	61	79	140
Tamaulipas	2	30	50	80
Tlaxcala	-	4	4	13
Veracruz	1	23	39	79
Yucatán	-	41	45	48
Zacatecas	4	15	16	38
TOTAL	62	984	1 261	2 529

Tabla 2. Casos por entidad federativa de Shigelosis hasta la semana epidemiológica 30 del 2016. FUENTE: SINAVE/DGE/Salud 2016.

2.3.2 Relación entre *Shigella* y *Escherichia coli*

Las especies de *Shigella* y *E. coli* se encuentran estrechamente relacionadas, porque las dos pertenecen a la familia de las enterobacterias. Fenotípicamente comparten muchas características; mientras que genotípicamente se han considerado como la misma especie [Brenner *et. al.*, 1973; Lukjancenko *et. al.*, 2010].

Debido a esta estrecha relación ha sido difícil la diferenciación de estas bacterias, así mismo mediante estudios filogenéticos se han mostrado que entre estas bacterias hay una estrecha relación, sin embargo existen complicaciones en el diagnóstico, para las variantes de *E. coli* denominadas como "inactivas" (inmóviles, no fermentan la lactosa y no son productoras de gas) como lo es *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), esta cepa al presentar pruebas bioquímicas muy similares a las especies de *Shigella*, llevó a un diagnóstico erróneo. La explicación de la similitud en las características fenotípicas, ha sido mediante convergencia evolutiva, es decir, se plantea que éstas evolucionan a partir de ancestros distintos, sin embargo, sus semejanzas se deben a similares constricciones evolutivas en las cuales las bacterias se han desarrollado [Pupo *et. al.*, 2000]. Sin embargo otros autores plantean que posiblemente *Shigella* ha evolucionado a partir de diferentes genomas de *E. coli* por cual comparten muchas características [Yang *et al.*, 2005].

Por ello, actualmente se han desarrollado métodos moleculares avanzados, como la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal y la espectrometría de masas para la tipificación de las especies de *Shigella* y *E. coli* [Khot *et. al.*, 2012].

Además de la confusión en la identificación precisa de estas bacterias, **algunos antígenos "O" presentes en *Shigella*** son idénticos a los encontrados en *E. coli* [Liu *et. al.*, 2008]. La serotipificación es el método estándar más empleado para la determinación de las especies de *Shigella*, pero la reactividad cruzada entre los aislados de *Shigella* y los de *E. coli* pueden confundir los resultados [Lefebvre *et. al.*, 1995].

Aunado a esto, los síntomas clínicos a menudo tampoco se pueden diferenciar entre una infección causada por *Shigella* spp y una causada por *E. coli* o distinguir entre las causadas por las diferentes especies de *Shigella* [Johnson, 2000].

3.0 JUSTIFICACIÓN

La bacteria *Shigella* spp. es responsable de casos graves de Shigellosis, enfermedad altamente transmisible y que causa alrededor de cerca de 165 millones de casos de disentería grave al año. La identificación y diferenciación de las especies de *Shigella* debe realizarse de una manera rápida y precisa para evitar un diagnóstico erróneo.

Por otra parte, ya que *Shigella* y *E. coli* presentan características genotípicas y fenotípicas similares se llega a establecer que se trata de la misma bacteria.

Por lo antes mencionado, en el presente trabajo se realizó la identificación de marcadores moleculares para el desarrollo de una metodología que logre la identificación y diferenciación de *Shigella* spp y *E. coli*, así como para las especies de *S. flexneri* y *S. sonnei*, cepas de *Shigella* aisladas con mayor frecuencia en el mundo, siendo *S. sonnei* la más aislada en México. Esta metodología nos permitirá realizar un diagnóstico oportuno con mayor especificidad y sensibilidad para el SENASICA, protegiendo al país de las enfermedades causadas por estas bacterias, además de reducir los riesgos que puedan afectar a productores y consumidores.

4.0 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar marcadores moleculares para la diferenciación de las especies de *Shigella* para el desarrollo de una metodología que permita la discriminación de estas cepas bacterianas de manera rápida y específica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Buscar genes que permitan la diferenciación entre *Shigella* spp. y *E. coli*.
- Obtener genes específicos mediante un análisis de genómica comparativa que permitan la diferenciación de las especies de *Shigella* spp.
- Desarrollar y estandarizar una PCR multiplex para diferenciar *Shigella* spp de *E. coli*.
- Desarrollar y estandarizar una PCR multiplex para diferenciar las especies de *S. flexneri* y *S. sonnei*.
- Realizar el ensayo mediante PCR tiempo real obteniendo una mayor sensibilidad y especificidad.
- Realizar la secuenciación de los productos obtenidos para verificar la identidad de los mismos.

5.0 HIPÓTESIS

Si se desarrolla una metodología basada en genes específicos de las diferentes especies de *Shigella* spp., entonces se podrá realizar la discriminación entre las especies *de E. coli*, *S. flexneri* y *S. sonnei*, además de lograr una tipificación rápida y específica.

6.0 METODOLOGÍA

6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental seguida para cumplir con los objetivos planteados (Esquema 1) comenzó con la búsqueda bibliográfica y un análisis de genómica comparativa (PANGENOMA), con el objetivo de encontrar genes específicos, los cuales son marcadores moleculares, que además de utilizarse para localizar y aislar genes de interés en un organismo, sirven para la identificación de los mismos.

La identificación y diferenciación de las cepas de *Shigella* spp., así como de *E. coli* se utilizaron genes *ipaH* y *lacY*; con los cuales se realizó el diseño de iniciadores los cuales se probaron de manera individual mediante una reacción en cadena de la polimerasa *in silico*, así mismo se realizó una búsqueda mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [Altschul et al., 1997] de alineamientos locales con el objetivo de probar su especificidad, una vez comprobado que los genes eran específicos para la identificación y diferenciación, se procedió a la realización del ensayo en el laboratorio.

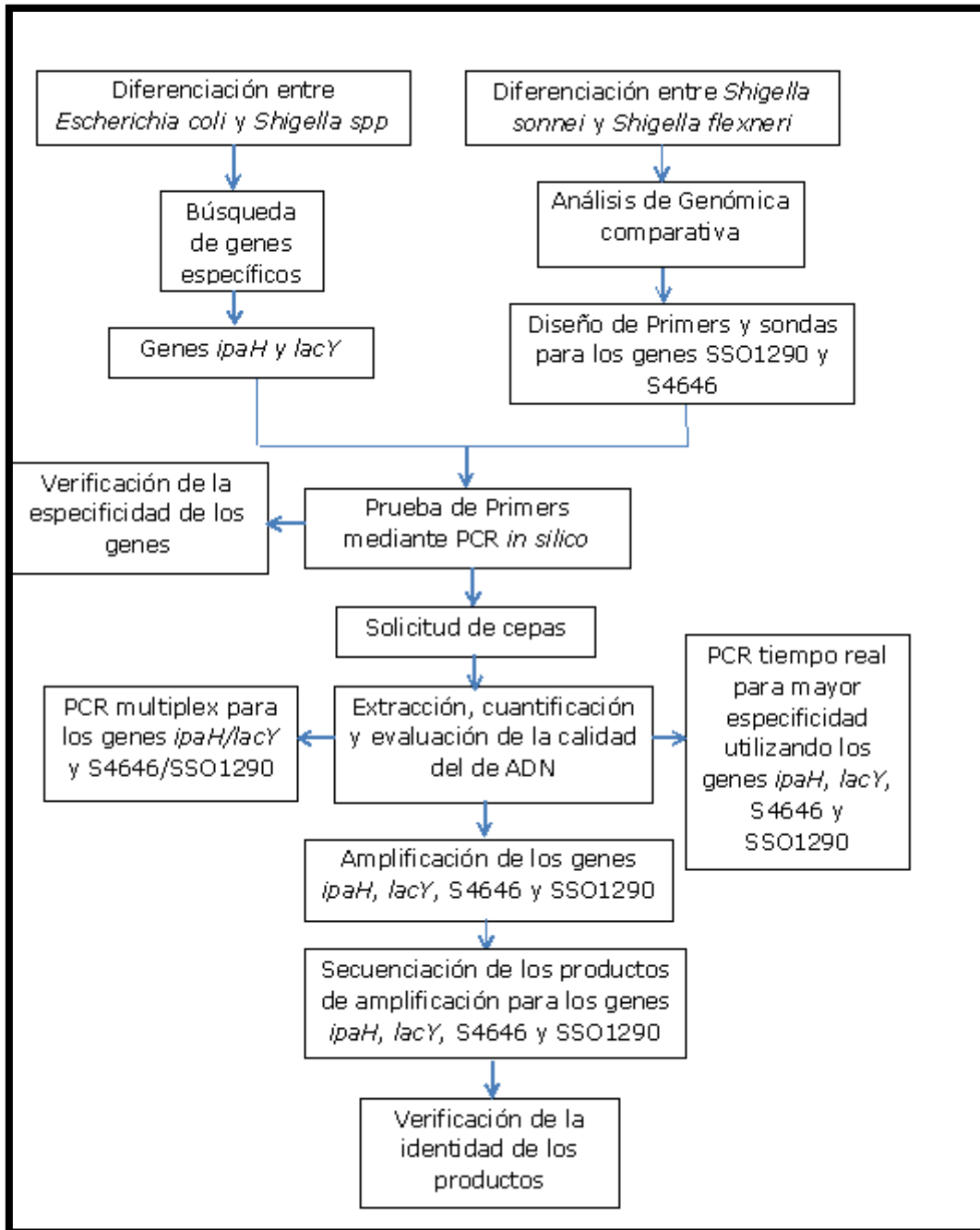
La solicitud de las bacterias *E. coli*, *S. flexneri* y *S. sonnei* se realizó al Laboratorio de Diagnóstico para la Detección Organismos Patógenos (LDDOP) del SENASICA. Con estas cepas se les realizó la extracción de ADN, verificando pureza y concentración por métodos espectrofotométricos y flourométricos.

Posteriormente se realizó la identificación y diferenciación entre las cepas bacterianas con los genes *IpaH* de *Shigella spp.* y *lacY* de *E. coli*, de igual manera con los genes SSO1290 de *S. sonnei* y S4646 de *S. flexneri* mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final, que

posteriormente nos sirvieron para estandarizar 2 reacciones de PCR tipo multiplex, la primera para diferenciar *Shigella* spp y *E. coli* y la segunda para diferenciar *S. sonnei* y *S. flexneri*.

Así mismo, con el objetivo de mejorar la especificidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados con los genes de interés se realizó un ensayo de PCR tiempo real (qPCR).

Finalmente se llevó a cabo la secuenciación de los productos obtenidos mediante PCR punto final verificando la identidad de los genes. El esquema 1 muestra la metodología llevada a cabo para la realización del proyecto.



Esquema 1. Estrategia experimental llevada a cabo para el desarrollo de una PCR tipo multiplex que nos ayude a la identificación de las especies de

6.2 MATERIALES

6.2.1 Material Biológico

El SENASICA cuenta con el Laboratorio de Diagnóstico para la Detección Organismos Patógenos, el cual proporcionó las cepas que se utilizaron en este proyecto, las cuales fueron proporcionadas en microtubos con 2 mL de suspensión bacteriana en caldo BHI (Brain Heart Infusion):

Shigella flexneri

Shigella sonnei

Escherichia coli O103:H25

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli O11

Escherichia coli O18ab:H14

Escherichia coli O73:H16

Escherichia coli O26:H11

Escherichia coli O121:H19

Escherichia coli O111cc:H8

Escherichia coli O157:H7

Escherichia coli O55:H7

Escherichia coli O121:H19

Escherichia coli O103:H2

Escherichia coli O145:H34

6.2.2 Software

El software utilizado para los análisis bioinformáticos se mencionan a continuación:

MicroScope v.2.6 para el análisis de genómica comparativa; Primer3 Input v0.4.0 diseño de iniciadores; BLASTn-NCBI búsqueda de homología; In silico PCR amplification análisis de PCR *in silico* para probar la especificad de los iniciadores; OligoAnalyzer 3.1 para el análisis de propiedades fisicoquímicas de los iniciadores y diseño de sondas; BioEdit v7.2.5 para alineamientos de secuencias; Chromas v2.6 para visualización de los electroferogramas obtenidos de la secuenciación.

6.3 MÉTODOS

6.3.1 Búsqueda de genes en base de datos *Shigella* Data base

La búsqueda de genes específicos se realizó en la base de datos ShiBASE, [Yang et al., 2005], dentro de la tabla de genes de virulencia, observando que algunos de estos no se comparten entre especies. La secuencia de los genes se descargó en formato FASTA y con esto se realizó el desarrollo y diseño de iniciadores.

6.3.2 Análisis de Pangenoma

El análisis de *Pangenoma* se realizó en servidor MicroScope [Vallenet et al., 2013] con la función "*comparative genome*" utilizando los genomas *S. flexneri* serotipo 5 cepa 8401, *S. dysenteriae* cepa Sd197, *S. boydii* cepa SB227, *S. sonnei* cepa Ss046 y *S. flexneri serotipo 2a* cepa 2457T, presentes dentro de la base de datos del servidor. Esto con el objetivo de obtener los genes únicos para cada una de las especies de *Shigella*; esta herramienta proporcionó en formato FASTA los genes que forman el *core* del genoma.

6.3.3 Diseño de iniciadores y sondas

Una vez teniendo la secuencia de genes específicos obtenidos por las dos estrategias anteriores, se realizó un diseño de iniciadores en el servidor Primer 3 (versión 0.4.0) [Untergrasser *et. al.*, 2012] para las diferentes especies de *Shigella*, considerando los parámetros que se mencionan en la Tabla 3, además de verificar que no formen dímeros entre iniciadores del mismo par, así como la inexistencia de autocomplementariedad.

Parámetro	Mínimo	Óptimo	Máximo
Tamaño	18 pb	20 pb	27 pb
T_m*	58 °C	59 °C	60 °C
% GC	40	-	60

*Se considera una diferencia máxima de 1 °C entre las T_m y la tabla de parámetros termodinámicos de SantaLucia, 1998.

Tabla 3. Parámetros utilizados para el diseño de iniciadores

El diseño de sondas se realizó en el servidor OligoAnalyzer 3.1, las cuales se encontraron dentro del producto de amplificación obtenido con los iniciadores diseñados; en su diseño se tomaron las siguientes consideraciones: tamaño del amplicón donde se encuentra la sonda <250 pb, longitud 15- 30 pb, T_m 60-66 °C, contenido de G/C 35 %-60 %, se verificó que no formaran estructuras secundarias (Hairpins, dímeros). Los fluoróforos se seleccionaron de acuerdo a su compatibilidad con el equipo LightCycler® 480 Roche, así como de la longitud de emisión y absorción verificando que no exista traslape entre estas.

6.3.4 Extracción de ADN

La extracción del material genético se realizó con el kit High Pure PCR template Preparation de ROCHE a partir de 2 mL del cultivo celular en caldo BHI, el pellet celular se concentró mediante centrifugación a 13000 ± 10 rpm durante aproximadamente 5 min, el sobrenadante se eliminó para resuspender el pellet en 500 ± 10 μ L de agua libre de nucleasas, nuevamente se concentró el pellet mediante centrifugación a 13000 ± 10 rpm durante aproximadamente 5 min, se eliminó el sobrenadante y se suspendió el pellet en 200 ± 10 μ L de buffer PBS posteriormente se adicionó lisozima (10 mg/mL), se mezcló con vórtex e incubó a 37 ± 2 °C (15 min/300 rpm).

Posteriormente se adicionaron 200 ± 10 μ L de buffer de unión y 40 ± 5 μ L de proteínasa K, se mezcló con vórtex e incubó a 70 ± 2 °C (10 min/300 rpm); transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 100 ± 10 μ L de isopropanol y mezcló con vórtex durante 10 s.

El líquido se transfirió a la columna High Pure Filter Tube colocada en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó a 8000 ± 50 rpm durante aproximadamente 1 min, se desechó el tubo colector con el sobrenadante y se colocó la columna en un tubo colector nuevo de 2 mL.

Posteriormente se adicionaron 500 μ L de buffer de remoción de inhibidores y centrifugó a 8000 ± 500 rpm/1 min, se desechó el tubo colector con el sobrenadante y se colocó la columna en un tubo colector nuevo de 2 mL, se adicionaron 500 ± 10 μ L de buffer de lavado y centrifugó a 8000 ± 50 /1 min, este último paso se realizó 2 veces.

El tubo colector se desechó y la columna se colocó en un microtubo nuevo de 1.5 mL, se adicionaron 100 μ L de buffer de elución (previamente

calentado 70 ± 5 °C) en el centro de la columna sin tocarla y centrifugó a $8\ 000 \pm 50$ rpm/ 1min.

La columna se desechó y rotulo el microtubo que contenía el ADN extraído el cual se almacenó en congelación.

La cuantificación del ADN se realizó mediante una técnica espectrofotométrica utilizando el equipo Nanodrop 2000 de la marca Thermo Scientific®, el cual reportó la relación 260/280 y así verificar la pureza de la muestra. Por otra parte, se cuantificó mediante fluorimetría utilizando el equipo Qubit 2.0 de la marca invitrogen® para obtener la cantidad específica de ADN de doble cadena

6.3.5 PCR punto final genes *lacY*, *ipaH*, S4646 y SSO1290.

La amplificación de los fragmentos pertenecientes a los genes *lacY* e *ipaH* se realizó con el Kit comercial Taq DNA polimerasa de ROCHE, la secuencia de los iniciadores y cantidades utilizadas en la mezcla de reacción se detallan en la Tabla 4.

INICIADORES		
Gen	Sentido	Secuencia (5'-3')
<i>lacY</i> (<i>E. coli</i>)	Sentido	CTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGA
	Antisentido	ACCAGACCCAGCACCAGATAAG
<i>ipaH</i> (<i>Shigella</i> spp)	Sentido	TCGATAATGATACCGGCGCTC
	Antisentido	CTGCGAGCATGGTCTGGAA
MEZCLA DE REACCIÓN		
Reactivo		Cantidad
Buffer 10x (1.5 mM MgCl ₂)		5 µL
Iniciadores (10 µM)		1.5 µL c/u
dNTP's (10 mM)		1 µL
Taq DNA polimerasa (5u/µL)		0.25 µL
ADN genómico (1 ng/µL)		2 µL
Agua grado biología molecular		Ajustar al vol. Final
Volumen final		50 µL

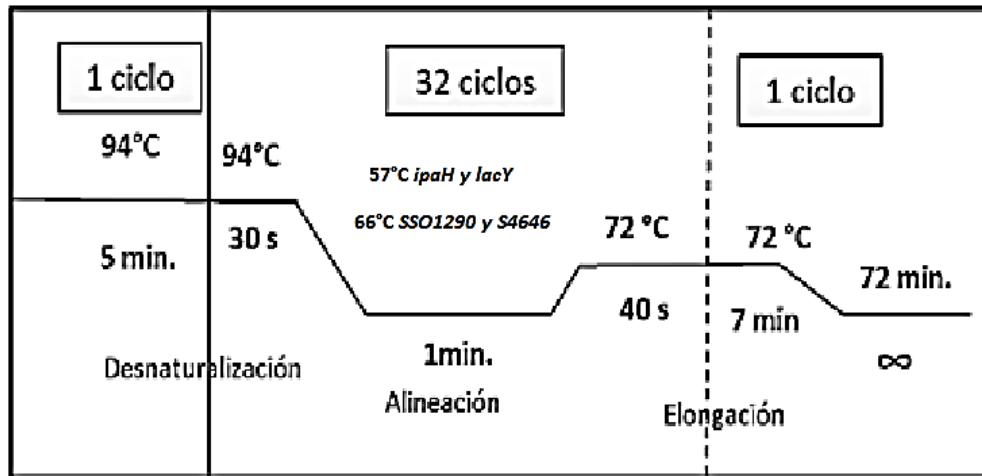
Tabla 4. Secuencia de iniciadores y mezcla de reacción utilizados en la PCR punto final para la identificación de *Escherichia coli* y *Shigella* spp.

La amplificación de los genes S4646 y SSO1290 se realizó utilizando el kit comercial Fast Start Taq DNA polimerasa de ROCHE, la secuencia de los iniciadores y cantidades utilizadas en la mezcla de reacción se detallan en la Tabla 5.

INICIADORES		
Gen	Sentido	Secuencia (5'-3')
S4646 (<i>S. flexneri</i>)	Sentido	TGCTGGTTACGGGGCCAGCTTACA ACT
	Antisentido	AGGGCTCATGTACGGCCTCATGCACA
SSO1290 (<i>S. sonnei</i>)	Sentido	CAGCGAGCCAACGGCCGAGTATCAAA
	Antisentido	AGCCACTCAGCATCATCGGCCAGACCA
MEZCLA DE REACCIÓN		
Reactivo		Cantidad
Buffer (10x)		5 µL
MgSO ₄ (50 mM)		1.5 µL
Iniciadores (10 µM)		1.5 µL c/u
dNTP's (10 mM)		1 µL
Taq DNA polimerasa (12 u/µL /µL)		0.4 µL
ADN genómico (1 ng/µL)		2 µL
Agua grado biología molecular		Ajustar al vol. Final
Volumen final		50 µL

Tabla 5. Secuencia de iniciadores diseñados para la identificación de las especies de *S. sonnei* y *S. flexneri*

La mezcla de reacción se colocó en el termociclador punto final (GENEAMP® SYSTEM 9700) utilizando las condiciones descritas en el esquema 2.



