



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**DISEÑO DE PRIMERS PARA PCR  
MULTIPLEX PARA EL DIAGNÓSTICO  
MOLECULAR DE *Shigella spp*,  
*Enterococcus spp*, *Salmonella spp* y *E.  
coli*, CON RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS  
BETA-LACTÁMICOS Y QUINOLONAS.**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA  
DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A

ANA LAURA VILLAGÓMEZ O HARA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2021



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Maritere Domínguez Rojas.

**Nothing of me is original. I  
am the combined effort of  
everyone I've ever known.**

- Chuck Palahniuk

---

---

## ÍNDICE

Índice .....	1
Términos y definiciones .....	3
Índice de figuras .....	4
Índice de tablas .....	6
Resumen .....	7
Introducción.....	9
Capítulo 1. PCR	
1.1 Concepto .....	9
1.2 Componentes de la PCR.....	9
1.3 Etapas de la PCR .....	11
1.4 PCR multiplex .....	14
1.5 PCR multiplex para el diagnóstico de patógenos.....	15
1.6 Electroforesis .....	18
1.7 Software para biología molecular .....	18
Capítulo 2. Primers	
2.1 Generalidades .....	21
2.2 Diseño.....	23
2.3 Controles .....	26
2.4 Análisis .....	27

---

---

Capítulo 3. Diarrea	
3.1 Concepto .....	31
3.2 Agentes causantes de diarrea.....	31
3.3 Diagnóstico.....	33
Capítulo 4. Resistencia antimicrobiana	
4.1 Concepto.....	35
4.2 Origen .....	35
4.3 Tipos de resistencia .....	35
4.4 Mecanismos de resistencia antimicrobiana .....	36
4.5 Importancia y prevalencia .....	38
4.6 Identificación .....	39
Justificación .....	42
Objetivos .....	43
Material y métodos .....	44
Resultados y discusión .....	45
Conclusiones.....	63
Literatura citada.....	64

---

---

## TÉRMINOS Y DEFINICIONES

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**bp:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa. Método utilizado para obtener copias de un fragmento de DNA.

**Tm:** Temperatura de fusión. Temperatura a la que el 50% de una cadena doble de DNA se encuentra unida a su parte contraria y el otro 50% se encuentra libre en la solución.

**Ta:** Temperatura de alineamiento. Temperatura a la que los primers se unen a la cadena molde.

**Electroforesis:** Técnica utilizada para separar fragmentos de DNA con base en su tamaño mediante su exposición a una carga eléctrica

**Resistencia antimicrobiana:** Mecanismo que desarrollan las bacterias que permite que dejen de responder ante el mecanismo de acción de determinados antibióticos.

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Representación de las etapas de la PCR para obtener el amplificado de un fragmento específico
- FIGURA 2. Representación de la amplificación exponencial de un fragmento de DNA específico mediante la PCR
- FIGURA 3. Indicaciones para insertar un primer de manera manual en una secuencia en la herramienta de SnapGene
- FIGURA 4. Representación de la delimitación del fragmento a amplificar mediante los primers complementarios a la cadena
- FIGURA 5. Representación de la delimitación de la cadena molde mediante el uso de primers
- FIGURA 6. Representación de un nucleótido en la que se observa la numeración de los carbonos que dan el sentido de la cadena
- FIGURA 7. Captura de pantalla de la Herramienta Primer-BLAST
- FIGURA 8. Representación de la formación de dímeros
- FIGURA 9. Patrón obtenido para resistencia simple y múltiple de cepas mltiresistentes utilizando PCR multiplex
- FIGURA 10. Patrón obtenido para cepas resistentes a EMB
- FIGURA 11. Captura de pantalla de GenBank con los resultados para el gen *invA* para la identificación de *Salmonella*
- FIGURA 12. Resultado de FASTA de la secuencia utilizada para la identificación de *Salmonella*
- FIGURA 13. Captura de pantalla de Primer-BLAST
- FIGURA 14. Captura de pantalla de los resultados de primers de Primer-BLAST para *Salmonella*
- FIGURA 15. Captura de pantalla del resultado ThermoFisher Multiple Primer Analyzer para los primers diseñados
- FIGURA 16. Resultados de BLAST del primer Reverse para TEM-1
- FIGURA 17. Resultados de BLAST para la secuencia GGACAGCGCTTGAAATGCTT (reverse primer de *Salmonella*)



---

FIGURA 18 Electroforesis in silico de los amplificadores obtenidos

FIGURA 19 Electroforesis in silico de los amplificadores obtenidos en un solo carril

FIGURA 20 Captura de pantalla del software Snapgene

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

- TABLA 1. Ejemplos de DNA polimerasas con sus características.
- TABLA 2. Resultados de los resultados positivos mediante la técnica convencional y PCR para el diagnóstico de enfermedades causantes de diarrea.
- TABLA 3 Organismos que ocasionan diarrea en el humano
- TABLA 4 Enterobacterias importantes desde el punto de vista clínico
- TABLA 5 Genes objetivo de amplificado para la identificación de organismos, resistencia a antibióticos y controles
- TABLA 6 Primers obtenidas para amplificación y sus características fisicoquímicas
- TABLA 7 Parámetros establecidos para la obtención de primers en Primer-BLAST

---

---

## RESUMEN

La diarrea infecciosa es una de las principales causas de mortalidad en niños. Su diagnóstico etiológico principalmente se realiza mediante un coprocultivo. El tratamiento para una diarrea aguda debe comenzar a más tardar a los 3 días en que comienza la presentación de los síntomas. Los resultados de un coprocultivo suelen tardar de 2 a 3 días, hasta 7 días. Debido a este tiempo de espera, es necesario desarrollar un método de diagnóstico más eficiente y que requiera de un menor tiempo para tener resultados. Ya que es considerado como un padecimiento común no se cuentan con datos de morbilidad o mortalidad; sin embargo, se encuentra dentro de las primeras 5 causas de muerte en niños menores de 4 años y dentro de las primeras 10 en muertes relacionadas a adultos.