Esquema 2. Condiciones para la PCR de los fragmentos para los genes *lacY*, *ipaH*, *SSO1290* y *S4646*.

El tamaño aparente del fragmento se determinó en geles de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio, las condiciones utilizadas en la cámara de electroforesis fueron: 115 v, 300 mA durante 1 h 30 min. Posteriormente para verificar el tamaño exacto de los productos de amplificación se realizó una electroforesis de microfluidos en el equipo Bioanalizador Agilent 2000 siguiendo la metodología del fabricante (apéndice 1).

6.3.6 PCR multiplex

La PCR tipo multiplex, se realizó con el objetivo de realizar una rápida y fácil identificación de las cepas bacterianas en estudio.

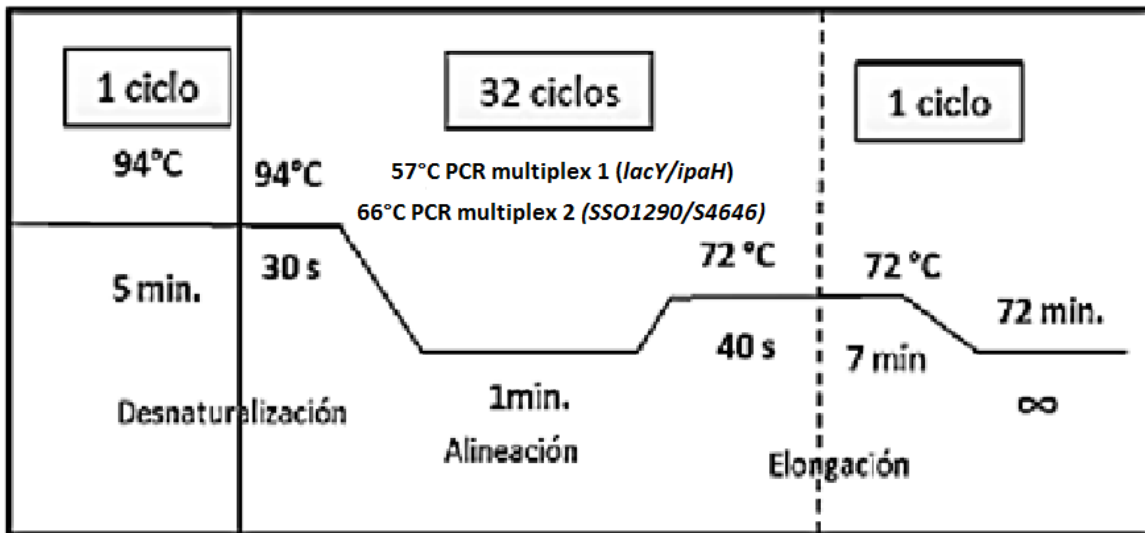
A partir de las condiciones de amplificación previamente descritas en el apartado 6.3.5, se estandarizaron dos reacciones en cadena de la polimerasa tipo multiplex, la primera nos permitió diferenciar entre *E. coli*

y *Shigella* spp, mientras que la segunda no permitió diferenciar entre las especies de *S. flexneri* y *S. sonnei*. El ensayo de amplificación se realizó empleando el kit Fast Start Taq DNA polimerasa de ROCHE, con las cantidades descritas en la Tabla 6.

MEZCLA DE REACCIÓN	
Buffer 10x	5 μ L
MgSO ₄ (50 mM)	1.5 μ L
Iniciadores A (10 μ M)	1.5 μ L c/u
Iniciadores B (10 μ M)	1.5 μ L c/u
dNTP's (10 mM)	1 μ L
Taq DNA polimerasa (12 u/ μ L / μ L)	0.4 μ L
ADN genómico 1 (1 ng/ μ L)	2 μ L
ADN genómico 2 (1 ng/ μ L)	2 μ L
Agua grado biología molecular	Ajustar al vol. Final
Volumen final	50 μL

Tabla 6. Detalle de las cantidades utilizadas en la mezcla de reacción para la estandarización de la PCR tipo multiplex.

La reacción se colocó en el termociclador punto final (GENEAMP® SYSTEM 9700) utilizando las condiciones descritas en el esquema 3.



Esquema 3. Condiciones para la PCR tipo multiplex. En el esquema se describe la temperatura de alineamiento utilizada para las 2 reacciones estandarizadas; PCR multiplex 1 (*lacY/ipaH*) 57°C; PCR multiplex 2 (SSO1290/S4646) 66°C.

El tamaño aparente del fragmento se determinó en geles de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio, las condiciones utilizadas en la cámara de electroforesis fueron: 115 v, 300 mA durante 1 h 30 min. Posteriormente para verificar el tamaño exacto de los productos de amplificación se realizó una electroforesis de microfluidos en el equipo Bioanalizador Agilent 2000 siguiendo la metodología del fabricante (apéndice 1).

6.3.7 PCR tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real fue realizada en el equipo LightCycler® 480 de la marca Roche, para esto se preparó la mezcla de reacción descrita en la Tabla 7, para realizar la detección de los genes *ipaH* (*Shigella* spp), *lacY* (*E. coli*), SSO1290 (*S. sonnei*) y S4646 (*S. flexneri*) obteniendo una

mayor especificidad y sensibilidad, se realizaron dos ensayos los cuales se describen a continuación:

Ensayo 1: Se realizó con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de la reacción que nos permitan la detección de los genes específicos de las cepas bacterianas de estudio; el ensayo se llevó a cabo realizando por duplicado cada una de las reacciones.

Ensayo 2: Se realizó para verificar la especificidad de la sonda, en este ensayo se probaron cada una de las sondas utilizando las bacterias *S. flexneri*, *S. sonnei* y *E. coli* O103:H25.

MEZCLA DE REACCIÓN	
Master mix (2x)	10 µL
Iniciadores (10 mM)	0.6 µL
Sonda (5 µM)	0.6 µL
ADN (100 ng/µL)	0.7 µL
Agua grado biología molecular	Ajustar a 20 µL
Volumen final	20 µL

Tabla 7. Mezcla de reacción utilizada para los ensayos de PCR tiempo real en el equipo LigthCycler® 480 DE ROCHE.

6.3.8 Secuenciación

La secuenciación de los productos obtenidos en la PCR punto final se realizó en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), en el departamento de Biología Molecular y Desarrollo Validación de Técnicas, por el método de secuenciación tipo Sanger. La secuenciación se llevó a cabo en el equipo ABI 3500 Series.

6.3.9 Edición y Análisis de las Secuencias

Los resultados obtenidos se nos proporcionaron a manera de electroferogramas en archivos *.ab1, estos fueron editados es decir, se verificó la correcta asignación de las bases nucleótidas y se llevó a cabo un control de calidad en el programa Chromas v2.6, los archivos de sentido y antisentido se abrieron de manera simultánea, y se compararon las secuencias, se eliminaron las ambigüedades o errores generados por el secuenciador, y los archivos se guardaron en formato *.fasta.

Para la obtención de las secuencias consenso éstas fueron comparadas en el programa BioEdit v7.2.5, que realiza alineamientos múltiples mediante **la función "capcontig"**. Las secuencias consenso obtenidas fueron analizadas mediante un BLAST verificando que el fragmento obtenido se encontrara en la especie bacteriana indicada.

7.0 RESULTADOS

7.1 BÚSQUEDA DE GENES ESPECÍFICOS Y DISEÑO DE INICIADORES

Para realizar la diferenciación entre *Shigella* spp y *E. coli* se realizó una búsqueda bibliográfica, encontrando genes específicos *ipaH* y *lacY* específicos de *Shigella* spp y *E. coli* respectivamente, a partir de los cuales se diseñaron los iniciadores, con los cuales verificamos la presencia de los genes de interés [Khot y Fisher, 2013]. En la tabla 8 se muestra de manera detallada las características de cada uno de ellos.

Nombre del gen		<i>ipaH</i>	<i>lacY</i>
Especie bacteriana en la que se encuentra		<i>Shigella</i> spp	<i>Escherichia coli</i>
Ubicación del gen		Plásmido	Cromosoma
Función del gen		Gen multicopia de invasión (antígeno H)	Aporta capacidad de fermentación de lactosa
Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Sentido	TCGATAATGATACCGGCGCTC	CTGCTTCTTTAAGCAACTGGCGA
	Antisentido	CTGCGAGCATGGTCTGGAA	ACCAGACCCAGCACCAGATAAG
Temperatura de alineamiento		57°C	57°C
Tamaño del producto amplificado (pb)		147 pb	102 pb
Sonda diseñada		/5Cy5/GA TAG AAG T/TAO/C TAC CTG GCC /3IAbRQSp/	/56-FAM/AA AGC ATC G/ZEN/G TTT CCA GGG /3IABkFQ/

Tabla 8. Descripción detallada de las características de los iniciadores utilizados para la diferenciación de *Shigella* spp y *E. coli*.

En el servidor Oligoanalyzer 3.1 se verificó que no formaran dímeros ni que existiera complementariedad entre los mismos, para proceder a probarlos de manera *in silico* en el servidor *in silico* PCR amplification. Los resultados se muestran en la sección 7.2.

Para el diseño de iniciadores de las cuatro especies de *Shigella* se realizó una búsqueda que genes específicos o marcadores moleculares que permitieran la diferenciación, con base en la metodología descrita en el apartado 6.3.2 y 6.3.3. Los resultados del análisis de genómica comparativa se muestran en la Figura 11 donde se observa que las especies de *Shigella* comparten 2815 familias de genes, de los cuales 18,218 genes se encuentran dentro del core genoma, mientras 4416 familias de genes son específicos para las diferentes especies, siendo así en total 8789 genes diferentes entre las especies, la bacteria *S. dysenteriae* SD197 es la que presenta un número mayor de genes diferentes. Esto se debe a la adquisición de genes como *Stx1* y a las variantes de plásmidos de invasión pINVA y pINVB, entre otros genes como los de resistencia a antibióticos, que la han diferenciado de los otras especies de *Shigella* [Rohmer *et al.*, 2013].

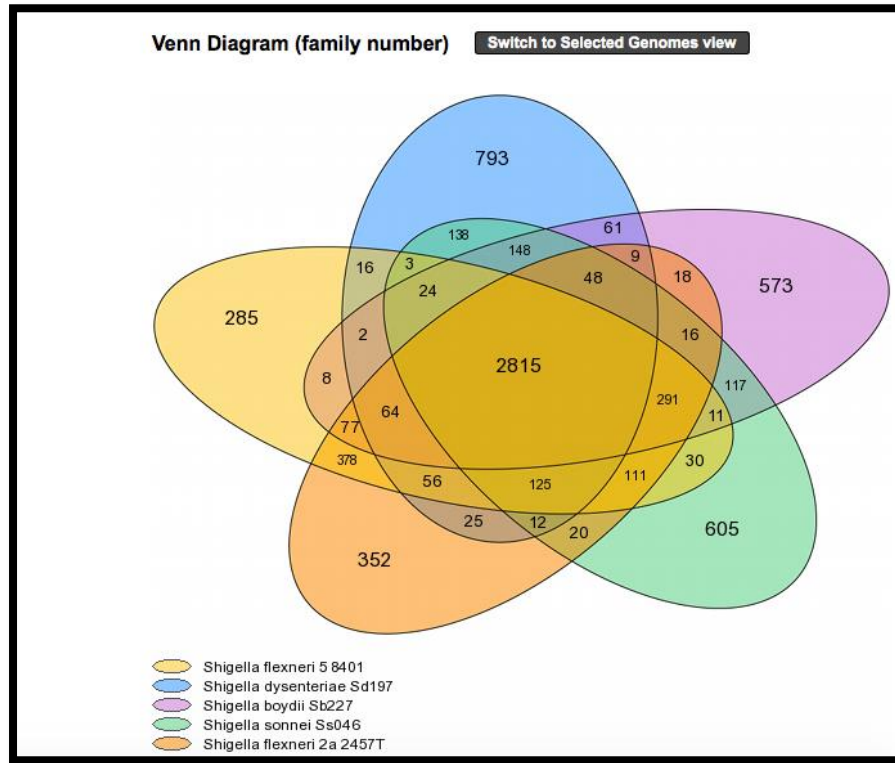


Figura 11. Diagrama de Venn de la familia de genes en las especies de *Shigella*. El diagrama muestra las familias de genes únicos, así como los genes que se comparten dentro de los cuatro especies de *Shigella* especies.

Con base en las secuencias de los genes únicos seleccionados, se tomaron algunos de éstos, considerando que la expresión de estos genes fueran constitutivos en las bacterias. A partir de estas secuencias de genes se realizó el diseño de los iniciadores los cuales se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Descripción detallada de las características de los iniciadores diseñados para la

Nombre del gen		S4646	SSO1290
Especie bacteriana en la que se encuentra		<i>Shigella flexneri</i>	<i>Shigella sonnei</i>
Ubicación del gen		Cromosoma	Cromosoma
Función del gen		Codifica para una ribonucleasa Z que tiene importantes roles en el metabolismo	Proteína hipotética con dominios de glicosiltransferasa, importante en la degradación de azúcares como la glucosa.
Secuencia de los iniciadores diseñados (5'-3')	Sentido	TGCTGGTTACGGGGCCAGCTTACAAC	CAGCGAGCCAACGGCCGAGTATCAAA
	Antisentido	AGGGCTCATGTACGGCCTCATGCACA	AGCCACTCAGCATCATCGGCCAGACCA
Temperatura de alineamiento		66°C	66°C
Tamaño del producto amplificado (pb)		500	232
Sonda diseñada		/5HEX/TC CAG AAT A/ZEN/T GAT CAC TGT GTA AAT GGG TG/3IABkFQ/	/5TexRd-XN/CA CAG CTA ATG CCA CTT ATA CAG GC/3IAbRQSp/

diferenciación de las especies de *S. sonnei* y *S. flexneri*.

7.2 ANÁLISIS IN SILICO

Los iniciadores encontrados en la bibliografía y los diseñados se probaron de manera *in silico* en el servidor *In silico PCR amplification* [Bikandi *et al.*, 2004] además de realizar un BLAST [Altschul *et al.*, 1997] para verificar la especificidad de los genes en las especies bacterianas.

A continuación, se presentan las figuras de la PCR *in silico* realizada. Se observa que los iniciadores diseñados para el gen *ipaH* amplifican solo

para las especies de *Shigella* spp pero no así para *E. coli* (Figuras 12 y 13) respectivamente.

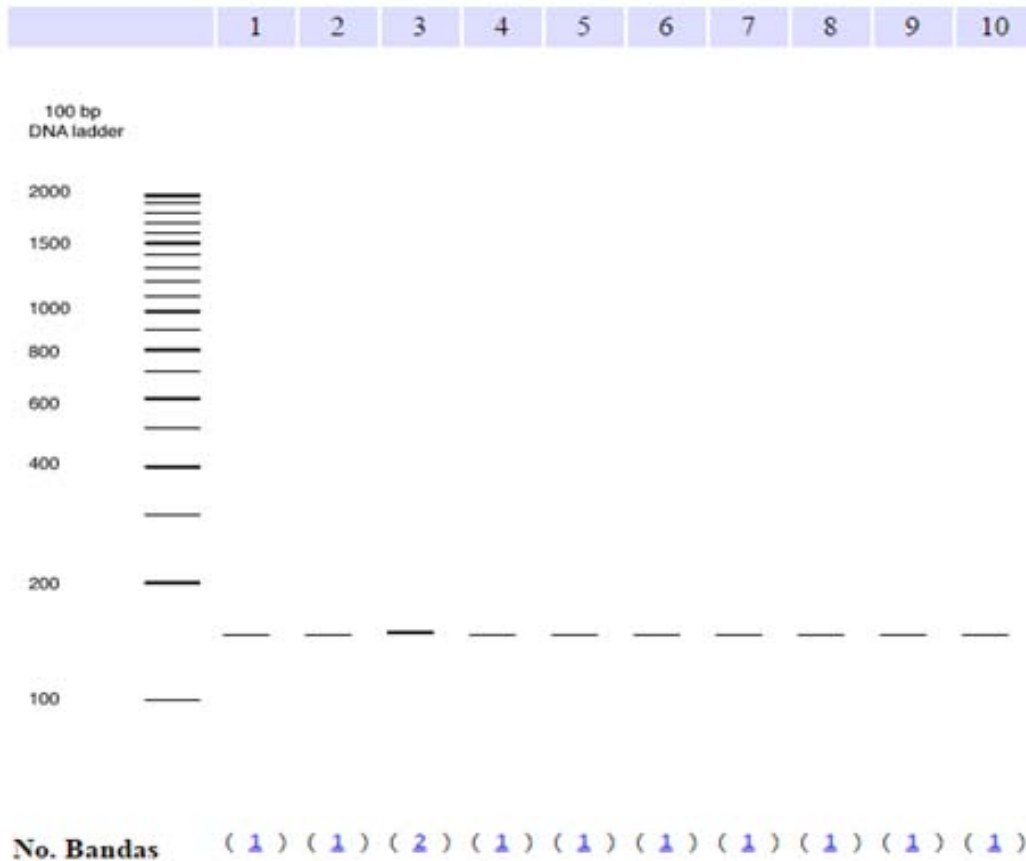
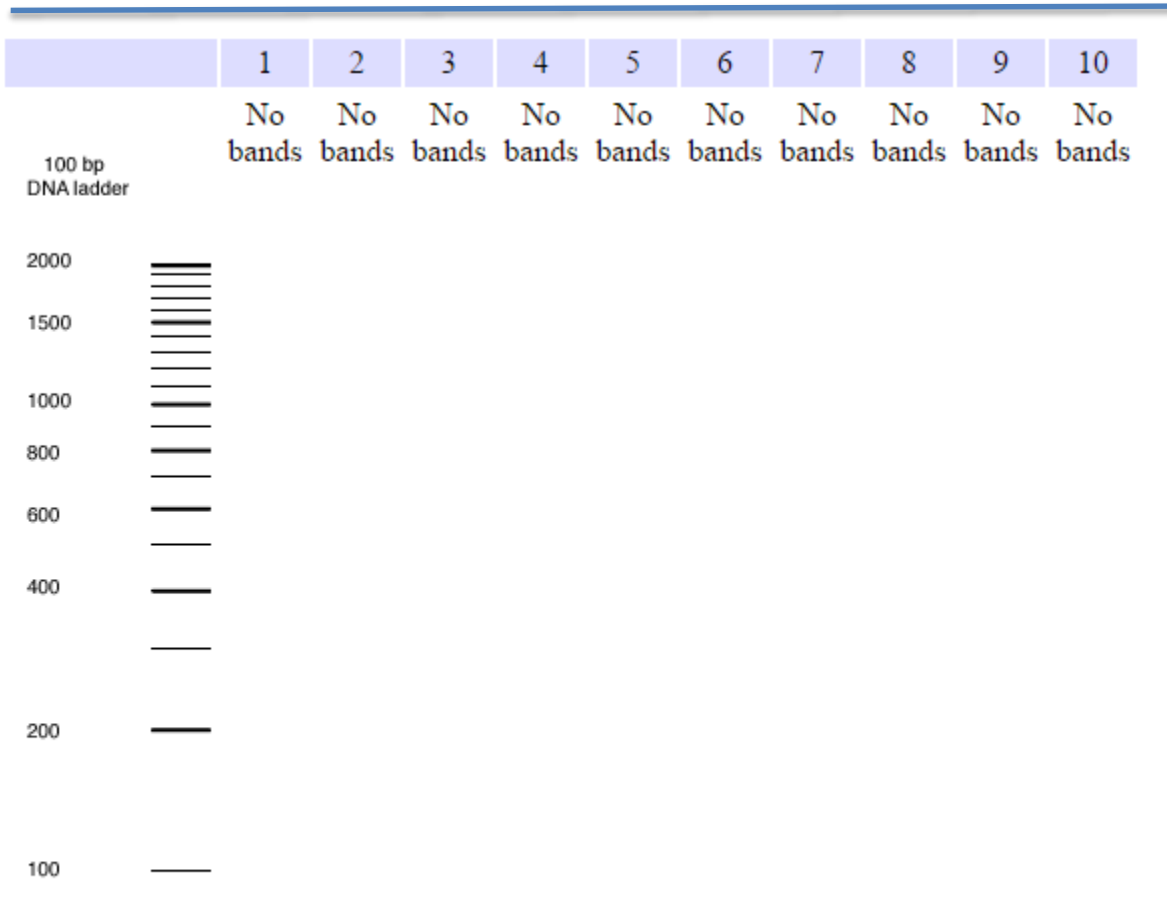


Figura 12. PCR In silico para el gen *ipaH*. La imagen presenta el gel *in silico* donde se observa amplificación para todas las especies de *Shigella* spp reportadas en la base de datos del servidor; 1. *S. boydii* CDC 3083-94; 2. *S. boydii* Sb227; 3. *S. dysenteriae* 1617; 4. *S. dysenteriae* Sd197; 5. *S. flexneri* 2002017; 6. *S. flexneri* 2a str 301; 7. *S. flexneri* 2a str. 2457T; 8. *S. flexneri* 5 str. 8401; 9. *S. sonnei* 53G; 10. *S. sonnei* Ss046; utilizando los iniciadores específicos para el gen *ipaH*, se observan amplicones de 147 pb.

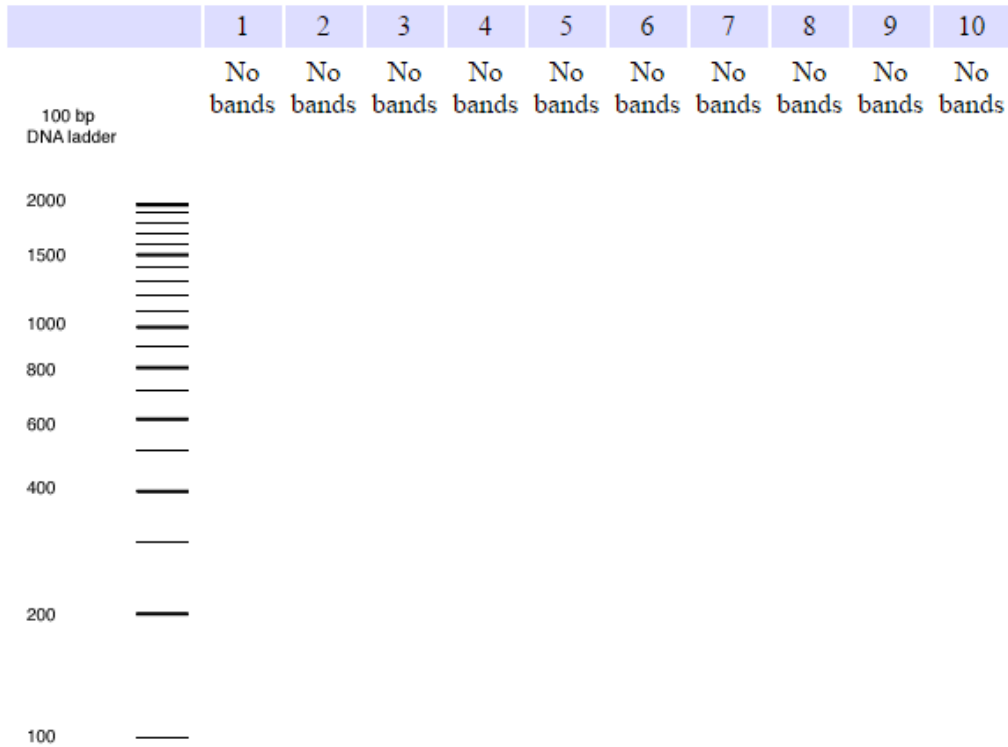


No. Bands

Figura 13. PCR *In silico* para el gen *ipaH*. La imagen presenta el gel *in silico* donde se observa que no hay amplificación para ninguna de las especies de *E. coli*; 1. *E. blattae* DSM 4481; 2. *E. coli* 0127:H6; 3. *E. coli* 042; 4. *E. coli* 536; 5. *E. coli* 55989; 6. *E. coli* ABU 83972; 7. *E. coli* APEC O1; 8. *E. coli* APEC O78; 9. *E. coli* ATCC 8739; 10. *E. coli* B str. REL606; utilizando los iniciadores diseñados para el gen *ipaH*.

En la figura 13 se muestran diez cepas de *E. coli*, sin embargo el análisis se realizó con un total de 65 cepas (ver apéndice 2).

Por otra parte, se realizó de igual manera la prueba *in silico* utilizando los iniciadores diseñados para el gen *lacY*, específico de *E. coli*, observando que no hay amplificación para ninguna de las especies de *Shigella* (Figura 14).



No. Bands

Figura 14. PCR *In silico* para el gen *lacY*. Imagen de gel *in silico* en donde se observa que no hay amplificación para ninguna de las especies de *Shigella* spp reportadas en la base de datos del servidor; 1. *S. boydii* CDC 3083-94; 2. *S. boydii* Sb227; 3. *S. dysenteriae* 1617; 4. *S. dysenteriae* Sd197; 5. *S. flexneri* 2002017; 6. *S. flexneri* 2a str 301; 7. *S. flexneri* 2a str. 2457T; 8. *S. flexneri* 5 str. 8401; 9. *S. sonnei* 53G; 10. *S. sonnei* Ss046; utilizando los iniciadores diseñados para el gen *lacY*.

Como se observa no hay amplificación con los iniciadores diseñados para el gen *lacY* con las especies de *Shigella*, esto se puede explicar debido a la pérdida de genes relacionados con vías metabólicas, derivado de la expresión redundante de los mismos, prefiriendo expresar un gen con diversas funciones, es decir, un gen que además de realizar una función específica, realiza funciones secundarias, a esta teoría evolutiva se le conoce como antagonismo pleiotrópico [Pupo *et al.*, 2000].

Por su parte la prueba *in silico* para el gen *lacY*, se realizó también con las diferentes especies de *E. coli* que se encuentran en la base de datos del servidor. En la figura 15 se observa amplificación para la mayoría de las cepas de esta bacteria, la falta de amplificación de las cepas, 1. *E. blattae* DSM 4481; 7. *E. coli* APEC O1. En el apéndice 2 se presentan los resultados con todas las cepas empleadas; la falta de amplificación en las cepas de *E. coli* con los iniciadores diseñados para el gen *lacY* puede estar relacionado con la pérdida de genes al igual que sucede con *Shigella*, refiriéndonos al caso específico de *E. coli* enteroinvasiva que comparte características con *Shigella* [Khot y Fisher, 2013]; sin embargo, se propone que estas similitudes se deben a convergencia evolutiva o como menciona Yang y colaboradores, las Shigellas pudieron haber evolucionado de genomas de *E. coli* [Yang *et al.*, 2005, Pupo *et al.*, 2000].

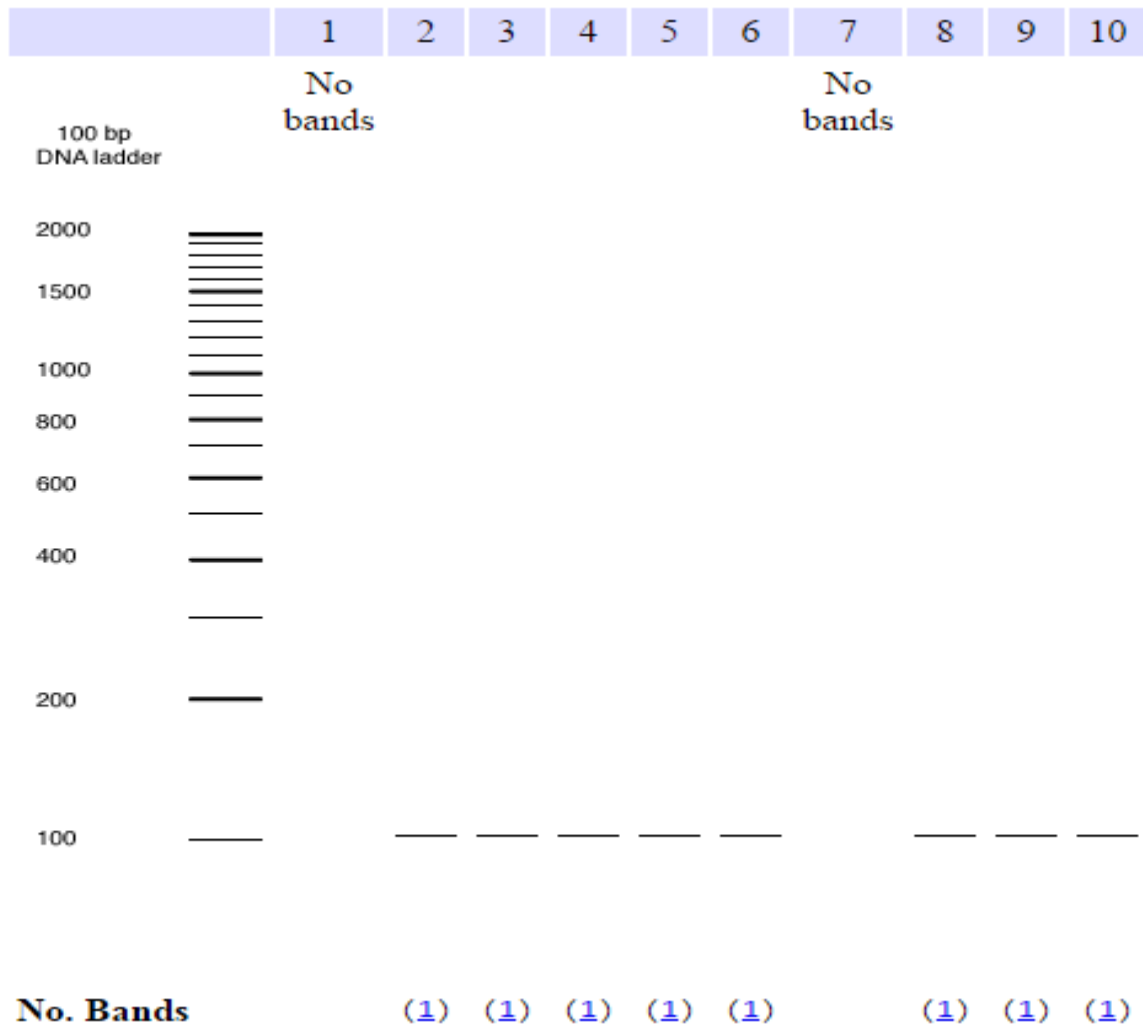


Figura 15. PCR *in silico* para el gen *lacY*. Imagen de gel *in silico* en donde se observa la presencia de amplificación para la mayoría de las especies de *E. coli* utilizadas en el ensayo con los iniciadores diseñados para el gen *lacY*; 1. *E. blattae* DSM 4481; 2. *E. coli* O127:H6; 3. *E. coli* O42; 4. *E. coli* 536; 5. *E. coli* 55989; 6. *E. coli* ABU 83972; 7. *E. coli* APEC O1; 8. *E. coli* APEC O78; 9. *E. coli* ATCC 8739; 10. *E. coli* B str. REL606; se observan amplicones de 102 pb.

Por otra parte, también se muestran los geles *in silico* realizados para verificar la especificidad de los iniciadores diseñados para los genes S4646 y SSO1290 específicos para las especies de *S. flexneri* y *S. sonnei* respectivamente (Figuras 16 y 17).

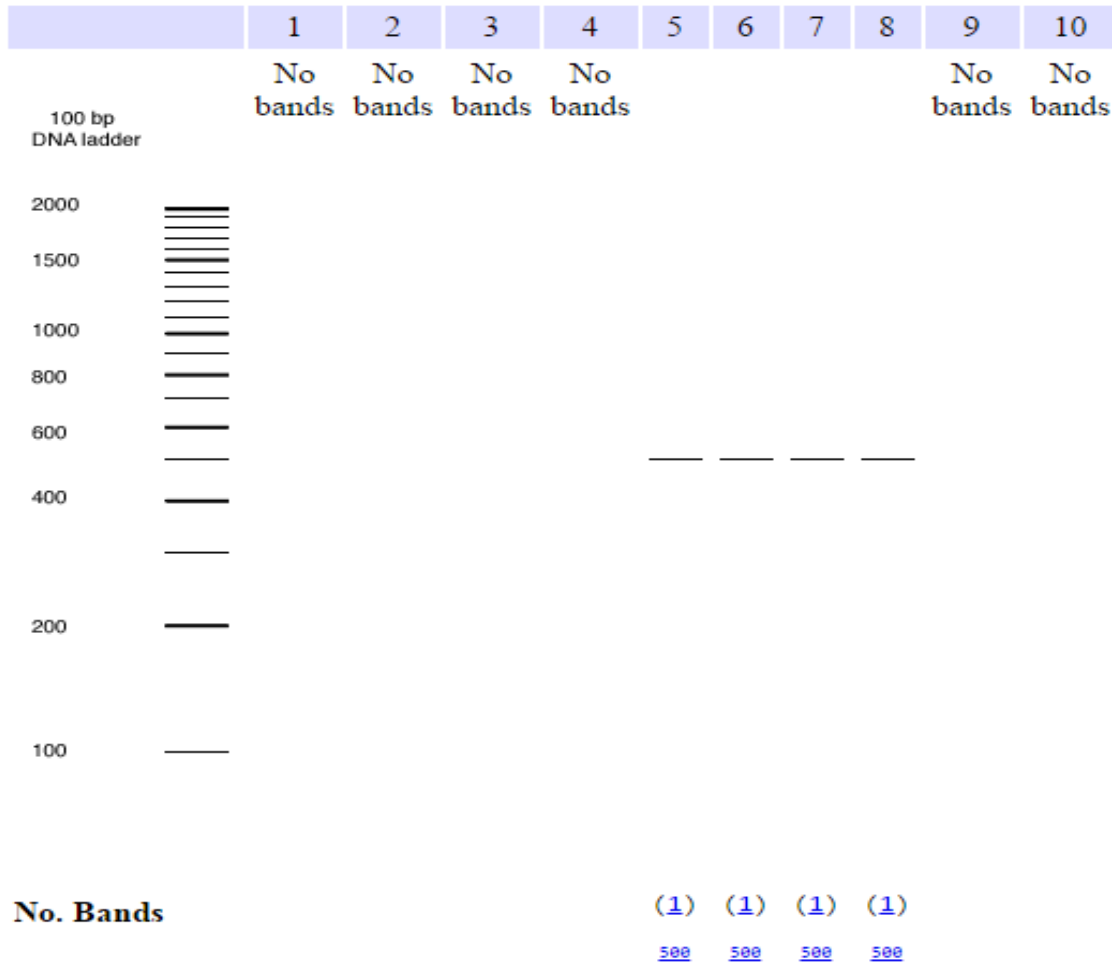


Figura 16. PCR *in silico* para el gen S4646. La imagen presenta el gel *in silico* donde se observa amplificación para las cepas de *S. flexneri* reportadas en la base de datos del servidor; 5. *S. flexneri* 2002017; 6. *S. flexneri* 2a str 301; 7. *S. flexneri* 2a str. 2457T; 8. *S. flexneri* 5 str. 8401; utilizando los iniciadores específicos para el gen S4646, se observan amplicones de 500 pb.

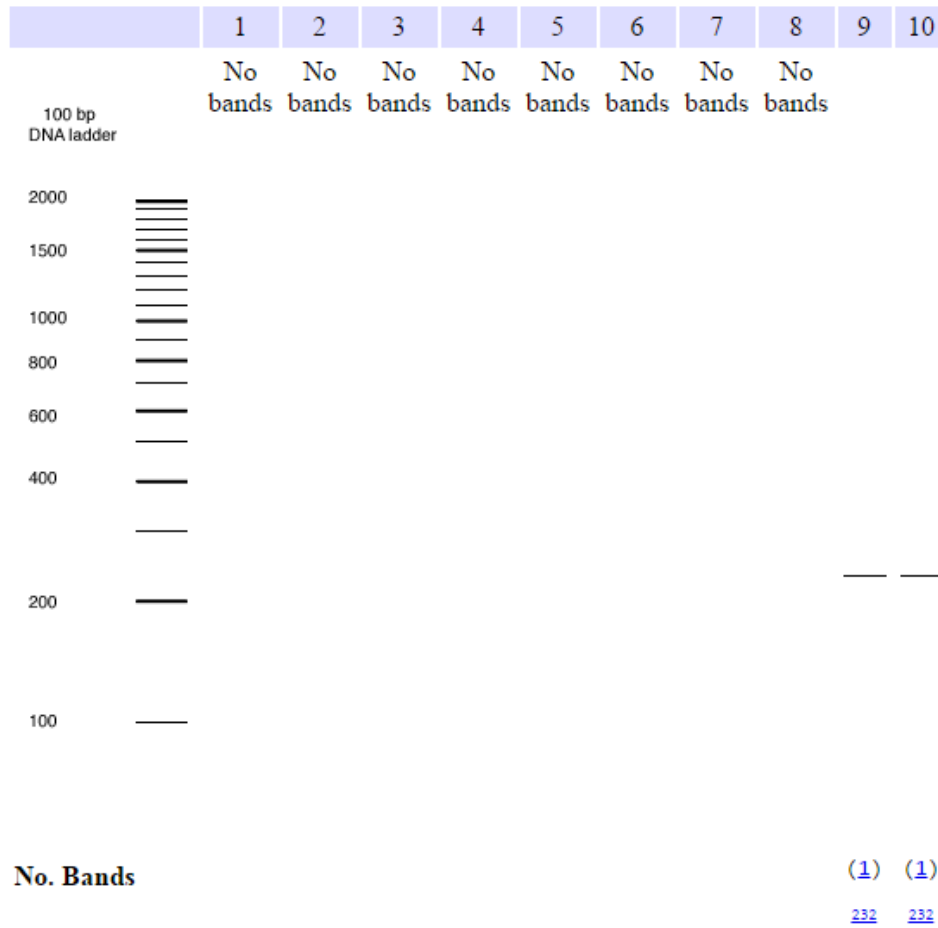


Figura 17. PCR In silico para el gen SSO1290. La imagen presenta el gel in silico donde se observa amplificación solo para las cepas de *S. sonnei* reportadas en la base de datos del servidor; 8. *S. sonnei* 53G; 9. *S. sonnei* Ss046; utilizando los iniciadores específicos para el gen SSO1290, se observan amplicones de 232 pb.

Con los resultados mostrados de manera *in silico* se observó que los genes seleccionados sí fueron específicos y funcionaron para realizar la identificación de las bacterias en estudio, por lo cual se procedió a realizar el ensayo en el laboratorio.

7.3 EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN.

La extracción de ADN que se realizó con el Kit High Pure PCR Template Preparation de Roche®, posteriormente se procedió a realizar la evaluación de la pureza y concentración de los extractos, en la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos.

	Nanodrop		Qubit
Bacteria	[ADN] (ng/μL)	Relación (260/280 nm)	[ADN] (ng/μL)
<i>S. flexneri</i>	66.1	1.97	31.0
<i>S. sonnei</i>	66.8	1.99	32.4
<i>E. coli</i> ATCC 25922	132.7	1.99	38.4
<i>E. coli</i> O103H25	111.5	1.93	196
<i>E. coli</i> O26H11	64.9	2.00	42.5
<i>E. coli</i> O121H19	202.6	2.11	20.3
<i>E. coli</i> O11	86.5	2.02	34.9
<i>E. coli</i> O11cc: H8	45.9	2.04	12.1
<i>E. coli</i> O157H7	59.8	1.97	42.8
<i>E. coli</i> O55H7	61.4	2.05	45.5
<i>E. coli</i> O103H2	80.5	1.97	34.0
<i>E. coli</i> O145H34	54.6	1.96	42.8

Tabla 10. Cuantificación de ADN genómico en NanoDrop y Qubit. Se presentan los resultados de NanoDrop, los cuales se consideraron para verificar la calidad del ADN con base en la relación 260/280 nm, mientras que el resultado obtenido mediante Qubit se consideró lo vamos a considerar para verificar la concentración.

Se utilizó el resultado obtenido por Qubit para determinar la concentración del ADN, ya que, al ser una técnica en donde se utiliza un fluoróforo que se intercala en la doble cadena del ADN, se está cuantificando exclusivamente ADN de doble cadena.

En los resultados se observan los valores que corresponden a la relación 260/280 nm, éstos se encuentran en el rango de 1.8-2.0 para la mayoría de los casos, los cuales se consideran como apropiados con base en los criterios de calidad del ADN establecidos en el CNRDOGM, los casos en los que la relación se encontró arriba de 2, puede deberse a presencia de carbohidratos, mientras que valores menores a 1.8 pueden indicar contaminación con proteínas o fenoles [Wilfiger *et. al.*, 1997].

7.4 PCR MULTIPLEX CON LOS GENES *ipaH* Y *lacY*, PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli* Y *Shigella spp.*

Posteriormente se realizó una PCR punto final probando los iniciadores diseñados para los genes *lacY* e *ipaH*, con el objetivo de comprobar la especificidad de los mismos, así como de encontrar las condiciones óptimas de la reacción como temperatura de alineamiento y cantidad de ciclos necesarios para que se lleve a cabo la amplificación.

En la Figura 17, se presenta la imagen que se obtiene del Bioanalizador Agilent 2000 tras la electroforesis capilar realizada posterior a la reacción de PCR, en donde se observa que los iniciadores del gen *lacY* solo amplificaron para *E. coli* y los iniciadores del gen *ipaH* sólo para *Shigella spp.* Estos resultados se justifican porque el gen *ipaH* se encuentra exclusivamente en el género *Shigella*, siendo un gen multicopia de invasión encontrado en ADN plasmídico, mientras que *lacY* se encuentra en el ADN genómico de *E. coli* brindándole la capacidad de fermentación de lactosa, prueba bioquímica que se utiliza para diferenciar entre *E. coli* y *Shigella spp* [Khot y Fisher. 2013].