La PCR multiplex es un método de diagnóstico molecular que permite conocer si una secuencia específica de DNA se encuentra en una muestra. De esta manera permite la identificación de distintos microorganismos dentro de una misma reacción. En este caso consiste en la amplificación de un fragmento de DNA de un microorganismo específico para su identificación mediante el uso de oligos cortos conocidos como primers, que son complementarios a la cadena de DNA del organismo que se pretende identificar.

Por estas razones, en este proyecto se diseñaron 8 pares de primers para proponer un diagnóstico por PCR para las bacterias *Shigella spp*, *Enterococcus spp*, *Salmonella spp* y *E. coli*, y determinar si tienen resistencia a los antimicrobianos beta-lactámicos y quinolonas. Se utilizó como control negativo un fragmento de cromosoma X de *Drosophila melanogaster* y como control interno el gen 16s rRNA que se encuentra en todas las bacterias. Con esto se pretende proponer un método de diagnóstico de enterobacterias más rápido y económico.

En la base de datos de GenBank se obtuvieron y seleccionaron los genes de interés para el diagnóstico. Con las secuencias se obtuvieron los 9 pares de primers utilizando la herramienta de Primer-BLAST que dan secuencias amplificadas de 71, 544, 132, 188, 101,

---

---

247, 448, 298, 351 y 413 pb. Para la identificación de los organismos se utilizaron los siguientes genes:

- *tuf* para *Enterococcus spp*,
- *invA* para *Salmonella spp*,
- *bfpA* para *E. coli*,
- Para *Shigella* se realizó una PCR duplex para la identificación de los genes *lacY* e *ipaH*

Con la herramienta Multiple Primer Analyzer de ThermoFisher se realizó un análisis bioinformático y se verificó que los primers no formaran dímeros, no se encontraron homodímeros ni heterodímeros. Con la herramienta de Primer-BLAST se verificó que los primers tuvieran un %GC y de Tm similares. Con la herramienta de BLAST se verificó que los primers no fueran complementarios al DNA de otros organismos, encontrando que son específicos para el organismo que se pretende identificar.

Una vez que se verificó que los primers cumplieran con las características de especificidad, %GC, Tm y formación de dímeros, se realizó una electroforesis *in silico* de los amplificados, de acuerdo con el tamaño esperado, con la herramienta de NEBCutter. Se comprobó que el tamaño de los amplificados es ideal para una identificación correcta en un gel de agarosa al 1% con el uso de un indicador de 100 pb. De esta manera se comprobó que los amplificados se separaran correctamente.

---

---

# INTRODUCCIÓN

## Capítulo 1. PCR

### 1.1 Concepto

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por el bioquímico Kary Mullis. Permite obtener copias de un fragmento de DNA a partir de una cantidad mínima de éste (Rodríguez and Bareera 2012). Consiste en una reacción enzimática *in vitro*. Su objetivo es la amplificación directa de un gen o un fragmento de DNA. Para esto utiliza la enzima DNA polimerasa que lleva a cabo el proceso de síntesis del DNA en las células de manera natural durante el proceso de replicación del DNA (Patel et al. 2015). Se utiliza para varios diagnósticos en el área de la biología molecular, el resultado se interpreta de forma positiva o negativa, para identificar si cierta secuencia se encuentra en algún organismo (Ronai and Yakubovskaya 1995).

Se basa en el proceso de replicación del DNA, que se lleva a cabo de manera natural en las células. Consiste en una serie de cambios de temperatura de manera cíclica para que se lleve a cabo la amplificación de un fragmento de un DNA molde (L, Ibarra, and Velasquillo 2013). El cambio de temperatura se determina mediante la composición de nucleótidos de los primers. Haciendo uso del conocimiento del funcionamiento de la DNA polimerasa se determinó que, para poder ejercer su acción, la DNA polimerasa requiere de un sitio al cual anclarse para comenzar a añadir nucleótidos para establecer el fragmento de DNA que se quiere amplificar (Patel et al. 2015).

### 1.2 Componentes de la PCR

Para poder realizar una PCR son necesarios los siguientes componentes:

- **DNA molde:** Se refiere a la muestra de DNA de la que se pretende amplificar el fragmento de DNA, ésta es obtenida de la muestra u organismo de interés. Será a partir de esta cadena de DNA que se formará el amplificado (Rahman et al. 2013).

- **DNA polimerasa:** La DNA polimerasa es la enzima que genera la copia de la cadena del DNA molde. Ésta es una enzima presente en todos los organismos y cada uno de estos últimos tiene una polimerasa específica. Se debe utilizar una DNA polimerasa que soporte altas temperaturas, debido a la temperatura que se alcanza en el proceso de desnaturalización (Rahman et al. 2013). Existen distintas DNA polimerasas, dependiendo del organismo del que se obtuvieron. Generalmente las DNA polimerasas que se utilizan para PCR son obtenidas de organismos termorresistentes, como *Thermus aquaticus* (Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu polymerase), *Thermococcus litoralis* (Wind Tli o Vent polimerasa) y *Thermus thermophilus* (Tth) (Polaina and MacCabe 2007). Las consideraciones a tener para la elección de la DNA polimerasa a utilizar son la estabilidad térmica, la tasa de extensión (la velocidad con la que añade nucleótidos), la fidelidad, y la procesividad (la capacidad de la polimerasa de mantenerse unida a la cadena de DNA molde) (Rahman et al. 2013). A continuación se muestran las características de algunas polimerasas disponibles en el mercado (Tabla 1)

Tabla 1: Ejemplos de DNA polimerasas con sus características. Se mencionan las polimerasas de la marca abm (ABM, <https://www.abmgood.com/Taq-Polymerase.html>)

Característica	TAQ	BESTAQ™	KODAQ	PRECISION™	HOTSTART TAQ	TAQ PLUS	TAQFAST	LONGRANG E	BLOODIRECT
Prueba de lectura	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	No
Fidelidad (vs Taq Nativa)	1X	50X	50X	60X	1X	5X	10X	1X	1X
Especificidad	••	•••	•••	•••	••••	••	•••	•••	••
Velocidad de extensión (por minuto)	1 kb	3-4 kb	1 kb	1 kb	1 kb	1 kb	4-6 kb	3-4 kb	1 kb
Longitud del blanco	6 kb	15 kb	12 kb	6 kb	6 kb	6 kb	12 kb	20 kb	2 kb
MasterMix disponible	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí
Característica especial	PCR de rutina	Todas las aplicaciones de PCR	Templado difícil	PCR de alta fidelidad	Alta especificidad	Fidelidad mejorada	PCR rápida	Amplicones largos	Libre para extracción

- **Primers o cebadores:** Son fragmentos cortos de DNA complementarios a regiones específicas de la cadena del DNA molde. Éstos se unen a la cadena molde en

---

---

regiones específicas, posteriormente la DNA polimerasa se ancla a ellos para comenzar a añadir los nucleótidos que formarán la cadena complementaria a la cadena molde. Estos deben ser complementarios específicamente al fragmento de interés y no deben tener complementariedad entre ellos para evitar la formación de productos inespecíficos (Rahman et al. 2013).

- **Deoxinucleótidos trifosfato (dNTP):** Éstos son nucleótidos libres, los componentes del DNA. Hay 4 tipos de dNTPs: dATP, dGTP, dTTP y Dctp. La DNA polimerasa los añade de forma complementaria a la cadena molde para formar el fragmento que se amplificará (Rahman et al. 2013).
- **Magnesio:** Es un cofactor de la DNA polimerasa. Éste ocasiona un rearrreglo de la enzima. De esta manera permite que se ancle a la cadena molde de DNA, y así permite que ejerza su acción (Batra et al. 2006).

Se deben establecer las condiciones de reacción de acuerdo a las características de los primers, la polimerasa que se utilizará y el tamaño del amplificado. Estas características son sodio, pH y la temperatura de reacción, Por otro lado, se pueden añadir catalizadores de reacción si se considera necesario (Rahman et al. 2013)

### 1.3 Etapas de la PCR

Las etapas de la PCR se dan de manera cíclica con los cambios de temperatura, cada paso corresponde a una temperatura establecida en la reacción (L et al. 2013).

- **Desnaturalización:** Durante este proceso se eleva la temperatura para hacer que la doble cadena de DNA se separe en dos hebras. Esta temperatura generalmente se encuentra entre 93°C y 97°C. Esta etapa permite que los oligos se acoplen a la cadena molde, ya que cuando se encuentra como doble cadena esto no es posible (Joshi and Deshpande 2011).
- **Alineamiento:** En esta etapa los primers se unen a la cadena molde de manera complementaria. La temperatura que se establece en esta etapa está determinada por la Tm de los primers, que generalmente es de entre 58 y 62°C (Joshi and Deshpande 2011). La temperatura que se establece se conoce como temperatura de alineamiento, o Ta, generalmente es 5°C menor a la Tm. Con la Ta se pretende asegurar que los primers se emparejarán con la secuencia correspondiente de la

---

---

cadena molde y la DNA polimerasa se acoplará a ellos para comenzar con la adición dNTPs (Kumari and .Y 2016).

- **Extensión:** Durante esta etapa la DNA polimerasa actúa sobre la cadena molde añadiendo los nucleótidos (Figura 1). Generalmente esta temperatura se establece a 72°C. La temperatura utilizada dependerá principalmente del tipo de DNA polimerasa que se esté utilizando (Joshi and Deshpande 2011).

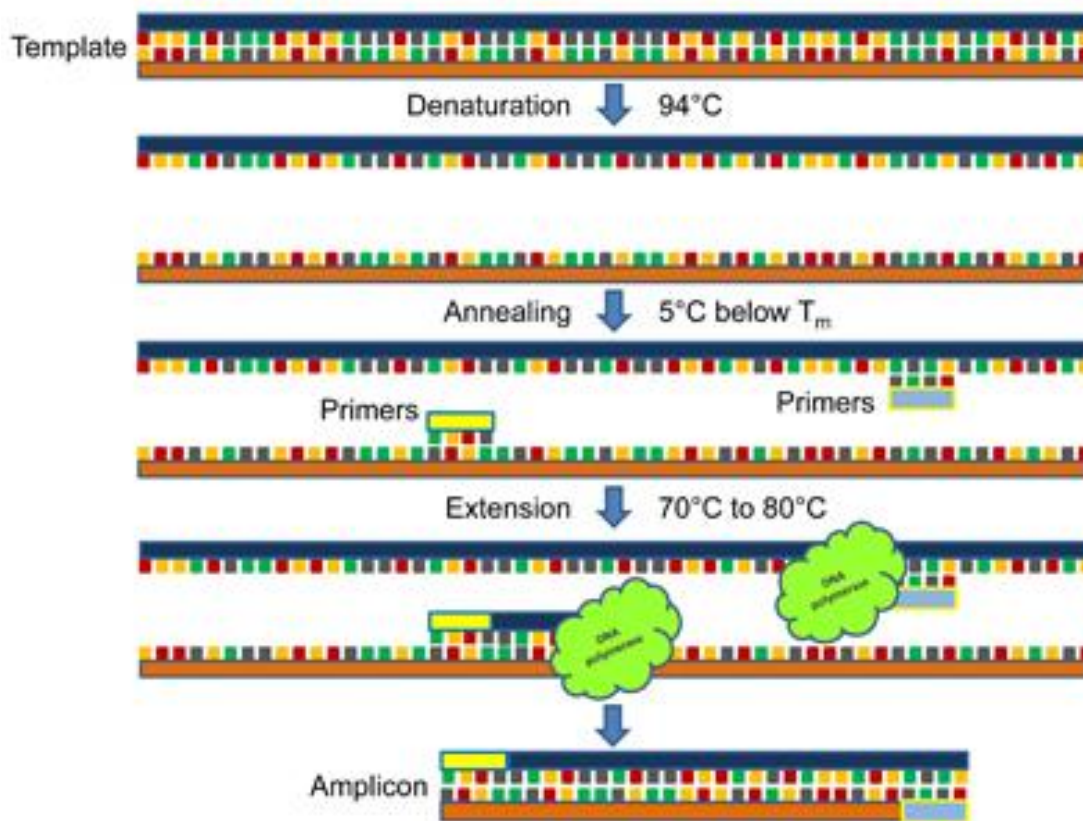


Figura 1: Representación de las etapas de la PCR para obtener el amplificado de un fragmento específico (Lorenz 2012)



Estos cambios de temperatura se repiten cíclicamente de 25 a 35 veces en un dispositivo conocido como termociclador, cuya función es la de realizar las variaciones de temperatura en la reacción. Finalmente, debido a que la generación de copias es exponencial, se obtiene una gran cantidad del fragmento de DNA deseado (Ronai and Yakubovskaya 1995). En la figura 2 se representa el número de copias que aumenta exponencialmente con los ciclos de reacción.