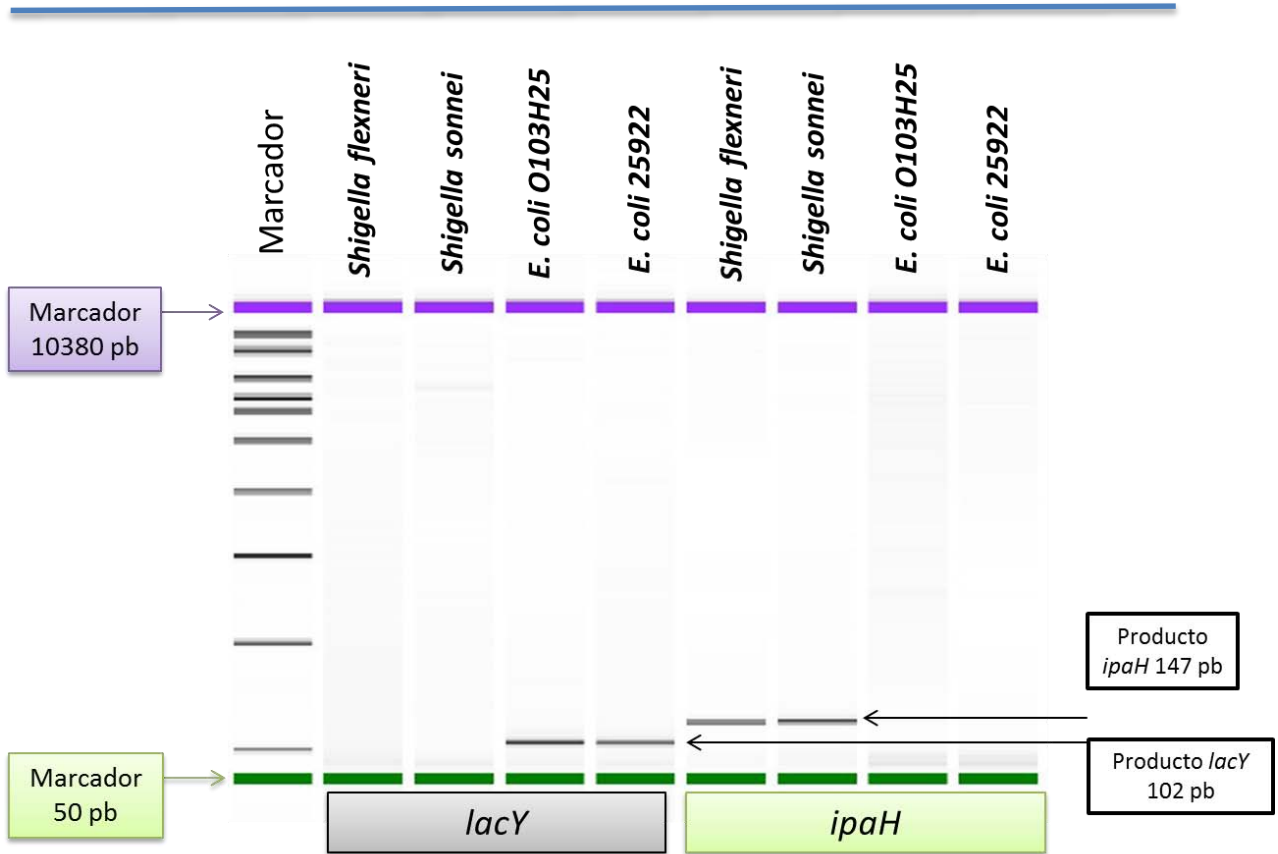


Figura 17. Imagen digital de la electroforesis realizada con el equipo Bioanalizador Agilent 2100 correspondiente a la reacción de PCR con los iniciadores *lacY* e *ipaH*. Carril 1: marcador; Carril 2-5: *lacY*; Carril 6-9: *ipaH*, se observan amplicones de aproximadamente 110 pb para *Escherichia coli* utilizándolos iniciadores para el gen *lacY* y de 150 pb para *Shigella* con los iniciadores para el gen *ipaH* (Ver gel de agarosa en apéndice 3).

Así mismo en el equipo Bioanalizador Agilent 2100 se logran obtener los tamaños exactos de cada uno de los productos de amplificación (Figura 18).

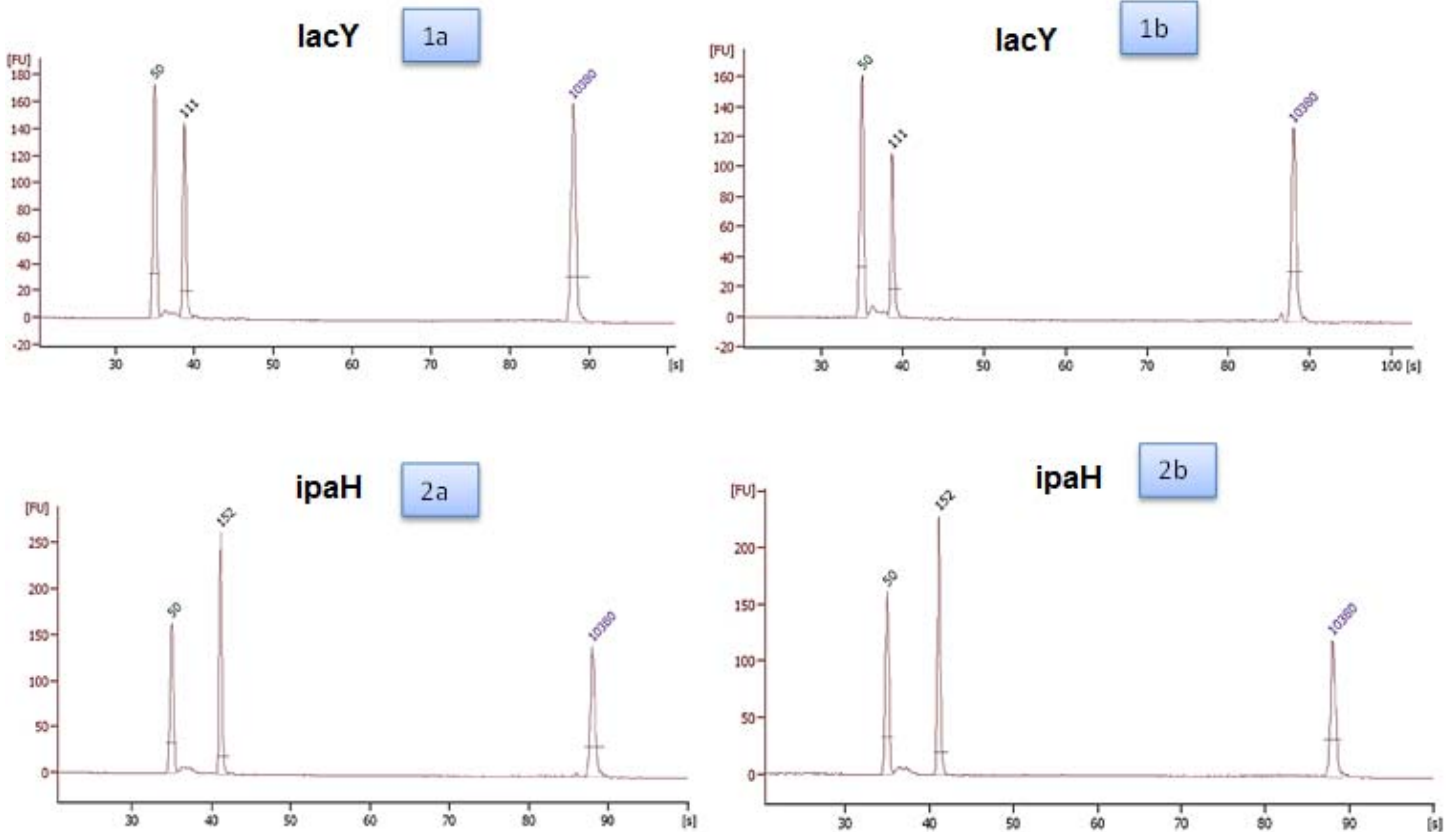


Figura 18. Electroferogramas fluorescencia contra pares de bases. En los 4 paneles además del producto de amplificación se observó un pico de 50 pb y otro de 1380 pb que corresponden a los marcadores de peso molecular. En el panel 1a y 1b se observan picos que corresponden a un tamaño de 111 pb, los cuales pertenecen a los productos amplificados por los iniciadores de *lacY* en las cepas de *E. coli* 25922 y *E. coli* O103H25. En el panel 2a y 2b se observan picos que corresponden a un tamaño de 151 pb, los cuales pertenecen a los productos amplificados por los iniciadores de *ipaH* en las cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei*.

En los electroferogramas presentados se observó únicamente el producto de interés sin productos inespecíficos, el objetivo de observar los productos de amplificación por medio de esta técnica es realizar el análisis de calidad, tamaño y cuantificación de los productos con una elevada resolución, la cual emplea chips constituidos por dos laminillas y pozos, en cuyo interior presentan microcanales, donde se efectúa un proceso de separación electroforética por carga y masa, además de realizar la

detección de material genético por medio de fluorescencia inducida por un láser que permite detectar fragmentos DNA con una concentración de hasta 0.5 ng [Castagnino, 2006].

Ensayo de Especificidad

Para corroborar que los iniciadores diseñados para el gen *lacY* fueran específicos de las cepas de *Escherichia coli* estos se probaron en 11 cepas de *Escherichia coli*, obteniendo como resultado amplificación en las 11 cepas, con un tamaño de producto de entre 103 pb y 110 pb, los resultados se muestran en la (Figura 19).

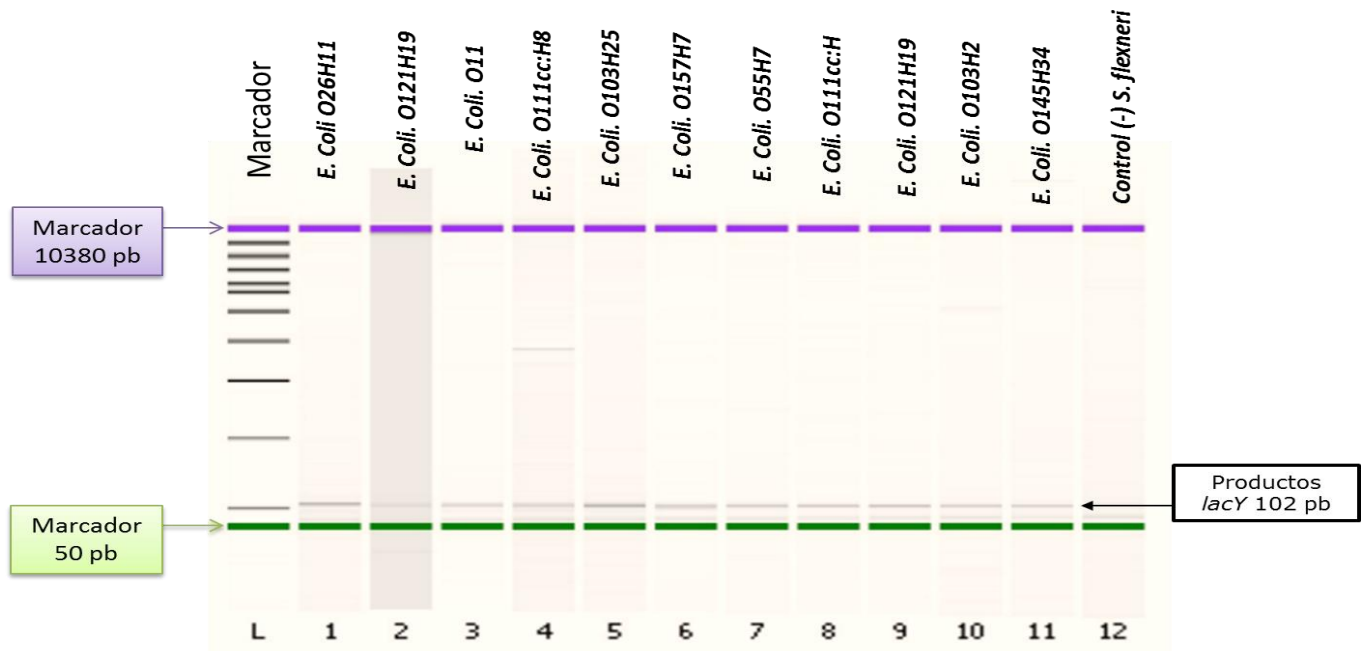


Figura 19. Imagen digital de la electroforesis realizada con el equipo Bioanalizador Agilent 2100 correspondiente a la reacción de PCR con los iniciadores diseñados para el gen *lacY* en las cepas 1. *E. coli* O26:H11; 2. *E. coli* O121:H19; 3. *E. coli* O11; 4. *E. coli* O11cc: H8; 5. *E. coli* O103:H25; 6. *E. coli* O157:H7; 7. *E. coli* O55:H7; 8. *E. coli* 25922; 9. *E. coli* O121:H19; 10. *E. coli* O103:H2; 11. *E. coli* O145:H34; 12. Control negativo (*S. flexneri*).

De igual manera se realizó el ensayo utilizando los iniciadores del gen *ipaH* en la Figura 20 se puede ver que ninguna de las cepas de *Escherichia coli* utilizadas presentaron amplificación del fragmento de interés, sin embargo, se observan productos inespecíficos en los carriles 6, 7, 8 y 10.

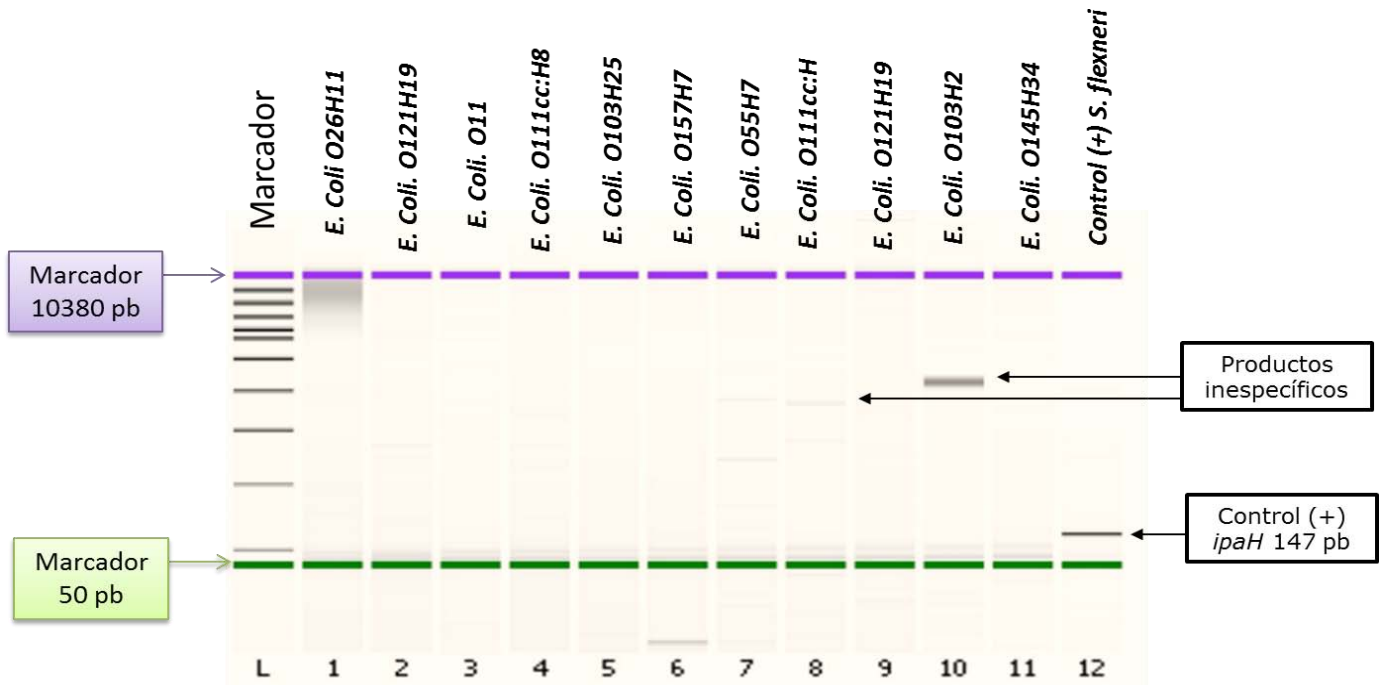


Figura 20. Imagen digital de la electroforesis realizada con el equipo Bioanalizador Agilent 2100 correspondiente a la reacción de PCR con los iniciadores diseñados para el gen *ipaH* en las cepas 1. *E. coli* O26:H11; 2. *E. coli* O121:H19; 3. *E. coli* O11; 4. *E. coli* O111cc: H8; 5. *E. coli* O103:H25; 6. *E. coli* O157:H7; 7. *E. coli* O55:H7; 8. *E. coli* 25922; 9. *E. coli* O121:H19; 10. *E. coli* O103:H2; 11. *E. coli* O145:H34; 12. Control positivo (*S. flexneri*).

Con esto se corrobora que el gen *lacY* es exclusivo de *E. coli* y que el gen *ipaH* no se encuentra en ninguna de las cepas de *E. coli* utilizadas en el presente estudio, demostrando la especificidad de los iniciadores.

PCR multiplex

Una vez que se realizaron las amplificaciones con los iniciadores diseñados para los genes específicos de las cepas de *E. coli* y *Shigella* spp se estableció una temperatura de alineamiento de 57 °C en cada una de las reacciones por separado, lo cual nos permitió llevar a cabo la amplificación en una sola reacción (PCR multiplex), en la Figura 21 se muestra la imagen digital de la electroforesis llevada a cabo, así como el electroferograma correspondiente en donde se observaron los tamaños específicos de cada uno de los productos.

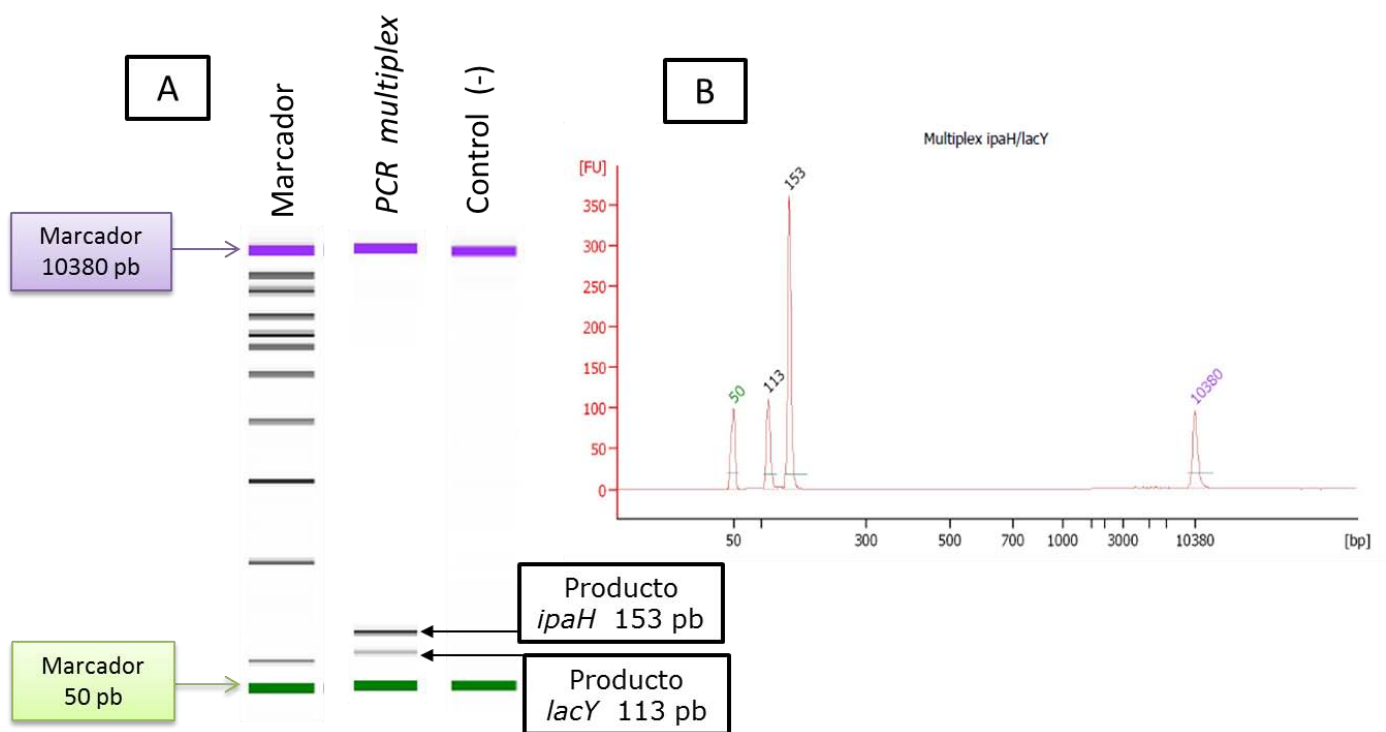


Figura 21. Panel A. Imagen digital de la electroforesis realizada con el equipo Bioanalizador Agilent 2100 correspondiente a la reacción de PCR con los iniciadores diseñados para el gen *ipaH* y *lacY* en las cepas de *E. coli* O13H25 y *S. flexneri*; en el Panel B se observa el Electroferograma de fluorescencia vs pares de bases donde se observan los picos correspondientes a los productos de *lacY* (113 pb) e *ipaH* (153 pb) (Ver gel de agarosa en apéndice 3).

La PCR multiplex llevada a cabo es una técnica con la cual se pudo llevar a cabo la identificación de *E. coli* y *Shigella* spp que como se mencionó anteriormente se encuentran estrechamente relacionadas, utilizando genes específicos de cada una de ellas para poder identificarlas mediante una sola reacción en un menor tiempo de análisis y con una mayor especificidad.

PCR tiempo real

Debido a que se observó la presencia de productos inespecíficos (Figura 20) se decidió realizar una PCR tiempo real, con el objetivo de tener obtener mayor especificidad y sensibilidad.

En el gráfico 2 se muestra el resultado obtenido con los iniciadores y la sonda diseñada para el gen *lacY* observándose que con estos solo hay amplificación para las cepas de *E. coli*, la cual comienza a partir del ciclo 15 aproximadamente.

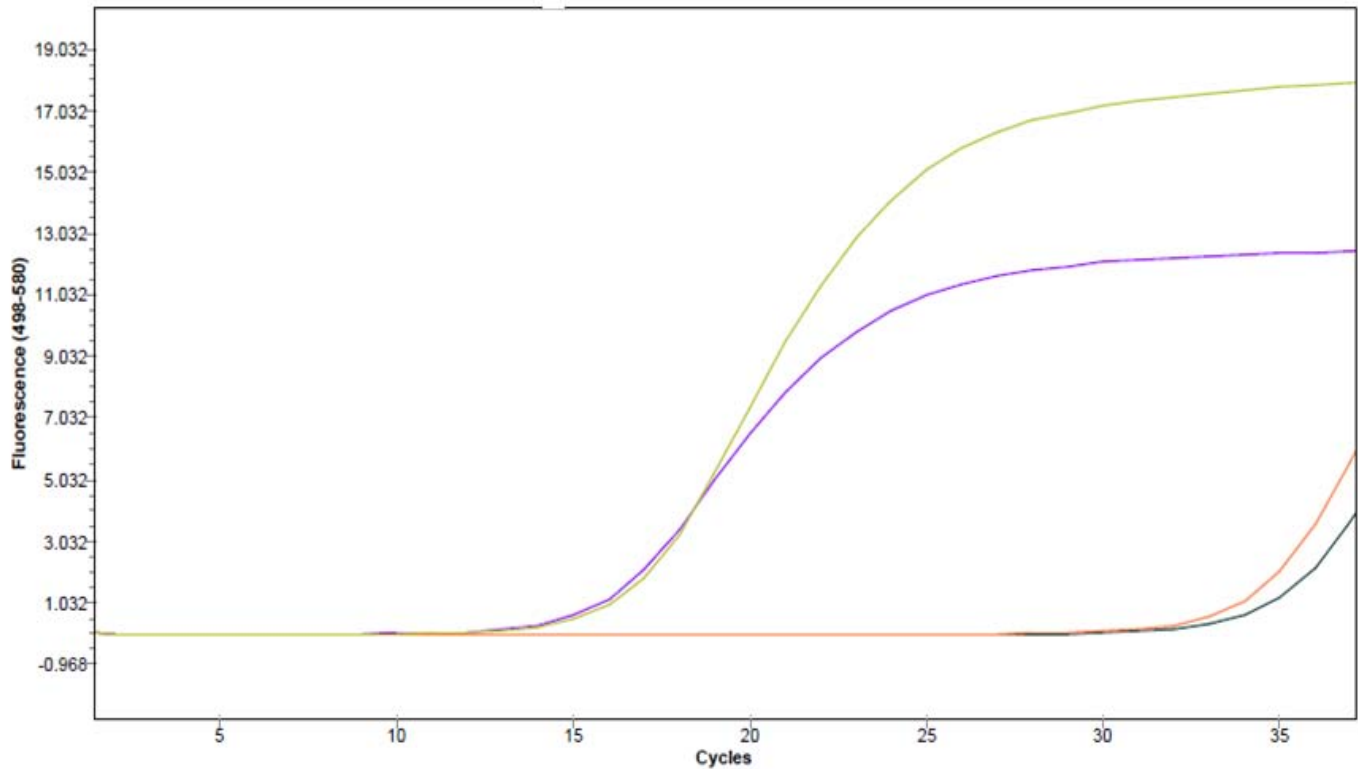


Gráfico 2. Ciclos vs Fluorescencia. Se presentan las curvas de amplificación con los iniciadores y sondas diseñadas para el gen *lacY*; Verde: *E. coli* O103H25; Morado: *E. coli* 25922; Rojo: *S. flexneri*; Gris: *S. sonnei*.

En el gráfico 3 se muestra el ensayo realizado con los iniciadores y la sonda diseñada para el gen *ipaH* observando que hay amplificación solo para las cepas de *Shigella*, la cual comienza a partir del ciclo 13 aproximadamente.

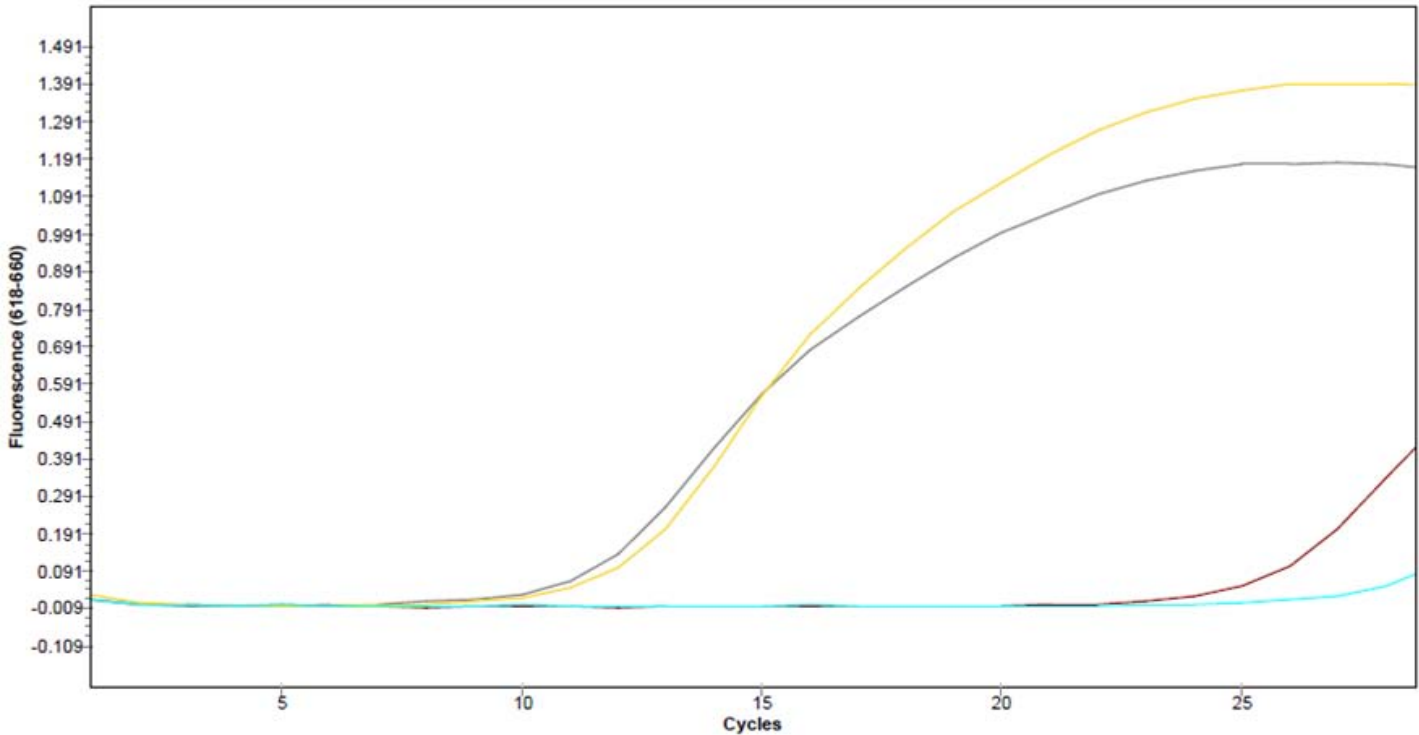


Gráfico 3. Ciclos vs Fluorescencia. Se presentan las curvas de amplificación con los iniciadores y sondas diseñadas para el gen *ipaH*; Amarillo: *S. flexneri*; Gris: *S. sonnei*; Café: *E. coli* O103H25; Gris: *E. coli* 25922.

De igual manera para el ensayo de especificidad se realizó una PCR tiempo real empleando las cepas de *E. coli* mencionadas con anterioridad. En el gráfico 4 se observan las curvas de amplificación obtenidas utilizando los iniciadores y sondas diseñadas para el gen *lacY*, se observa amplificación a partir del ciclo 20 aproximadamente. Por su parte, en el gráfico 5 se presentan los resultados obtenidos con los iniciadores y sonda diseñados para el gen *ipaH*, con los cuales no se observó amplificación para ninguna de las cepas de *E. coli*. Con este ensayo se logró obtener una mayor especificidad eliminando los productos inespecíficos observados en la Figura 20.

Gráfico 4

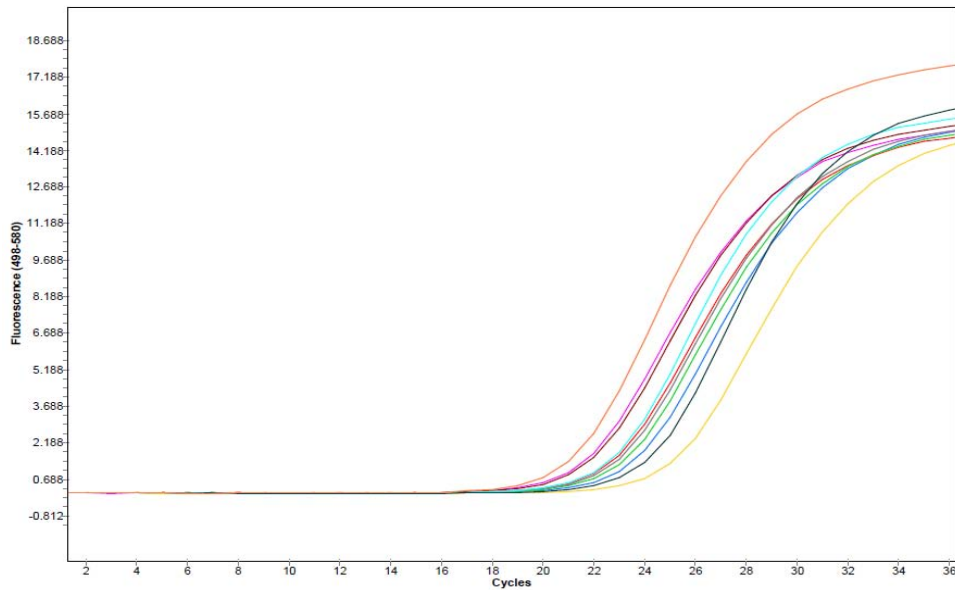
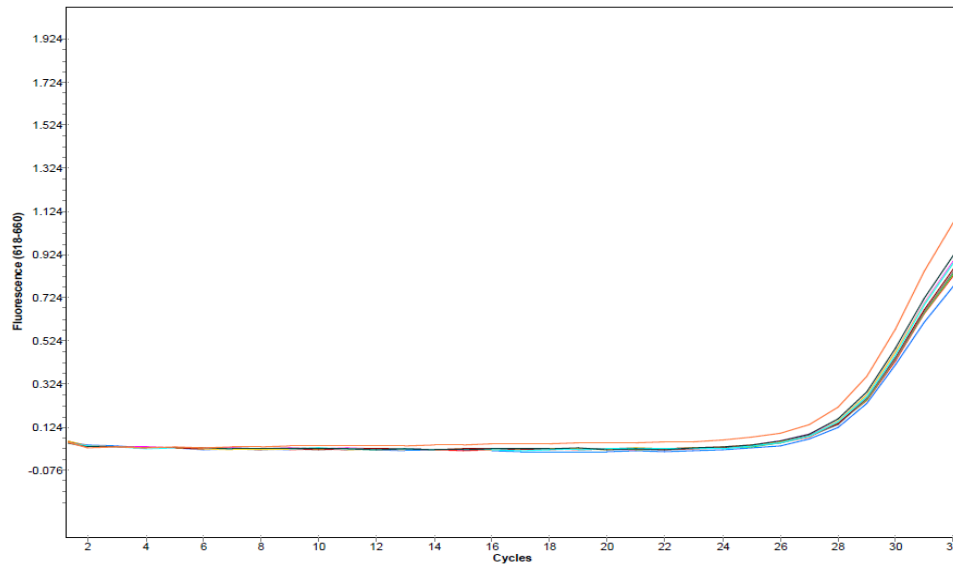


Gráfico 5



Gráficos 4 y 5. Ciclos vs Fluorescencia. Se presentan las curvas de amplificación con los iniciadores y sondas diseñadas para el gen *lacY* (Gráfico 4) y el gen *ipaH* (Gráfico 5); utilizando las cepas: 1. *E. coli* O26H11; 2. *E. coli* O121H19; 3. *E. coli* O11; 4. *E. coli* O11cc: H8; 5. *E. coli* O103H25; 6. *E. coli* O157H7; 7. *E. coli* O55H7; 8. *E. coli* 25922; 9. *E. coli* O121H19; 10. *E. coli* O103H2; 11. *E. coli* O145H34.

7.5 PCR MULTIPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *SHIGELLA*.

Los iniciadores diseñados y probados de manera *in silico* en los apartados 7.1 y 7.2 se utilizaron de manera experimental en una PCR punto final, variando las temperaturas de alineamiento.

Los dos pares de iniciadores diseñados para las especies de *Shigella*, se probaron cada par por separado encontrando una temperatura de alineamiento de 66 °C, en el ensayo se utilizaron las cepas de *S. flexneri*, *S. sonnei* y *E. coli O103H25* (control negativo) con la finalidad de verificar que los iniciadores son específicos para el gen de *Shigella* que fueron diseñados (SSO1290 encontrado en *S. sonnei* y S4646 encontrado en *S. flexneri*); de esta manera se observó que utilizando los iniciadores diseñados para el gen SSO1290 sólo hubo amplificación con la cepa de *S. sonnei* (Figura 22) y utilizando los iniciadores diseñados para el gen S4646 únicamente hubo amplificación con la cepa de *S. flexneri* (Figura 23).

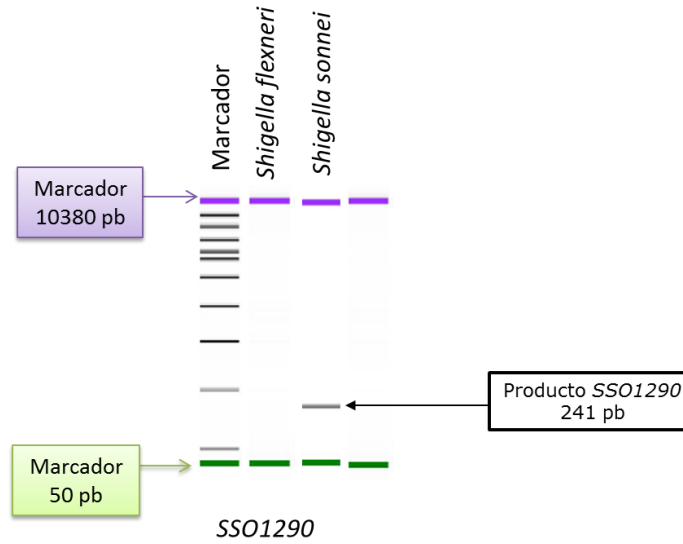


Figura 22. Imagen digital de la electroforesis realizada con el equipo Bioanalizador Agilent 2100 correspondiente a la reacción de PCR con los iniciadores diseñados para el gen SSO1290. 1. *S. flexneri*; 2. *S. sonnei*; 3. Control negativo (*E. coli* O103:H25); se observa un producto de amplificación con la cepa de *S. flexneri* presentando un tamaño de aproximadamente 245 pb (Ver gel de agarosa en apéndice 3).

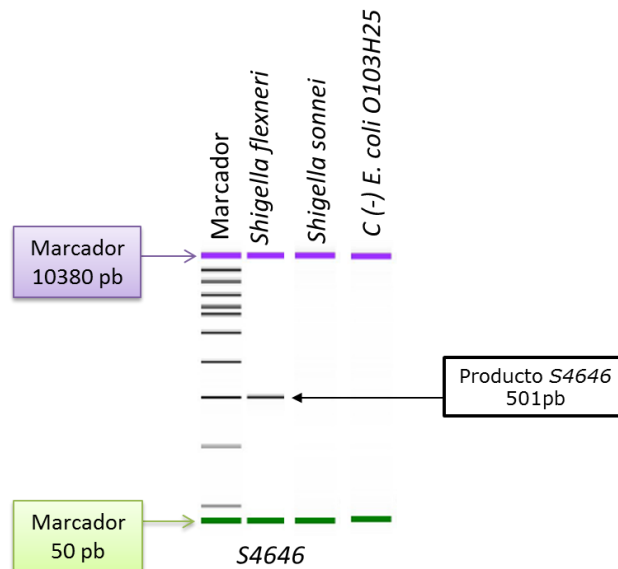


Figura 23. Imagen digital de la electroforesis realizada con el equipo Bioanalizador Agilent 2100 correspondiente a la reacción de PCR con los iniciadores diseñados para el gen S4646. 1. *S. flexneri*; 2. *S. sonnei*; 3. Control negativo (*E. coli* O103:H25); se observa un producto de amplificación con la cepa de *S. sonnei* presentando un tamaño de aproximadamente 500 pb. (Ver gel de agarosa en apéndice 3).

Así mismo se verificó el tamaño exacto de los productos de amplificación con el equipo Bioanalizador Agilent 2000, se observó que el producto de la reacción para el gen SSO1290 de *S. sonnei* tiene un tamaño de 241 pb y el del gen S4646 de *S. flexneri* se encontró en 500 pb (Figuras 24 y 25).

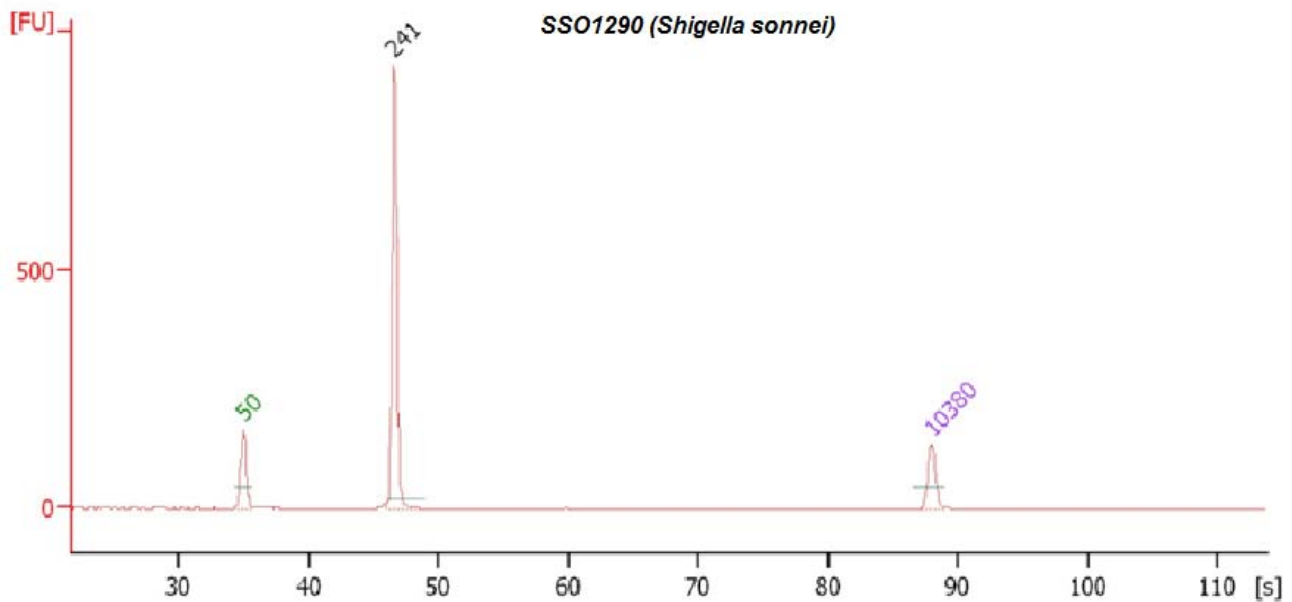


Figura 24. Electroferograma de fluorescencia vs pares de bases. Se observan los picos de los marcadores de peso molecular el primero en 50pb y el segundo en 10380 pb. El pico de 241 pb corresponde al producto de amplificación con los iniciadores diseñados para el gen SSO1290 de *S. sonnei*.