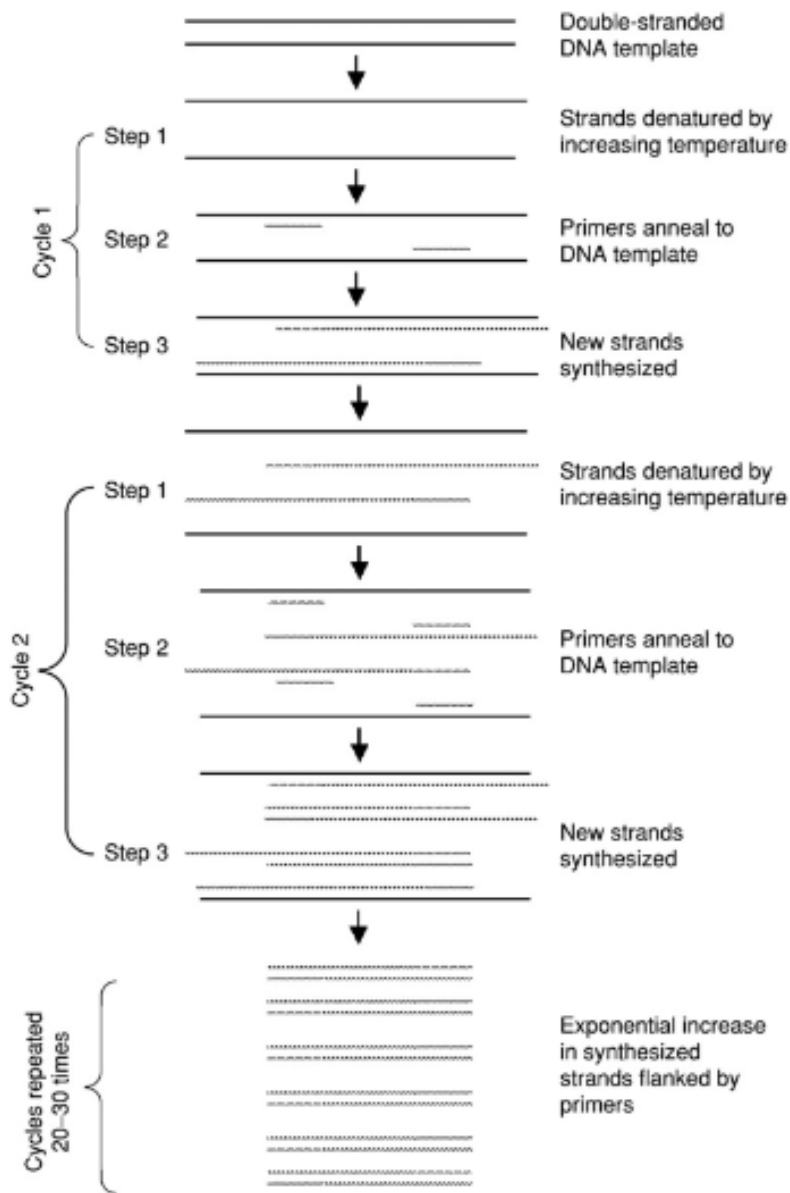


Figura 2: Representación de la amplificación exponencial de un fragmento de DNA específico mediante la PCR (Nakatsu 2013)

---

---

## 1.4 PCR multiplex

La PCR convencional permite identificar una secuencia de DNA; la PCR multiplex es un tipo de PCR que permite identificar distintas secuencias de DNA específicas dentro de una misma reacción. Se basa en el mismo principio que la PCR convencional, con la diferencia de que en ésta se tienen distintos juegos de primers que permiten identificar distintas secuencias de DNA y además permite obtener varios fragmentos de DNA dentro de la misma reacción (Bolívar, Rojas, and García-lugo 2014).

La PCR multiplex se describió por primera vez en 1988 con el propósito de amplificar loci múltiples para el gen de la distrofia muscular en humano. A partir de ese momento se utilizó para el análisis simultáneo de marcadores múltiples, microsatélites, detección de microorganismos, de organismos genéticamente modificados, entre otros usos. Anteriormente, la difícil optimización de la técnica ocasionaba que al realizar una PCR multiplex se limitara a la amplificación de pocas secuencias y a errores en la amplificación. Esto debido a la formación de productos inespecíficos o la inespecificidad de los primers con la cadena molde, que son unas de las principales problemáticas en la realización de una PCR multiplex (Bolívar et al. 2014).

El diseño de primers para este tipo de PCR requiere un análisis más extenso, ya que se deben tomar en cuenta factores adicionales.

- **T<sub>m</sub>:** Para que se lleve a cabo correctamente la hibridación dentro de la misma reacción, los primers deben tener una T<sub>m</sub> similar. El rango de las T<sub>m</sub> debe ser menor a 5°C. De esta manera se asegura que se formarán todos los amplificadores y se evita la formación de falsos negativos (Bolívar et al. 2014).
- **Dímeros:** Se debe verificar que los primers no sean complementarios entre ellos mismos ni con los demás. En ocasiones, la secuencia de los primers puede tener un grado de complementariedad con otros primers, lo que ocasiona que se alineen formando una estructura llamada dímero. Cuando se forman dímeros, los primers no se pueden unir a la cadena molde y la amplificación no se lleva a cabo (Judelson 2013).

- 
- 
- **Especificidad de los primers:** Se debe verificar que los primers para cada amplificado no tengan una secuencia similar a la del DNA de otro organismo o de otra región de la cadena a amplificar, en el caso de que esto ocurra se producirán productos inespecíficos (Judelson 2013).