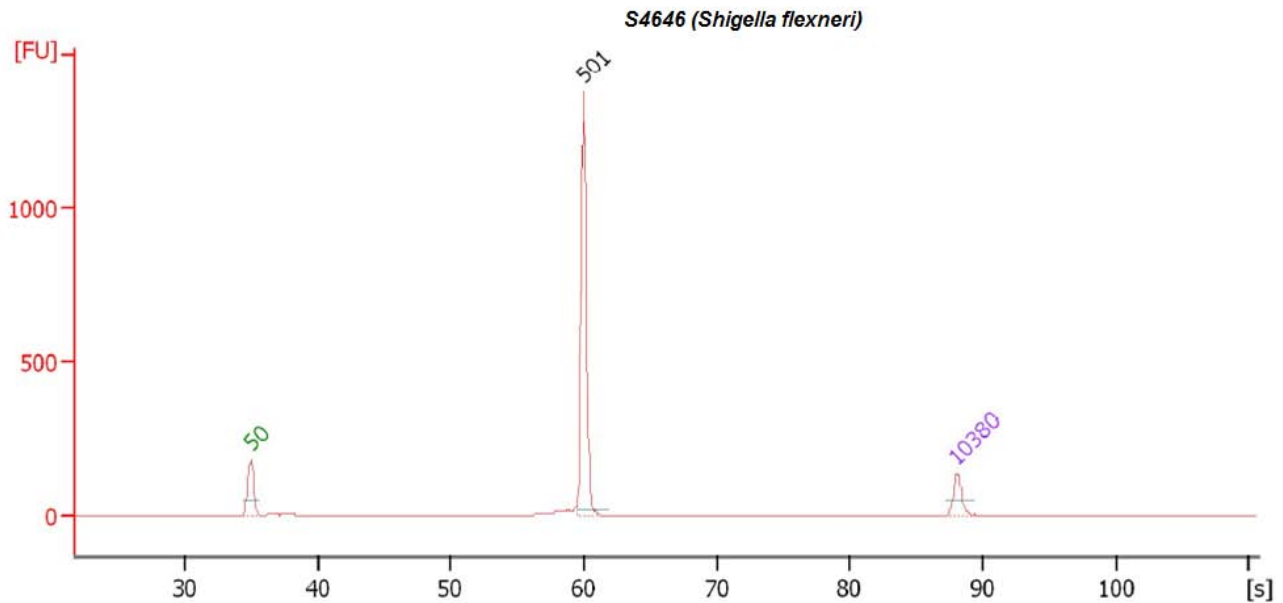


Figura 25. Electroferograma de fluorescencia vs pares de bases. Se observan los picos de los marcadores de peso molecular el primero en 50 pb y el segundo en 10380 pb. El pico de 501 pb corresponde al producto de amplificación con los iniciadores diseñados para el gen S4646 de *S. flexneri*.

PCR multiplex

Una vez que se realizaron las amplificaciones con los iniciadores diseñados para los genes específicos de las cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei*, por separado, **se** estableció una temperatura de alineamiento de 66 °C que nos permitió llevar a cabo la amplificación en una sola reacción (PCR multiplex), en la Figura 24, Panel A, se muestra la imagen digital de la electroforesis llevada a cabo donde, se observaron los productos: el primero para el gen SS01290 en 244 pb, mientras que el segundo corresponde al gen S4646 en 505 pb, en el Panel B se presenta el electroferograma correspondiente con los tamaños específicos de cada uno de los productos.

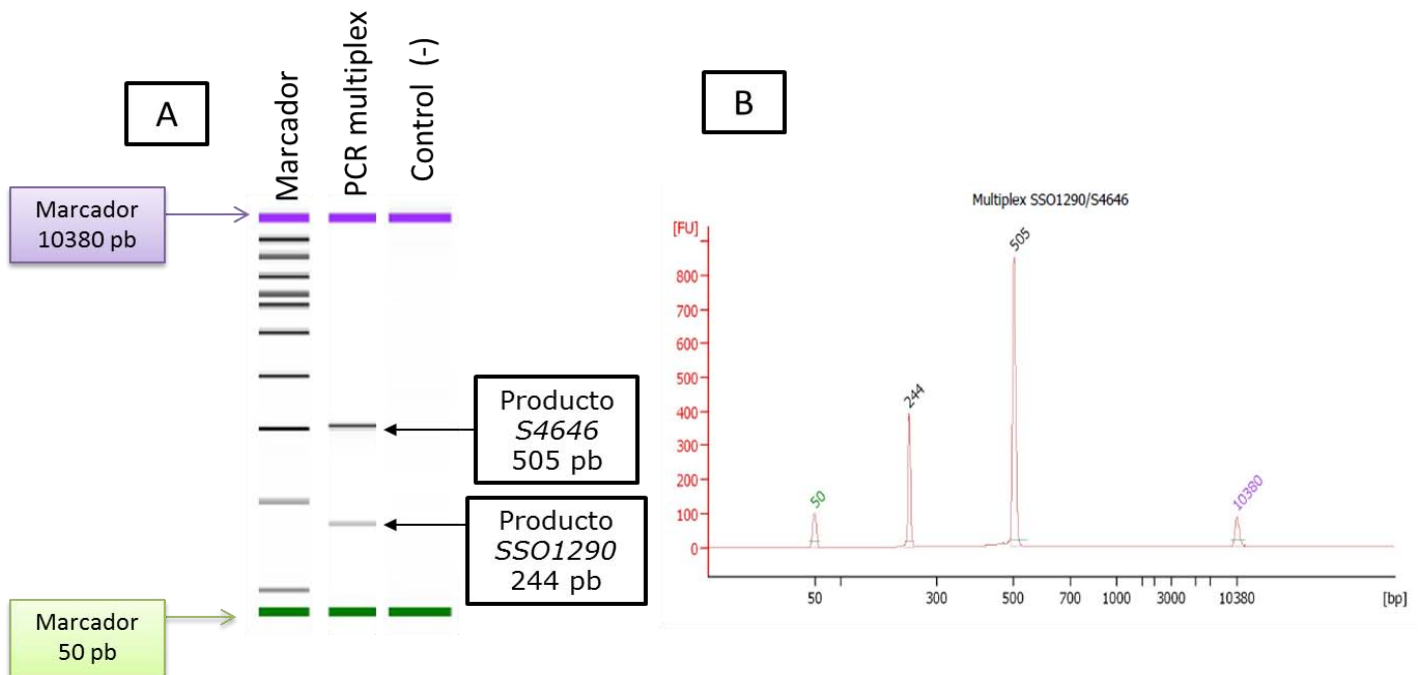


Figura 24. Panel A. Imagen digital de la electroforesis realizada con el equipo Bioanalizador Agilent 2100 correspondiente a la reacción de PCR con los iniciadores diseñados para los genes SSO1290 y S4646 en las cepas de *S. sonnei* y *S. flexneri*; en el Panel B se observa el Electroferograma de fluorescencia vs pares de bases donde se observan los picos correspondientes a los productos de SSO1290 (244 pb) y S4646 (505 pb). (Ver gel de agarosa en apéndice 3).

El gen S4646, exclusivo de *S. flexneri*, codifica para una ribonucleasa Z, que tiene un papel importante en diversas funciones del metabolismo celular, como por ejemplo, permite la compactación de ribonucleótidos en el entorno extracelular, el reciclaje de los mismos y en el control de la estabilidad de los mRNAs específicos, este gen presenta ortólogos en otras especies, sin embargo entre las cepas de *Shigella* es específico para *S. flexneri* y esto se comprobó mediante un análisis en BLAST, por lo tanto fue específico para diferenciar de la cepa de *S. sonnei* [Condon y Putzer, 2002].

Por otra parte, el gen SSO1290 exclusivo de *S. sonnei*, codifica para proteína una hipotética, al realizar un BLAST [Altschul *et. al.*, 1997] de este gen, no se encuentra presente en otras cepas de *Shigella*, concordando con los resultados que se obtuvieron del pangenoma, donde este gen es exclusivo de *S. sonnei*, mismo que se pudo comprobar con la PCR monoplex y la PCR multiplex donde no hay amplificación para la cepa de *S. flexneri*.

Por lo que podemos decir, que ambos genes utilizados para la identificación y diferenciación de las especies de *Shigella* han sido funcionales además de ser importantes en el metabolismo bacteriano, así el gen S4646 de *S. flexneri* está involucrado en la estabilidad del RNA mensajero, mientras que el gen SSO1290 de *S. sonnei* es una proteína hipotética con dominios de hidrolasa, ver modelo en el apéndice 4.

PCR tiempo real

Posteriormente se llevó a cabo una PCR tiempo real, con la finalidad de obtener una mayor especificidad. En el gráfico 6 se muestran las curvas de amplificación con los iniciadores y sondas diseñadas para el gen SOO1290 específico de *S. sonnei*, la amplificación se comienza a observar a partir del ciclo 20 aproximadamente.

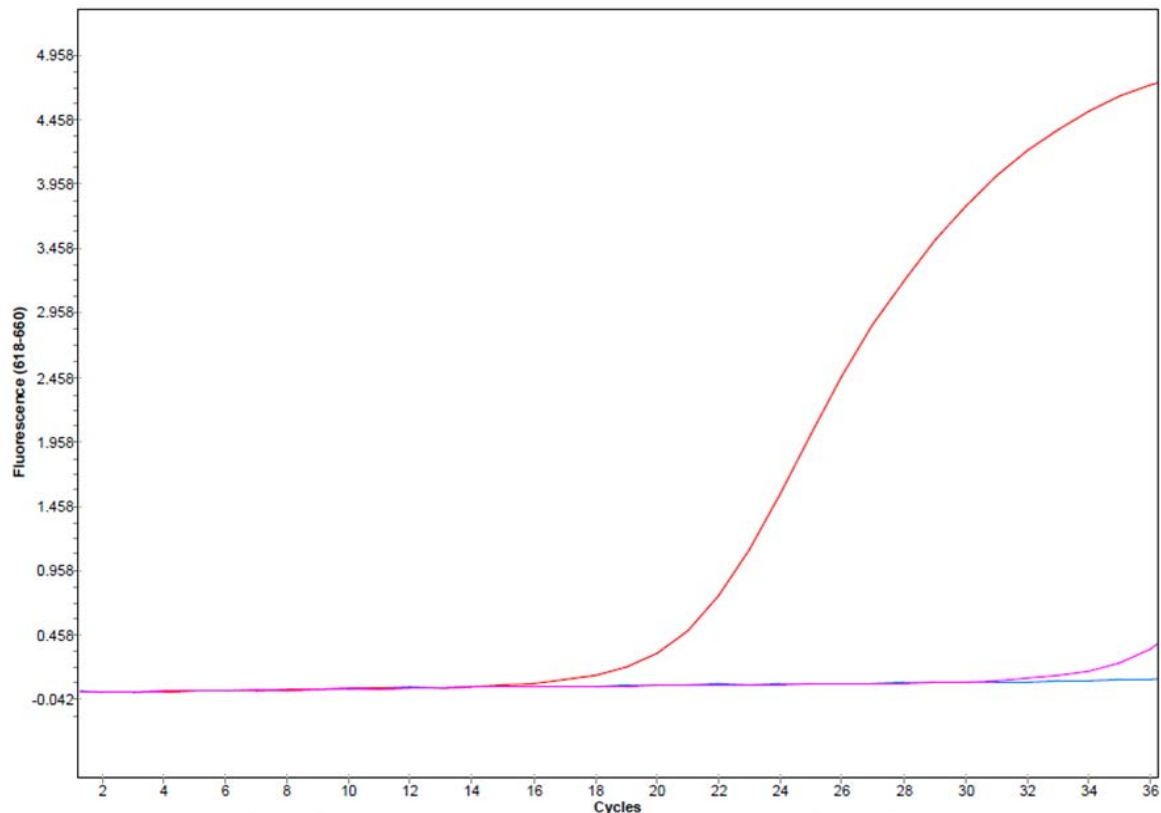


Gráfico 6. Ciclos vs Fluorescencia. Se presentan las curvas de amplificación con los iniciadores y sondas diseñadas para el gen SSO1290; Rojo: *S. sonnei*; Rosa: *S. flexneri*; Azul: *E. coli* O103:H25

En el gráfico 7 se muestran las curvas de amplificación con los iniciadores y sondas diseñadas para el gen S4646 específico de *S. sonnei*, la amplificación se comienza a observar a partir del ciclo 15 aproximadamente.

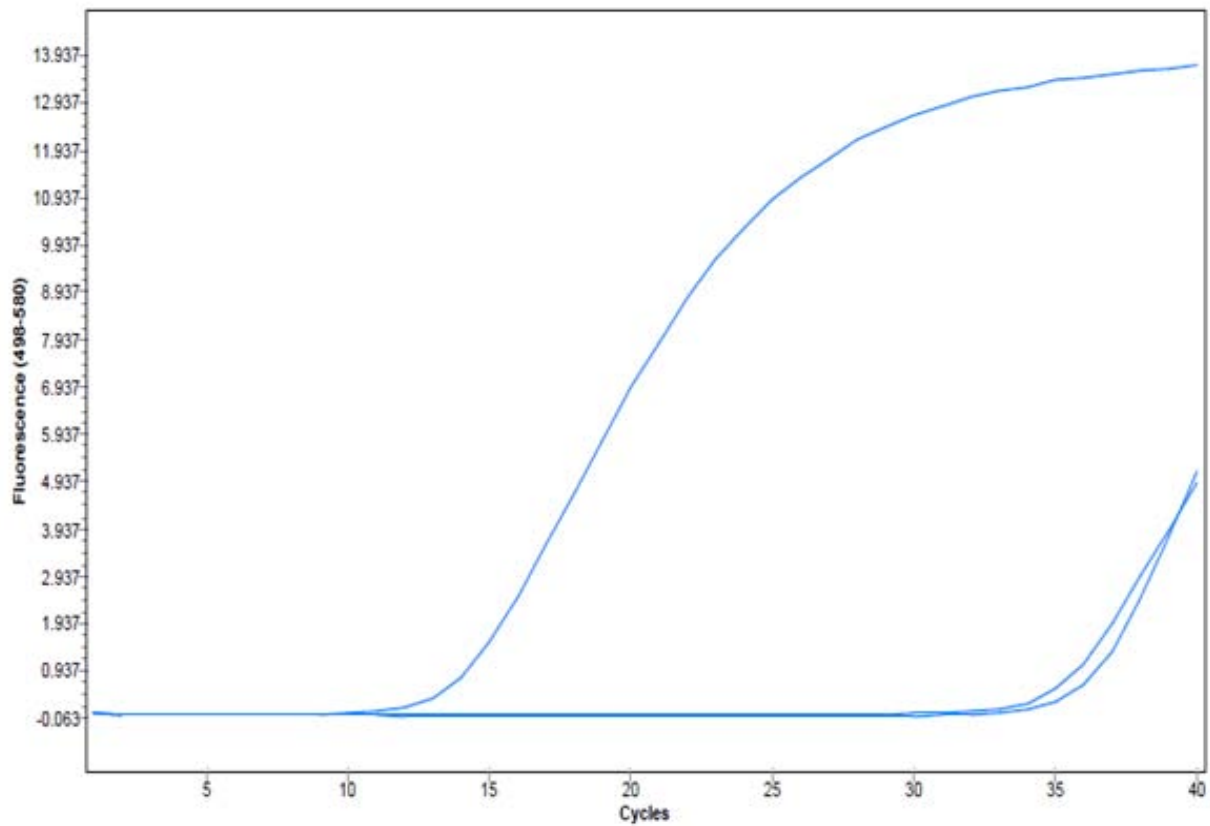


Gráfico 7. Ciclos vs Fluorescencia. Se presentan las curvas de amplificación con los iniciadores y sondas diseñadas para el gen S4646; la curva que comienza a amplificar en el ciclo 15 pertenece a *S. flexneri*, mientras que las otras 2 líneas en las que no se observa amplificación pertenecen a *S. sonnei* y *E. coli* O103:H25.

7.6 SECUENCIACIÓN

Para corroborar la identidad de los productos de amplificación obtenidos en la PCR punto final, se llevó a cabo la secuenciación de los mismos. Obteniendo la secuencia sólo de los productos para los genes *ipaH* de *Shigella* spp y SSO1290 de *S. sonnei*.

En la figura 25 se muestran los electroferogramas obtenidos de los productos de amplificación secuenciados para el gen *ipaH* de *Shigella* spp.

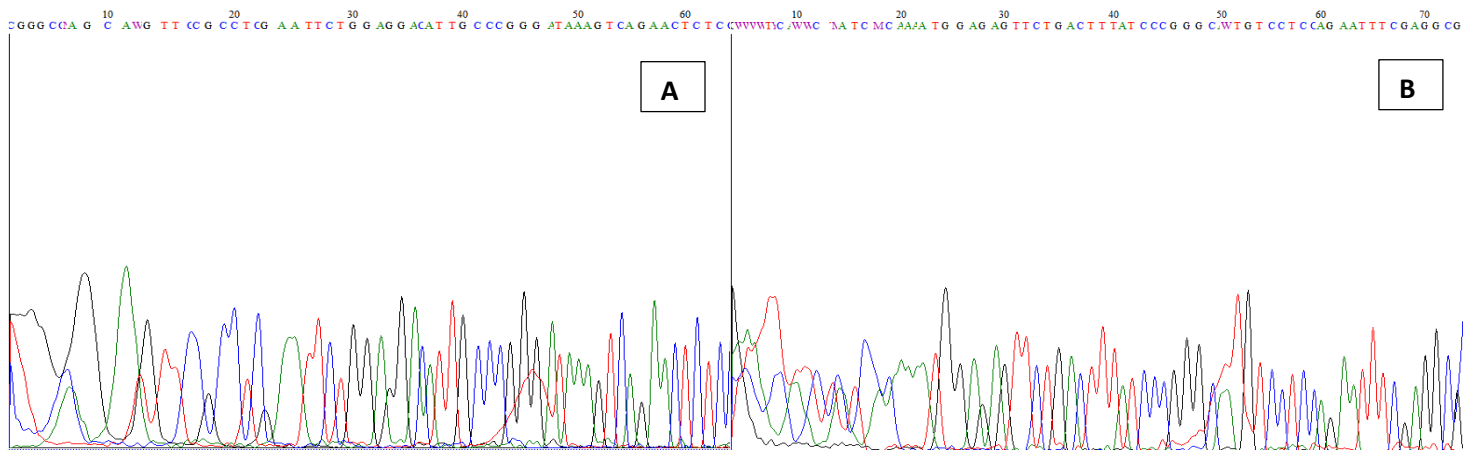


Figura 25. Edición de Electroferogramas con el programa Chromas. En el panel A se presenta la secuencia del Forward y en el Panel B la del Reverse.

Una vez realizada la edición se convirtieron en archivos de texto con extensión *.fasta y se compararon mediante alineamientos múltiples con la secuencia de referencia obtenida del Gen Bank.

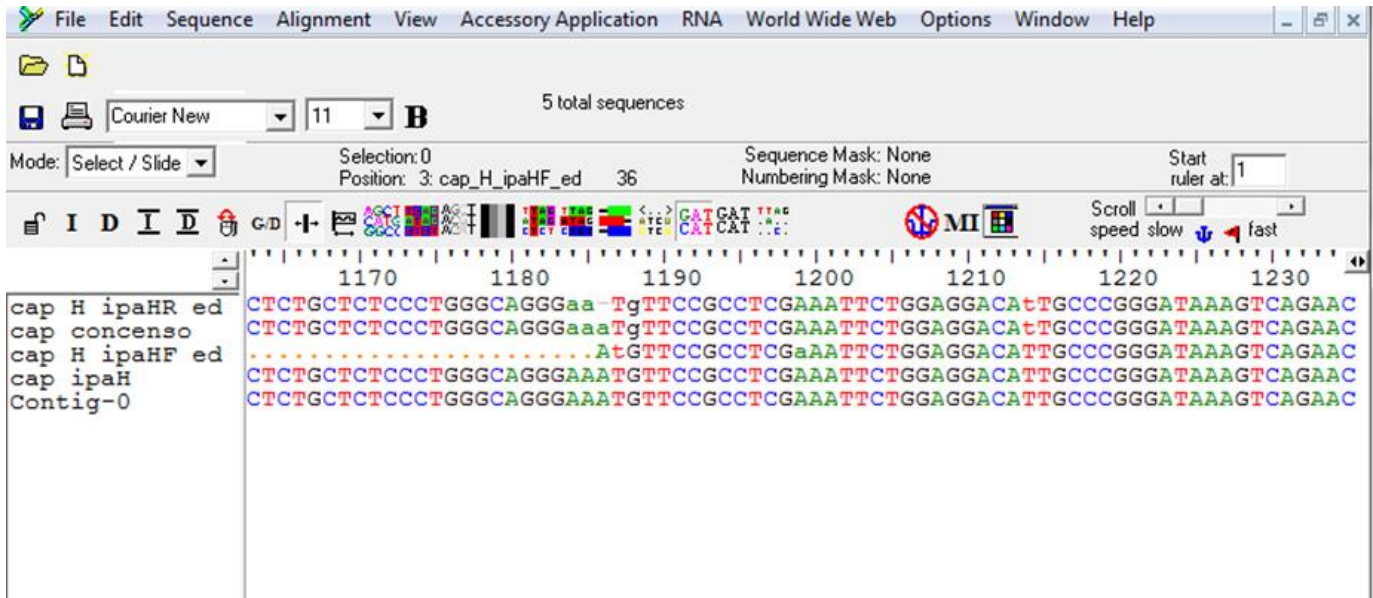


Figura 26. Alineación Múltiple de Secuencias con el programa BioEdit.

En la figura 27 se muestran los electroferogramas obtenidos de los productos de amplificación secuenciados para el gen SSO1290 de *S. sonnei*.

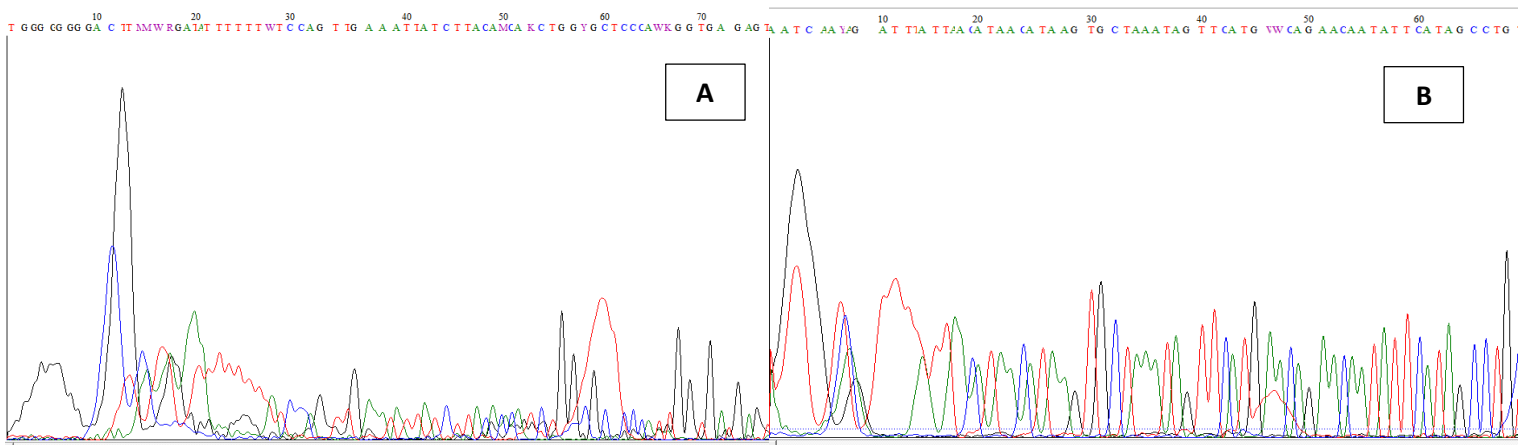


Figura 27. Edición de Electroferogramas con el programa Chromas. En el panel A se presenta la secuencia del Forward y en el Panel B la del Reverse.

Una vez que se realizó la edición se convirtieron en archivos de texto con extensión *.fasta y se compararon mediante alineamientos múltiples con la secuencia de referencia obtenida del Gen Bank (Figura 28).

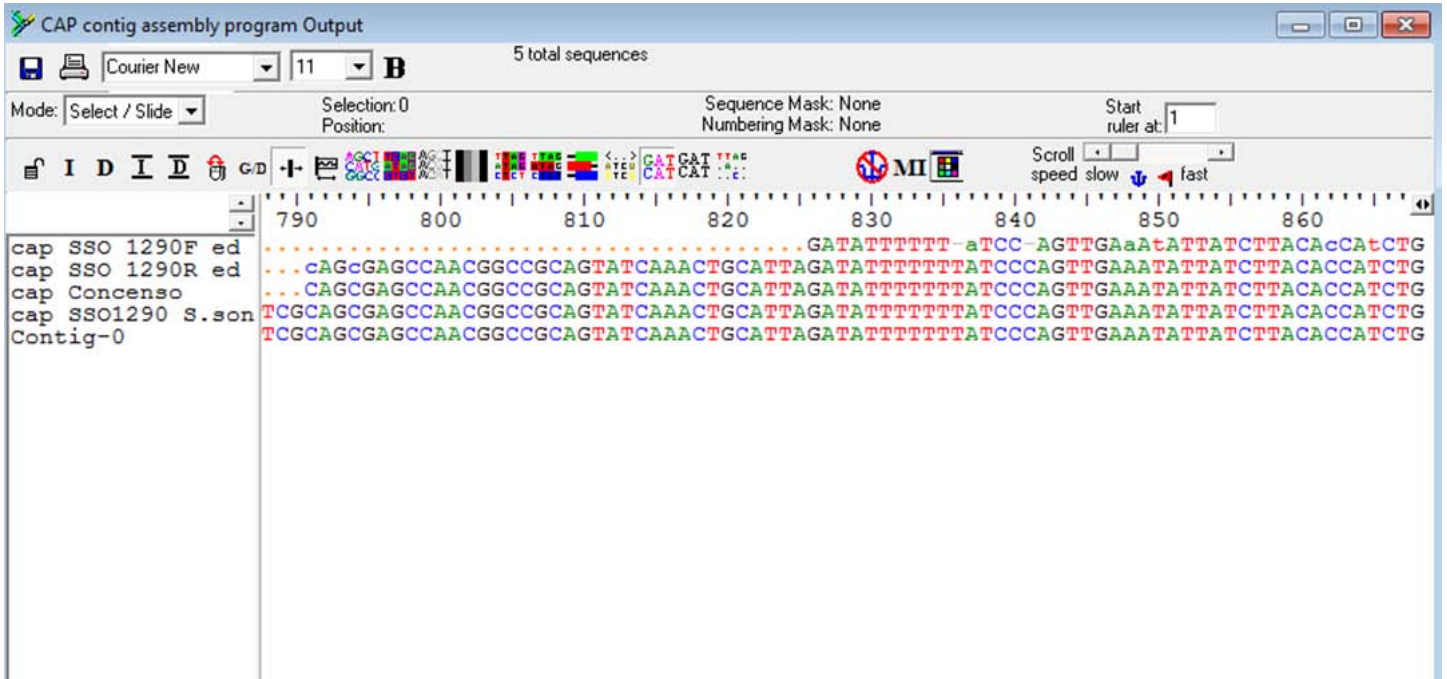


Figura 28. Alineación Múltiple de Secuencias con el programa BioEdit.

Las secuencias consenso se marcan en las figuras 29 y 30, con estas se realizó un BLAST corroborando la identidad de los genes y encontrando que el fragmento secuenciado para el gen *ipaH* solo se alinea con cepas de las diferentes especies de *Shigella*, mientras que el fragmento que pertenece al gen SSO1290 solo se alinea con cepas de *S. sonnei*, sin embargo también lo hace con distintas cepas de *E. coli*, por lo que en se propuso un diagrama de flujo para la identificación de estas cepas bacterianas, el cual se presenta en la discusión de resultados.

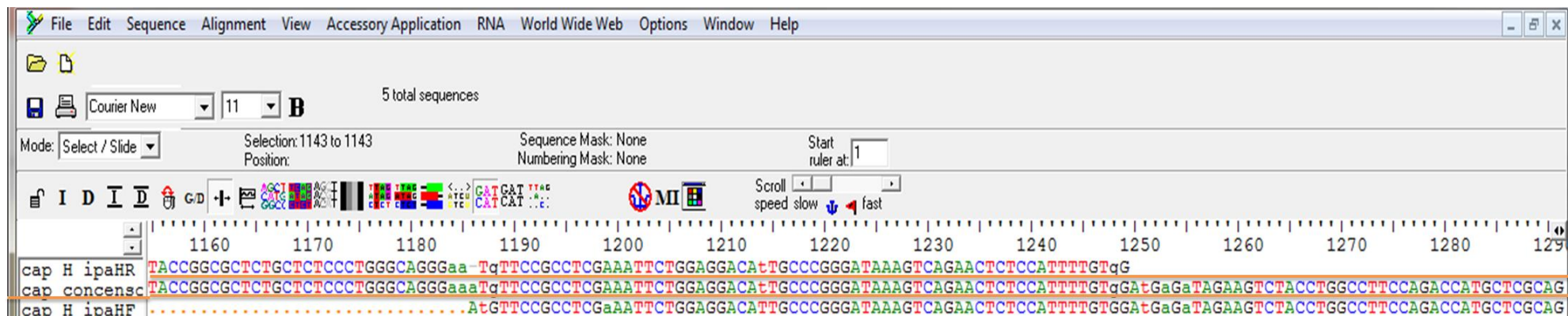


Figura 29. Alineamiento. Se muestra el alineamiento completo realizado en BioEdit con los resultados obtenidos para el gen *ipaH*, la secuencia consenso obtenida se encuentra marcada.

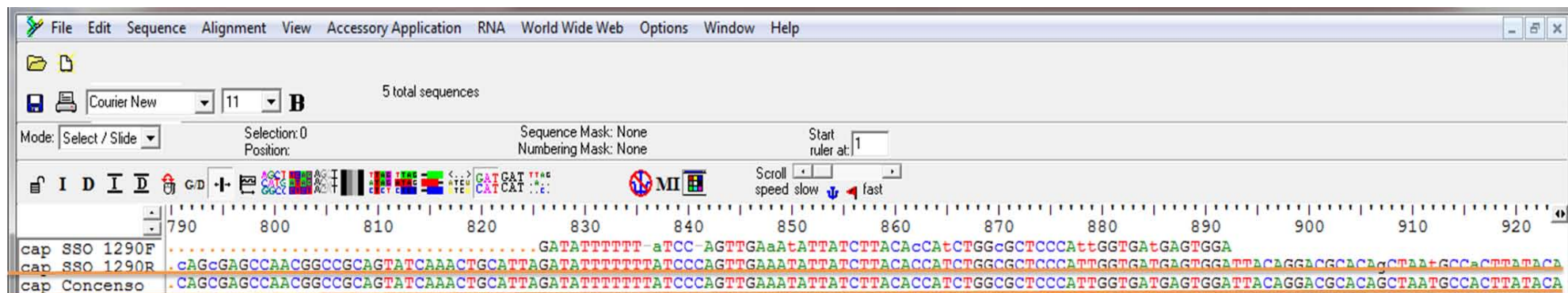


Figura 30. Alineamiento. Se muestra el alineamiento completo realizado en BioEdit con los resultados obtenidos para el gen SSO1290, la secuencia consenso obtenida se encuentra marcada.

8. DISCUSIÓN

Las enterobacterias se encuentran entre las mayores causantes de ETA's en el mundo. Entre estas, se encuentran *E. coli* y *Shigella* spp, las cuales se ha reportado que poseen una estrecha relación sugiriendo incluso que se tratan de la misma especie [Lukjancenko *et. al.*, 2010]. Con base en estos estudios se han desarrollado diferentes métodos para su identificación.

En 2011 Pavlovic y colaboradores desarrollaron una PCR multiplex en tiempo real utilizando el gen *lacY* para diferenciar *E. coli* de las especies de *Shigella*, encontrando una alta especificidad.

En 2014 Binet y colaboradores desarrollaron una PCR multiplex para diferenciar las especies de *Shigella* y *E. coli*, para ello utilizaron los genes *ipaH*, *mxiC* y *virB* encontrando que todos los aislados analizados tuvieron amplificación para las especies de *Shigella* al igual que las especies de *E. coli* enteroinvasiva.

En el presente estudio se utilizaron los genes *lacY* e *ipaH* para diferenciar los dos géneros. Como se había reportado en estudios anteriores, ambos genes tienen alta especificidad por lo que se utilizaron para la diferenciación. Los iniciadores empleados fueron los reportados por Khot y colaboradores en 2013, quienes realizaron pruebas bioquímicas y PCR punto final para lograr la diferenciación y posteriormente una espectrometría de masas logrando la identificación. Para el caso del presente estudio se realizó un diseño de sondas específicas para las regiones que amplifican estos iniciadores y con ello se observó una mayor especificidad de la reacción, eliminando productos inespecíficos. Así mismo se obtuvo mayor sensibilidad (1 ng/μL).

Por otro lado se realizó, la identificación de las especies de *Shigella: flexneri* y *sonnei*, las cuales tiene una distribución global siendo las especies asiladas con mayor frecuencia en el mundo [Kotloff *et al.*, 1999], además de que existen pocos estudios enfocados a la diferenciación de las especies de *Shigella*.

Ejemplo de ello, Chandra y colaboradores en 2013, realizaron una PCR multiplex para lograr diferenciar a las especies de *Shigella* utilizando genomas de referencias y secuencias plasmídicas obteniendo resultados exitosos.

Para el presente estudio se tomó como enfoque el análisis de los genomas de *Shigella* mediante un análisis de genómica comparativa; el cual informa los genes que pertenecen al core y pangenoma, siendo estos los más importantes ya que son genes accesorios o particulares de cada serotipo que no se comparten entre especies.

Con base en este análisis de pangenoma se obtuvieron los genes únicos no reportados con anterioridad para lograr diferenciar entre las especies de *S. flexneri* (gen S4646) y *S. sonnei* (gen SSO1290).

El primero de éstos codifica para una ribonucleasa, las cuales tienen un papel importante en las bacterias puesto que permiten la compactación de los ribonucleótidos desde el entorno extracelular y en el control de la expresión génica mediante la alteración de la estabilidad del ARNm específico [Condon y Putzer *et al.*, 2002], ampliamente estudiadas en *Escherichia coli*. Sin embargo, es interesante que solo se haya encontrado presente en *S. flexneri*. Esto se debe posiblemente a la reducción del genoma de esta bacteria en comparación con las otras especies. El tamaño del genoma de *E. coli* es de 4.6 Mb, mientras que el de *Shigella* se encuentra en 4.3 Mb.

La especificidad se observó mediante los ensayos realizados de PCR punto final y tiempo real en donde solo existe amplificación para *S. flexneri*.

Para el segundo gen SSO1290 presente exclusivamente en *S. sonnei*, resultado del análisis de Pangenoma y de las reacciones de PCR, este gen aún no se encuentra del todo descrito, pero se sabe que codifica para la una proteína hipotética con dominios de hidrolasa. Esto se pudo corroborar mediante un modelado de la estructura terciaria de la proteína. (Ver apéndice)

Por lo antes mencionado se puede decir que se encontraron dos genes específicos para la identificación de *S. sonnei* y *S. flexneri*.

Así entonces en este trabajo se desarrolló una metodología planteada en la figura 31 para la identificación de estas bacterias, la cual consiste como primer paso en diferenciar los géneros de *Shigella* y *Escherichia* mediante una PCR multiplex o tiempo real. En el caso de que el resultado sea positivo para *Shigella*, amplificando el gen *ipaH*, se procede a una diferenciación entre especies mediante los genes S4646 (*S. flexneri*) y SSO1290 (*S. sonnei*).

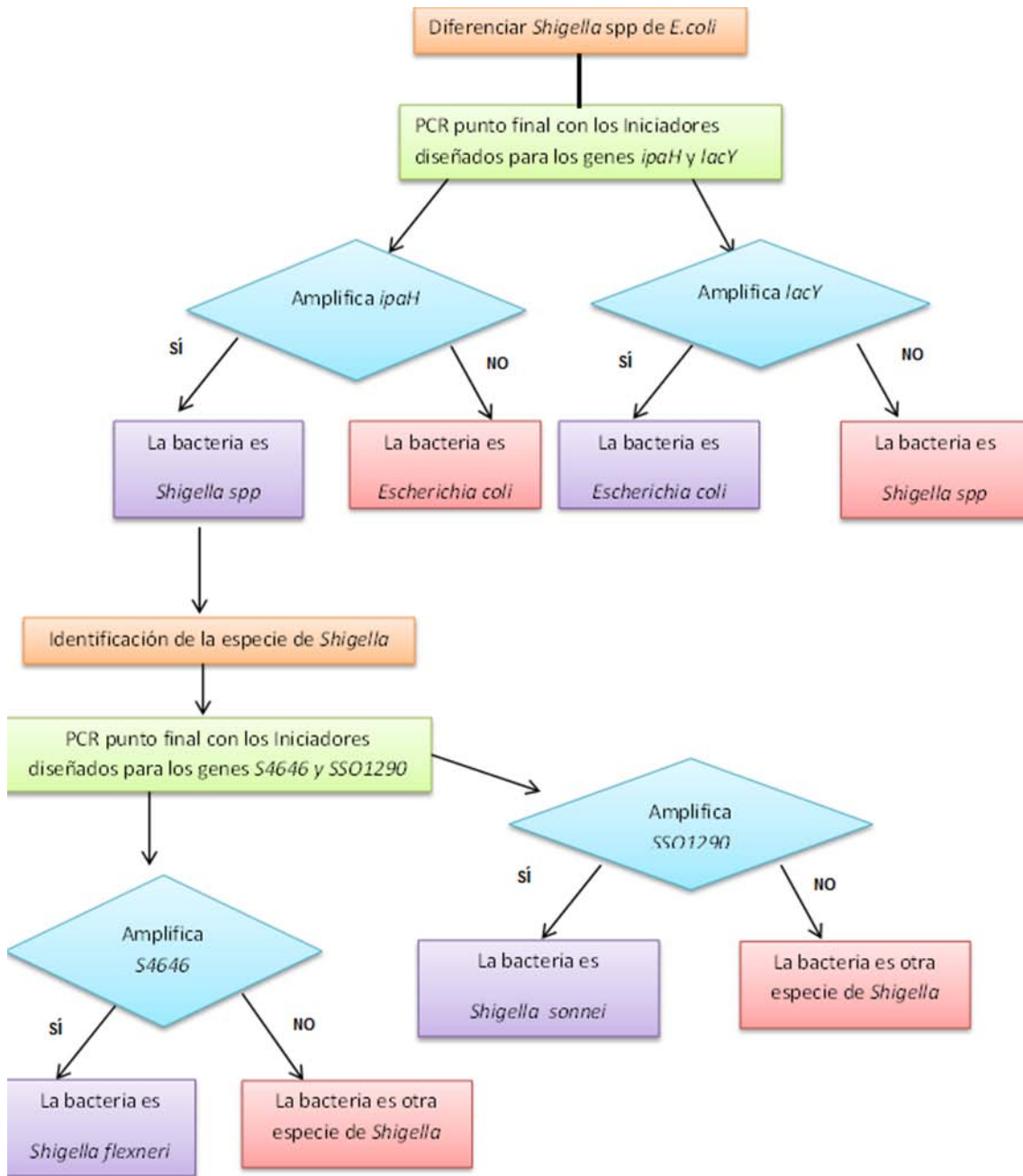


Figura 31. Diagrama de flujo para la identificación de las cepas bacterianas en estudio.

La metodología desarrollada servirá para realizar la identificación de las cepas bacterianas en SENASICA, con mayor sensibilidad, especificidad y en un menor tiempo de análisis comparado con pruebas bioquímicas, metodología actualmente utilizada, para cuando se reciban en la institución o en los laboratorios móviles muestras presuntamente contaminadas con estos agentes bacterianos.

9.0 CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares identificados (*ipaH*, *lacY*, S4646 y SSO1290) permitieron diferenciar a los géneros de *Shigella* y *Escherichia*; así como a las especies de *S. flexneri* y *S. sonnei*.

Mediante genes específicos (*ipaH*, *lacY*, S4646 y SSO1290) se logró el desarrollo de técnicas moleculares como la PCR multiplex y qPCR con la cuales se obtuvo mayor sensibilidad y especificidad para la identificación de las cepas de *Shigella* spp, *E. coli*, *S. flexneri* y *S. sonnei*.

Los fragmentos amplificados para los genes *ipaH* y SSO1290, secuenciados por secuenciación capilar, demostraron que son específicos para la diferenciación de las especies.

Los resultados obtenidos contribuyen al diagnóstico llevado a cabo por el SENASICA para identificación de las bacterias en estudio, teniendo una técnica más rápida, específica y con mayor sensibilidad, comparado con pruebas bioquímicas, metodología actualmente utilizada.

10. PROSPECTIVAS

Estandarizar la metodología con las especies de *Shigella* que quedaron pendientes: *S. boydii* y *S. dysenteriae*.

Realizar la secuenciación de los productos de amplificación de los genes *lacY*, S4646, así como de lo que se obtengan para las cepas de *S. boydii* y *S. dysenteriae*.

Realizar la caracterización molecular del gen SSO1290 de *S. sonnei* para comprender la importancia en la biología de la bacteria.

11. REFERENCIAS

1. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*; Vol. 25(17), 3389-3402.
2. Batchelor, B.I, J.N. Kimari & R.J. Brindle (1996). Microbiology of HIV associated bacteraemia and diarrhoea in adults from Nairobi, Kenya. *Epidemiol. Infect.* Vol. 117: 139-144.
3. Behjati Sam and Tarpey Patrick (2013). What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract*; Vol. 98(6): pp 236–238.
4. Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A., and Garaizar, J. (2004). *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics*; Vol. 20:798-9.
5. Binet R, Deer DM, Uhlfelder SJ. (2014). Rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay.; *Food Microbiol.* Vol. 40:48-54
6. Blocker, A., P. Gounon, E. Larquet, K. Niebuhr, V. Cabiliaux, C. Parsot, & P. Sansonetti (1999). The tripartite type III secretion of *Shigella flexneri* inserts *IpaB* and *IpaC* into host membranes. *J. Cell Biol.* Vol. 147:683-693.
7. Brenner DJ, Fanning GR, Miklos GV, Steigerwalt AG. (1973). Polynucleotide sequence relatedness among *Shigella* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Vol. 23:1–7
8. Buysse, J. M., C. K. Stover, E. V. Oaks, M. Venkatesan, & D. J. Kopecko. (1987). Molecular cloning of invasion plasmid antigen (*ipa*) genes from *Shigella flexneri*: analysis of *ipa* gene products and genetic mapping. *J. Bacteriol.* Vol. 169:2561-2569.
9. Caballero Torres Ángel E. (2008). *Temas de Higiene de los Alimentos*. La Habana, Editorial Ciencias Médicas.