Hoy en día existen diferentes herramientas bioinformáticas que permiten el diseño y análisis de primers y para realizar el análisis de secuencias. Estas herramientas permiten disminuir la cantidad de productos inespecíficos e incrementan la especificidad de los primers (Elsalam 2003).

Para realizar una PCR multiplex se deben utilizar distintos pares de primers que permitan la identificación de las secuencias deseadas, así como que los productos de amplificación tengan longitudes diferentes, ya que de esta manera se podrán analizar los resultados e identificar a qué corresponden las secuencias obtenidas (Bolívar et al. 2014).

Las aplicaciones de la PCR multiplex son:

- Identificación de patógenos
- Genotipificación
- Análisis de mutaciones
- Detección de deleciones
- Detección de RNA
- Estudios forenses
- Amplificación de DNA (Joshi and Deshpande 2011)

### **1.5 PCR multiplex para diagnóstico de patógenos**

Dentro del diagnóstico de patógenos, la PCR ha permitido la identificación de un gran número de agentes, bacterias, hongos, parásitos, virus, entre otros. Se han desarrollado varios ensayos para el diagnóstico de infecciones de distinta índole mediante el uso de esta herramienta, encontrando que el tiempo de diagnóstico es menor y más específico (Reller, Weinstein, and Petti 2007). Dentro de los diagnósticos por PCR múltiplex que se han diseñado se encuentran:

Shu Huan y colaboradores elaboraron en 2018 una PCR para identificar distintos organismos productores de diarrea (Tabla 2). Evaluaron enfermedades causantes de diarrea difíciles de identificar. Dentro del estudio se evaluó el método diagnóstico convencional y el molecular (PCR). Se encontró que con la PCR se logró detectar más muestras positivas, virales y parasitarias que el método convencional. En la tabla X se representan los resultados comparativos entre los dos métodos. En el estudio también se menciona que para establecer la PCR como un mejor método de diagnóstico deben realizarse estudios sobre la supervivencia comparando el método de diagnóstico de los pacientes y costos (Huang et al. 2018).

Tabla 2: Resultados de los resultados positivos mediante la técnica convencional y PCR para el diagnóstico de enfermedades causantes de diarrea (Huang et al. 2018).

Pathogen	Conventional analysis <sup>†</sup> (n = 217)	Multiplex PCR (n = 217)
Detection		
Negative	130 (59.9%)	96 (44.0%)
Positive	87 (40.1%)	121 (55.8%)
Bacteria <sup>†</sup>		
<i>Campylobacter</i>	12 (5.5%)	17 (7.8%)
<i>Clostridium difficile</i> toxin A/B	21 (9.7%)	24 (11.1%)
ETEC LT/ST	Not available	1 (0.5%) <sup>‡</sup>
STEC stx1/stx2	Not available	1 (0.5%) <sup>‡</sup>
<i>E coli</i> O157	Not available	2 (0.9%)
<i>Salmonella</i> spp	27 (12.4%)	33 (15.2%)
<i>Shigella</i> spp	1 (0.5%)	3 (1.4%)
<i>Vibrio cholerae</i>	Not available	Not available
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1 (0.5%)	1 (0.5%)
Viruses <sup>†</sup>		
Norovirus GI/GII	15 (6.9%)	28 (12.9%)
Rotavirus A	9 (4.1%)	10 (4.6%)
Adenovirus 40/41	Not available	Not available
Parasites <sup>†</sup>		
<i>Cryptosporidium</i>	Not available	1 (0.5%)
<i>Entamoeba histolytica</i>	1 (0.5%)	1 (0.5%)
<i>Giardia</i>	Not available	2 (0.9%)

- PCR multiplex para la identificación de enfermedades de transmisión sexual por Romero y colaboradores en 2016. Esta PCR incluye el diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual. Ésta permitió diagnosticar *Mycosplasma hominis*, *Neisseria*

---

---

*gonorrhoeae*, *Ureoplasma urealyticum* y *trichomonas vaginalis* aun cuando las pacientes estaban asintomáticas (Romero Viamonte and Ulloa Castro 2016).

- PCR multiplex de Tsalik y colaboradores para diagnosticar bacterias en torrente sanguíneo en pacientes con sepsis. En este estudio se encontró que el cultivo celular identificó mejor el agente etiológico causante de la septicemia, mientras que el diagnóstico por PCR permitió identificar 24 organismos más que el cultivo celular (Tsalik et al. 2010).
- PCR para detección e identificación de diferentes especies de *Chlamydiaceae*. Dentro de este estudio se identificó el género de *Chlamydiaceae* mediante la amplificación del gen *omp2*. Posteriormente, para la identificación de especies, se realizó por longitud de fragmentos de restricción. En este caso, el gen *omp2* es un gen que comparten todas las especies de *Chlamydiaceae*; sin embargo, tiene variaciones en su secuencia dependiendo de la especie y éstas pueden identificarse mediante una digestión enzimática. A este tipo de identificación se le conoce como PCR-RFLP, que consiste en amplificar un fragmento de la secuencia de DNA. Posteriormente, se divide mediante enzimas de digestión que corta en secuencias cortas específicas la cadena amplificada para conocer si contiene la secuencia de corte, después, cuando se corre una electroforesis se puede saber si la cadena sufrió un corte y el tamaño de los fragmentos producidos (Hartley et al. 2001).
- PCR multiplex para el diagnóstico de infección por *Staphylococcus*. En esta PCR se diseñaron y probaron primers para conocer la especie de *Staphylococcus* que se encuentra causando la infección y determinar si es resistente o no a la oxacilina. Dentro de los resultados encontraron que de 77 muestras la PCR identificó inconsistentemente 7 muestras, comparados con cultivo celular. Por otro lado, se encontraron dos muestras que contenían el gen de resistencia; sin embargo, se comprobó que eran sensibles a la oxacilina mediante cultivo celular (Mason et al. 2001)

---

---

## 1.6 Electroforesis

Una forma de revelar la amplificación del fragmento es una electroforesis en gel (Lee et al. 2012). La electroforesis es una técnica de separación que consiste en el desplazamiento de partículas en un medio, por acción de un campo eléctrico. Debido a la carga de los ácidos nucleicos esta técnica permite separar los fragmentos de DNA contenidos en una muestra por su peso (Magdeldin 2012).