10. Castagnino, J. M. (2006). Nanotecnología, microchips y microarreglos. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*; Vol. 40. 161-163.
11. Chandra Suvash Ojha, Chan Yean Yean, Asma Ismail & Kirnpal-Kaur Banga Singh (2013). A Pentaplex PCR Assay for the Detection and Differentiation of *Shigella* Species. *BioMed Research International*. Vol. 13.
12. Chung The Hao, Duy Pham Thanh, Kathryn E. Holt & Nicholas R. Thomson (2016). The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. *Nature Reviews Microbiology*. Online Publication: 1-16
13. Condon, C., & Putzer, H. (2002). The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic acids research* Vol. 30. 5339-5346.
14. Farmer J.J.I., M.T. Kelly. *Manual of Clinical Microbiology* en: A. Balows, W.J.J. Hausler, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC, 1991, pp. 360–383
15. Germani Y, Sansonetti PJ. (2006). The Genus *Shigella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. 3rd Ed. New York: Springer pp. 99-122.
16. Grande Benito A, Gayol Barba P, Redondo Alonso JC & González Hernández P. (1998). Infecciones gastrointestinales prevalentes en pediatría. *Bol Pediatr*; Vol. 38: 220-241.
17. Hernández Cortez Cecilia, Aguilera Arreola Ma. Guadalupe, Castro Escarpulli Graciela (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf Inf Microbiol* Vol. 31: 137-151.

-
18. Jiang, Y., F. Yang, X. Zhang, J. Yang, L. Chen, Y. Yan, H. Nie, Z. Xiong, J. Wang, J. Dong, Y. Xue, X. Xu, Y. Zhu, S. Chen, and Q. Jin (2005). The complete sequence and analysis of the large virulence plasmid pSS of *Shigella sonnei*. Plasmid Vol. 54: 149-159.
 19. Johnson JR. (2000). *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: Machiavellian masqueraders or taxonomic treachery?. J Med Microbiol; Vol. 49:583–585.
 20. Khot D. Prasanna & Fisher Mark A. (2013). Novel Approach for Differentiating *Shigella* Species and *Escherichia coli* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. Journal Clinical of Microbiology. Vol. 55 pag. 3711–3716.
 21. Khot PD, Couturier MR, Wilson A, Croft A, Fisher MA. (2012). Optimization of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry analysis for bacterial identification. J. Clin. Microbiol. Vol. 50: 3845–3852
 22. Kotloff, K.L., J.P. Winickoff, B. Ivanoff, J.D. Clemens, D.L. Swerdlow, P.J. Sansonetti, G.K. Adak, and M.M. Levine. (1999). Global burden of *Shigella* infection: Implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bulletin WHO. Vol. 77: 651-666
 23. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J Vis Exp. Vol. 62: 3923.
 24. Lefebvre J, Gosselin F, Ismail J, Lorange M, Lior H, Woodward D (1995). Evaluation of commercial antisera for *Shigella* serogrouping. J Clin Microbiol; Vol. 33: 1997–2001
 25. León Ramírez Sergio; (2002). Shigelosis (disentería bacilar). Salud en Tabasco, Vol. 8: 22-25.

26. Levine, O.S. and M.M. Levine (1991). House flies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of shigellosis. *Rev. Infect. Dis.* Vol. 13: 688-696.
27. Liu B, Knirel YA, Feng L, Perepelov AV, Senchenkova SN, Wang Q, Reeves PR, Wang L (2008). Structure and genetics of *Shigella* O antigens. *FEMS Microbiol Rev*; Vol. 32:627–653.
28. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* Vol. 4: 357-362.
29. Livio S, Strockbine NA, Panchalingam S, Tennant SM, Barry EM, et al. (2014) *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. *Clin Infect Dis*; Vol. 59: 933–941.
30. Loughlin, E. V., and R. M. Robins-Browne. (2001). Effect of Shiga toxin and Shiga like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* Vol. 3:493-507.
31. Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. (2010). Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb. E col.* Vol 60: 708–720.
32. Márquez Valdelamar Laura Margarita, Serrato Díaz Alejandra y Cerritos Flores René (2004) Secuenciación de Ácidos Nucleicos. Instituto de biotecnología UNAM. México pp 231
33. Maurelli, A. T., B. Baudry, H. d'Hauteville, T. L. Hale & P. J. Sansonetti (1985). Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun*; Vol. 49:164-171.
34. Ménard, R., P. Sansonetti, & C. Parsot (1994). The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J.* Vol. 13:5293-5302.

-
35. Mullis KB. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* Vol. 262: 56-61.
 36. Niyogi SK. (2005). Shigellosis. *The Journal of Microbiology.* Vol. 43: 133–143
 37. Pal Partha, Pal Arunima, Swapan Kumar Niyogi, T. Ramamurthy. and Rupak K. Bhadra (2013). Comparative analysis of the genomes of *Shigella dysenteriae* type 2 & type 7 isolates. *Indian J Med Res;* Vol. 137(1): 169–177.
 38. Paniagua GL, Monroy E, García-González O, Alonso J, Negrete E, Vaca S. (2007) **“Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children”**. *Annals Clin Microbiol and Antimicrobials;* Vol. 6: 1-8
 39. Pavlovic M, Luze A, Konrad R, Berger A, Sing A, Busch U & Huber I. (2011) Development of a duplex real time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp; *J Appl Microbiol.;* Vol. 110(5):1245-51
 40. Pupo GM, Lan R, Reeves PR (2000). Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 97:10567–10572.
 41. Ram P, Crump J, Gupta S, Miller M & Mintz E (2008) Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. *Epidemiol Infect;* Vol. 136: 577–603.
 42. Ranjbar Reza, Afshar Davoud, Mehrabi Tavana Ali, Najafi Ali, Pourali Fatemeh, Safiri Zahra, Sorouri Zanjani Rahim & Jonaidi Jafari Nematollah. (2014). Development of Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Three Pathogenic *Shigella* Species. *J Public Health;* Vol. 43(12): 1657–1663.

-
43. Rohmer, L., Jacobs, M. A., Brittnacher, M. J., Fong, C., Hayden, H. S., Hocquet, D. & Miller, S. I. (2014). Genomic analysis of the emergence of 20th century epidemic dysentery. *BMC genomics*; Vol. 15(1), 355.
44. Sahl JW, Morris CR, Emberger J, Fraser CM, Ochieng JB, Juma J, Fields B, Breiman RF, Gilmour M, Nataro JP & Rasko DA. (2015). Defining the phylogenomics of *Shigella* species: a pathway to diagnostics. *J Clin Microbiol*; Vol. 53(3):951-60
45. Saik Randall K., David H. Gelfand, Sussane Stoffel, Stephen J. Scharf, Rusell Higuchi, Glenn T. Horn, Kary B. Mullis, Henry A. Eelich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. Vol. 239: 487-491.
46. Sansonetti, P. J., D. J. Kopecko & S. B. Formal (1982). Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* Vol. 35:852-860.
47. Schroeder Gunnar N. and Hubert Hilbi (2008) Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp: Controlling Host Cell Signaling, Invasion and Death by Tipe III Secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* vol. 21: 134-156
48. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* Vol. 2 pp 70-78.
49. Thompson CN, Duy PT & Baker S (2015). The Rising Dominance of *Shigella sonnei*: An Intercontinental Shift in the Etiology of Bacillary Dysentery. *PLoS Negl Trop*; Vol 9.
50. Tuttle J, Ries A, Chimba R, Perera C, Bean N. (1995). Antimicrobial-resistant epidemic *Shigella dysenteriae* type 1 in Zambia: modes of transmission. *J Infect Dis*; Vol. 171: 371–375.
51. Tyagi S, Kramer FR. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* Vol. 14: 303-308.

52. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*; Vol. 40: e115
53. Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, Lajus A, Le Fèvre F, Longin C, Mornico D, Roche D, Rouy Z, Salvignol G, Scarpelli C, Thil Smith AA, Weiman M, Médigue C. (2013). MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data.
54. Vásquez de Plata Gloria (2003). La Contaminación de los Alimentos, un problema por resolver. *Salud UIS*, Vol. 35: 48-57.
55. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*; Vol. 32: 103.

APENDICES

APÉNDICE 1. ELECTROFORESIS EN EL CHIP DNA 7500

Para comprobar la amplificación del fragmento de interés se realizó una electroforesis de microfluidos en Chip DNA 7500.

1. Encender la computadora.
2. Encender el bioanalizador.
3. Sacar los reactivos de refrigeración y dejarlos a temperatura ambiente por 30 min.
4. Tomar un chip nuevo DNA 7500.
5. Abrir la estación para presurización de chip y colocarlo en su interior, colocar la jeringa en 1mL.
6. Abrir la estación y colocar 9 μ L de la matriz (gel-colorante) en pozo marcado con la letra G.
7. Presurizar el gel bajando el embolo de la jeringa y cerrar la estación del chip registrar 30 seg en el cronometro
8. Abrir la estación y colocar 9 μ L de la matriz (gel-colorante) en los otros dos pozos marcados con la letra G.
9. Pipetear 5 μ L del marcador y colocar en cada uno de los 12 pozos del Chip, además del pozo marcado con la escalera.
10. Pipetear 1 μ L de marcador de peso molecular, y colocar en el pozo marcado con la escalera.
11. Pipetear 1 μ L de las muestras (productos de PCR) y colocar en los pozos a ocupar.
12. Colocar el Chip DNA 7500 en el vórtex para mezclar por 1 min a 2400 rpm en la centrifuga eppendorf 5414R.

13. Pasando el minuto transportar el Chip DNA 7500 al Bioanalizador
14. Seleccionar el protocolo DNA 7500 en el software de la computadora, registrar las muestras, así como lotes de reactivos y CHIP y finalmente esperar que analice las muestra.

APÉNDICE 2. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en el análisis *in silico*.

CEPA	Amplifica <i>ipaH</i>	Amplifica <i>lacY</i>
<i>Escherichia blattae</i> DSM 4481	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0127:H6 E2348/69	-	+
<i>Escherichia coli</i> 042	-	+
<i>Escherichia coli</i> 536	-	+
<i>Escherichia coli</i> 55989	-	+
<i>Escherichia coli</i> ABU 83972	-	+
<i>Escherichia coli</i> APEC O1	-	-
<i>Escherichia coli</i> APEC O78	-	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	+
<i>Escherichia coli</i> B str. REL606	-	+
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	-	+
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	-	+
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3)pLysS AG	-	+
<i>Escherichia coli</i> BW2952	-	+
<i>Escherichia coli</i> CFT073	-	+
<i>Escherichia coli</i> DH1	-	+
<i>Escherichia coli</i> DH1	-	+
<i>Escherichia coli</i> E24377A	-	+
<i>Escherichia coli</i> ED1a	-	+
<i>Escherichia coli</i> ETEC H10407	-	+
<i>Escherichia coli</i> HS	-	+
<i>Escherichia coli</i> IAI1	-	+
<i>Escherichia coli</i> IAI39	-	+
<i>Escherichia coli</i> IHE3034	-	-
<i>Escherichia coli</i> JJ1886	-	+
<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. W3110	-	+
<i>Escherichia coli</i> KO11FL	-	+
<i>Escherichia coli</i> KO11FL	-	+
<i>Escherichia coli</i> LF82	-	+
<i>Escherichia coli</i> LY180	-	+
<i>Escherichia coli</i> NA114	-	+
<i>Escherichia coli</i> O103:H2 str. 12009	-	+
<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 2009EL-2050	-	+
<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 2009EL-2071	-	+
<i>Escherichia coli</i> O104:H4 str. 2011C-3493	-	+
<i>Escherichia coli</i> O111:H- str. 11128	-	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	-	+

<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4115	-	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai	-	+
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. TW14359	-	+
<i>Escherichia coli</i> O26:H11 str. 11368	-	+
<i>Escherichia coli</i> O55:H7 str. CB9615	-	+
<i>Escherichia coli</i> O55:H7 str. RM12579	-	+
<i>Escherichia coli</i> O7:K1 str. CE10	-	+
<i>Escherichia coli</i> O83:H1 str. NRG 857C	-	+
<i>Escherichia coli</i> P12b	-	+
<i>Escherichia coli</i> PMV-1	-	-
<i>Escherichia coli</i> S88	-	-
<i>Escherichia coli</i> SE11	-	+
<i>Escherichia coli</i> SE15	-	+
<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	-	+
<i>Escherichia coli</i> UM146	-	-
<i>Escherichia coli</i> UMN026	-	+
<i>Escherichia coli</i> UMNK88	-	+
<i>Escherichia coli</i> UT189	-	-
<i>Escherichia coli</i> W	-	+
<i>Escherichia coli</i> W	-	+
<i>Escherichia coli</i> Xuzhou21	-	+
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. DH10B	-	+
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MDS42 DNA	-	+
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655	-	+
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. W3110	-	+
<i>Escherichia coli</i> str. clone D i14	-	+
<i>Escherichia coli</i> str. clone D i2	-	+
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	-	-

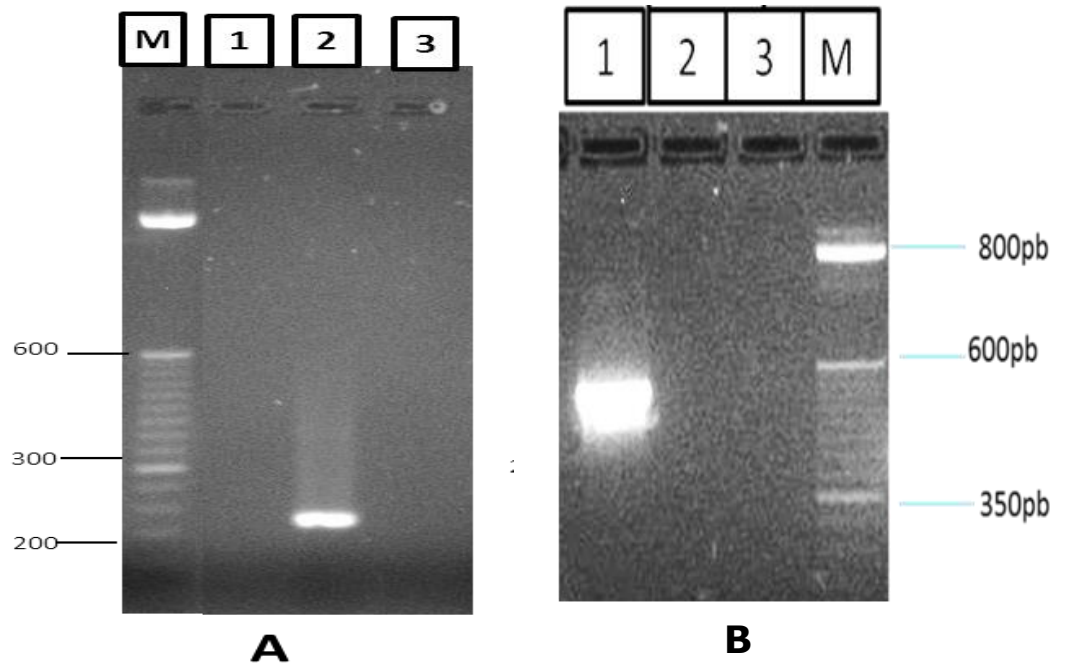


Figura B. Gel de agarosa al 2% correspondiente a la reacción de PCR. PANEL A con los iniciadores diseñados para el gen *SSO1290*; 1. *S. flexneri*; 2. *S. sonnei*; 3. *E. coli* O103H25 (C-), se observa un producto de amplificación de aproximadamente 250 pb para *S. sonnei*. PANEL B con los iniciadores diseñados para el gen *S4646*; 1. *S. flexneri*; 2. *S. sonnei*; 3. *E. coli* O103H25 (C-), se observa un producto de amplificación de aproximadamente 500 pb para *S. flexneri*.

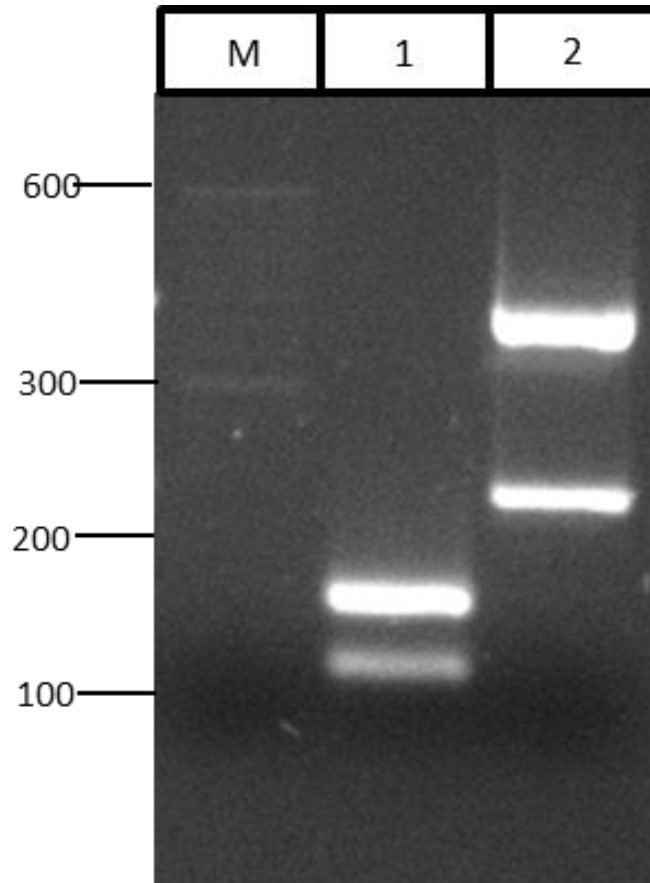


Figura C. Gel de agarosa al 2% correspondiente a la reacción de PCR multiplex.

En el carril 1 se presentan los productos correspondientes a la reacción para la identificación y diferenciación de *Shigella* y *E. coli* se observa el producto de amplificación para *lacY* en aproximadamente 110 pb y el producto de *ipaH* con un tamaño de aproximadamente 150pb. En el carril 2 se observan los productos de amplificación correspondientes a la reacción para la identificación y de las especies de *S. sonnei* y *S. flexneri*, se observa un producto que corresponde al gen S4646 de *S. flexneri* de aproximadamente 506 pb, y el producto para el gen SS01290 de *S. sonnei* en aproximadamente 250 pb.

APÉNDICE 4. Modelo de proteína para el gen SSO1290.

Top model

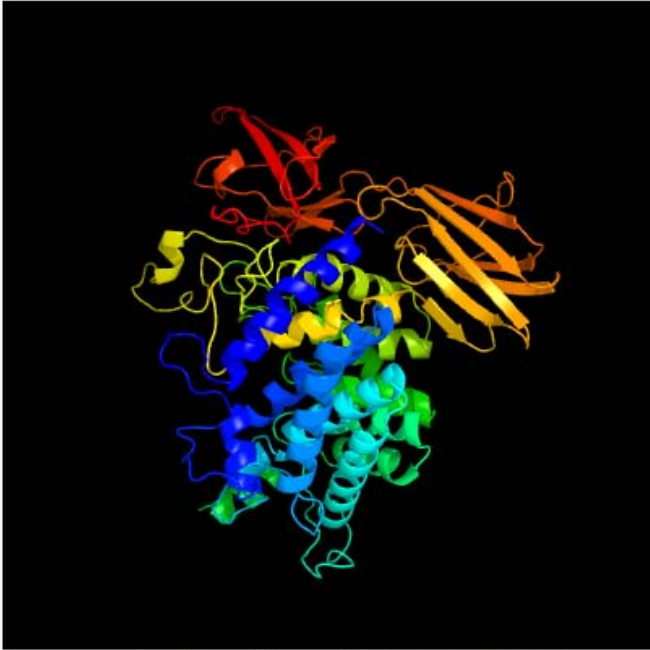


Image coloured by rainbow N → C terminus

Model dimensions (Å): **X**:58.793 **Y**:74.033 **Z**:65.704

Model (left) based on template [c4qk0C](#)

Top template information

PDB header:hydrolase
Chain: C: **PDB Molecule:**gh127 beta-l-arabinofuranoside;
PDBTitle: crystal structure of ara127n-se, a gh127 beta-l-arabinofuranosidase2 from geobacillus stearothermophilus t6

Confidence and coverage

Confidence: **100.0%** Coverage: **92%**

570 residues (92% of your sequence) have been modelled with 100.0% confidence by the single highest scoring template.

3D viewing

[Interactive 3D view in JSmol](#)

For other options to view your downloaded structure offline see the [FAQ](#)

Figura D. Modelo de proteína para el gen SSO1290.