Consiste en la separación de moléculas por su tamaño y carga eléctrica. Se utiliza un medio poroso sobre el cual se desplazan las moléculas, para el análisis de ácidos nucleicos se utilizan medios de gel de agarosa o de poliacridamida. Los fragmentos se pueden identificar mediante una tinción y de esta manera se puede conocer su concentración e integridad (Magdeldin 2012). Entre más pequeña sea la partícula de DNA, más rápido podrá desplazarse en el gel. Para conocer el peso de una muestra se utilizan marcadores, que son fragmentos de DNA con un peso establecido. Así, mediante comparación se puede conocer el peso de la muestra. De esta manera se demuestra que se llevó a cabo la amplificación y se obtiene información sobre cuál fragmento se amplificó (Lee et al. 2012).

Una herramienta bioinformática para conocer si se podrán identificar las secuencias amplificadas es NEBCutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Esta herramienta permite realizar digestiones de secuencias y para su análisis, permite obtener una simulación de gel de agarosa en la que permite establecer la concentración y composición del gel, así como el marcador a utilizar. El gel se realiza basándose en una curva generada con datos experimentales producidos con un tamaño conocido. La simulación permite establecer los porcentajes de agarosa y el buffer de corrida para encontrar las mejores condiciones de electroforesis a (Vincze, Posfai and Roberts 2003).

## 1.7 Software para biología molecular

Se han desarrollado varios softwares para análisis de biología molecular. Estos pueden tener varias funciones, cómo diseño de primers, electroforesis *in silico*, simulación PCR-overlap, diseño de vectores, diseño de plásmidos, entre otros. Son de gran utilidad para

---

---

realizar simulaciones antes de llevar a cabo la experimentación para conocer cómo se comportaran los componentes de la reacción.

Este tipo de softwares permite predecir secuencias o comportamientos de las diferentes funciones que tienen antes de realizar el experimento *in vitro*. Algunos ejemplos son: Benchling, SnapGene, LaserGene, entre otros (Polysom, consultado el 20 de febrero del 2021).

Estos softwares tienen funciones para la generación de primers a partir de una cadena proporcionada por el usuario. también realiza cálculos de TM y de complementareidad y permite la visualización de una electroforesis *in silico*. Adicionalmente permite la visualización de los genes con sus respectivos primers. Un ejemplo es el software de Lasergene, que permite la visualización de secuencias que el usuario introduce o de un banco de secuencias generado. A partir de estas secuencias se pueden trabajar sobre ella el diseño de primers, localización de sitios de corte, conversión a plásmido, entre otras acciones (Burland 2000)

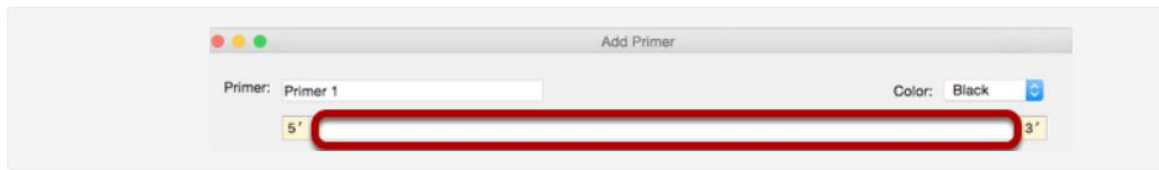
Otro software es el de SnapGene, que permite la introducción de una secuencia de DNA y su análisis. Este software permite encontrar sitios de corte de enzimas de restricción, identificar vectores de clonación, hacer comparación de secuencias, entre otras funciones. Las funciones de interés para este proyecto con las de generación de primers y la de electroforesis *in silico* (SnapGene 2021b).

El software de SnapGene permite la introducción de primers de manera manual (Figura 3) o los puede generar de manera automática y los identifica dentro de la secuencia. Una vez identificada la localización de los primers se puede obtener información sobre el amplificado y los primers (SnapGene 2021a).

---

---

## Paste a Primer Sequence



To create a primer, click **Primers** → **Add Primer...** , then copy and paste a sequence.

## Select the Binding Site (optional)

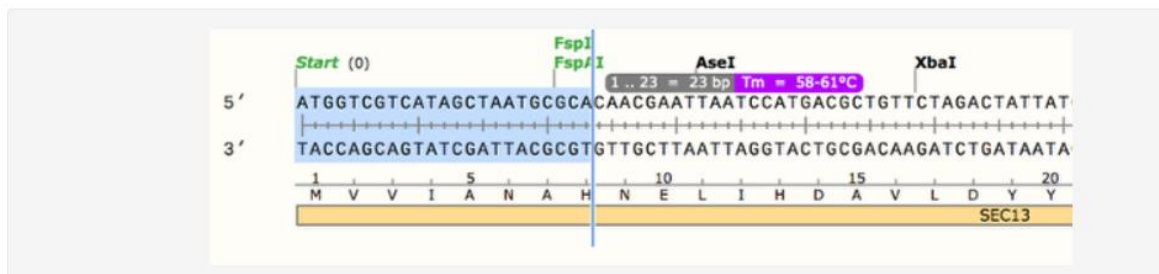


Figura 3: Indicaciones para insertar un primer de manera manual en una secuencia en la herramienta de SnapGene (SnapGene 2021a).



## Capítulo 2. Primers

### 2.1 Generalidades

Los primers son secuencias cortas de DNA (oligo) que deben ser complementarios a una región específica de la cadena molde. Para amplificar un fragmento de la cadena molde se requieren dos primers. Se conocen como forward primer al oligo que va sobre la hebra de DNA antisentido, y como reverse primer al que va en la cadena sentido, de esta manera se logra obtener una copia de la región entre las dos secuencias seleccionadas como se observa en la figura 4 (Judelson 2013).

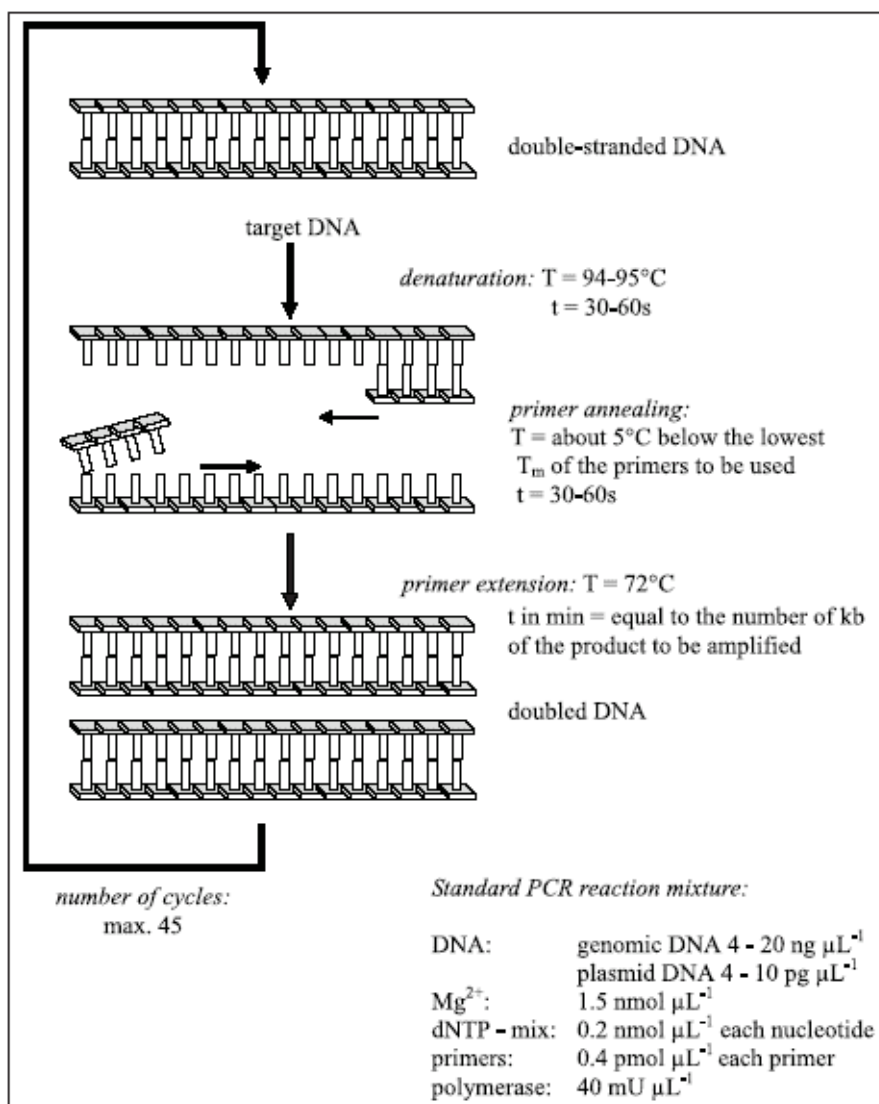


Figura 4: Representación de la delimitación del fragmento a amplificar mediante los primers complementarios a la cadena (Konietzny and Greiner 2003)

---

---

### 2.1.1 Características

Los primers deben cumplir con las siguientes características:

- Longitud: Debe ser de 18 a 30 nucleótidos (Judelson 2013); de esta manera la  $T_m$  será similar. También permite que haya especificidad con la cadena molde de interés y se evitará la formación de productos inespecíficos. La longitud depende principalmente de la cadena molde, ya que el primer debe tener una complementariedad de 100% y no debe ser complementaria con la cadena molde de otro organismo (Bolivar et al. 2014)
- $T_m$ : Se refiere a la temperatura de fusión (Temperature Melting por sus siglas en inglés). Al realizar una PCR multiplex las  $T_m$  de los diferentes pares de primers deben ser similares.

- Una fórmula con la que se puede estimar la  $T_m$  es la fórmula de Wallace-Ikatura (Ahsen, Wittwer, and Schu 2001):

$$T_m \approx 4GC + 2AT$$

Donde:

GC se refiere al número de Guaninas y de Citocinas del Primer.

AT se refiere al número de Adeninas y Timinas en el primer (Ahsen et al. 2001).

Esta ecuación se utiliza para oligos cortos de 14 a 20 nucleótidos.

Ésta considera la fuerza de los enlaces GC y la de los enlaces AT, debido a que los enlaces GC son más fuertes, por lo que aumentan el valor de la  $T_m$ .

- Otra ecuación para calcular la  $T_m$  es:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log M + 41(XG+XC) - 500/L - 0.62F$$

Donde:

M es la concentración molar de cationes monovalentes.

G y XC son las fracciones molares de G y C en el oligo.

L es la longitud de la cadena más corta del par de primers.

F es la concentración molar de formamida (Howley et al. 1979).

Esta ecuación toma en cuenta la concentración de sales y de formamida para el cálculo de la  $T_m$ .

---

---

Suele utilizarse para oligos más largo, mayores a 50 nucleótidos, pero se puede utilizar también para oligos cortos. Ésta considera la relación de Guaninas y Citocinas dentro de la cadena (Howley et al. 1979).

- Ta: Ésta debe ser similar para todos los oligos. Debido a esto, los oligos tienen características de longitud y composición similares. De esta manera se asegura que todos los alineamientos se lleven a cabo y por ende se produzcan todos los amplificadores.
- No formación de dímeros: Se debe verificar que los oligos no formen dímeros para que se lleve a cabo el alineamiento de todas las cadenas de interés. Para verificar esto se debe realizar un análisis de la composición de las cadenas, su secuencia y la fuerza de los enlaces que pueden formar entre los oligos (Judelson 2013).
- Composición: Se refiere al porcentaje de Guaninas y Citosinas que contiene la cadena, que debe estar entre 45% y 55%. Se deben evitar regiones con varios nucleótidos repetidos (Judelson 2013).
- Estabilidad del extremo 3': se recomienda que el nucleótido en el extremo 3' sea una Guanina o una Citocina para asegurar la unión con la base complementaria debido a que estos nucleótidos se unen con tres puentes de Hidrógeno, al contrario del enlace A-T que se une con dos (Breslauer et al. 1986).

## **2.2 Diseño**

Por cada secuencia de DNA que se desee amplificar se deben diseñar dos primers para delimitar cada extremo de la cadena. Uno es conocido como Forward primer y el segundo como Reverse primer. De esta manera se delimita la secuencia que se amplificará cómo se representa en la figura 5 (Judelson 2013; Nolan, Huggett, and Sanchez 2013).

Las secuencias de DNA tienen un sentido de 3' a 5'. Este sentido hace referencia al carbono de la pentosa del nucleótido al que está unido la base nitrogenada (Figura 5). A partir de este sentido se realiza la secuencia de nucleótidos de una cadena de DNA (Urbain 2001). La cadena molde está conformada por una doble hélice, que consiste en dos cadenas simples de DNA. Cuando se separan, una es denominada como cadena sentido (ésta es la secuencia que se utiliza como secuencia FASTA) y la cadena complementaria se denomina

cadena antisentido, ésta se considera que va en sentido 5' a 3' en relación a la cadena sentido.

- Forward primer: Éste primer debe ser complementario al inicio de la secuencia de DNA que se amplificará, es decir, la cadena antisentido (Nolan et al. 2013).
- Reverse primer: Éste debe ser complementario al extremo final de la secuencia que se desea amplificar en la cadena sentido (Nolan et al. 2013).

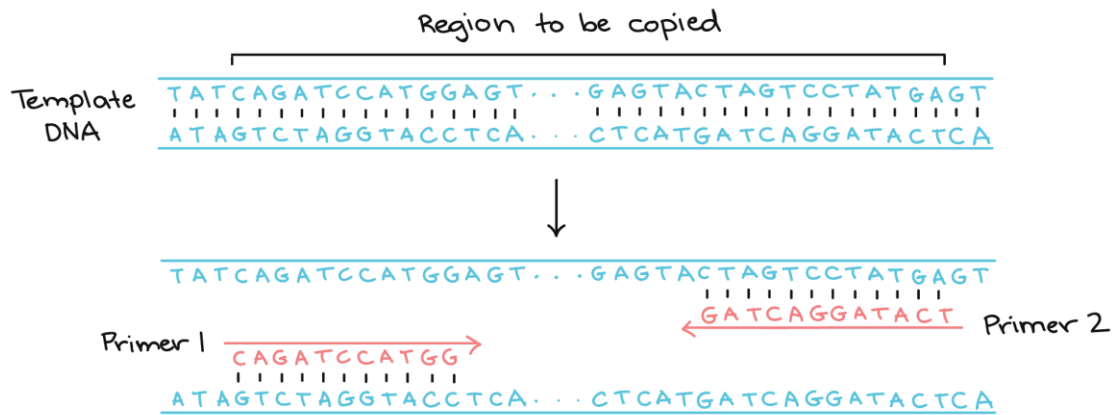


Figura 5: Representación de la delimitación de la cadena molde mediante el uso de primers (Khan Academy 2019)

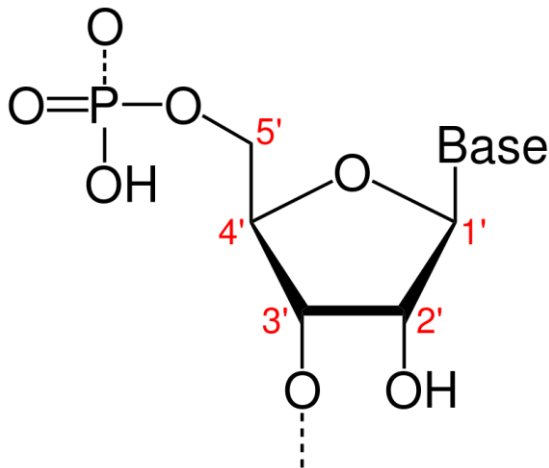


Figura 5: Representación de un nucleótido en la que se observa la numeración de los carbonos que dan el sentido de la cadena

---

---

Para realizar los primers primeramente se debe obtener la secuencia de DNA que se desea amplificar. Existen distintas bases de datos de las cuales se pueden obtener las secuencias de genomas completos hasta genes (Elsalam 2003).

- GenBank: Es una base de datos del NCBI que colecta la secuencia de organismos y genes para su acceso público.
- DDBJ: Se refiere al banco de datos de DNA de Japón. Esta base de datos permite el acceso a las secuencias de DNA de distintos organismos y genes.
- ENA: El Archivo Europeo de Nucleótidos permite el acceso a las secuencias de distintos organismo y genes.

Estas tres entidades conforman la Colaboración Internacional de Base de Datos de Secuencia de Nucleótidos

Una vez que se eligió la secuencia se procede a obtener los primers, para esto se cuenta con varias herramientas bioinformáticas (Elsalam 2003):

- Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>): Esta herramienta permite obtener varios juegos de primers a partir de una secuencia brindada. Se debe ingresar la secuencia de interés, además se pueden establecer las características que se desea que tengan los primers (Figura 6). Como resultados el programa establece distintos pares de primers que se pueden utilizar para amplificar determinadas secciones del DNA proporcionado, con distintas longitudes de amplificado. También un alineamiento con la secuencia de los organismos de interés para evitar la formación de productos inespecíficos. Por otro lado, se pueden introducir los primers deseados y brindará información sobre la cadena amplificada, los primers en si y si los primers son complementarios al DNA de otro organismo. Además, permite ver el alineamiento de la secuencia. En los resultados adicionalmente da información sobre la Tm y composición de los (Elsalam 2003). Para el presente trabajo se utilizó esta herramienta para la elaboración de la PCR multiplex.

Figura 6: Captura de pantalla de la Herramienta Primer-BLAST. En rojo se indica la sección para indicar la secuencia de interés; en amarillo la posición en la que se desea se encuentren los primers, en rojo la opción para utilizar primers propios, en verde el tamaño del amplificado, y en morado la Tm de los primers

- Primer3web (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>): Permite obtener 5 primers a partir de una secuencia introducida, permite también seleccionar los primers que se desean para conocer sus características. En los resultados adicionalmente se brinda información sobre la composición del primer y su Tm (Elsalam 2003).

### 2.3 Controles

Para verificar que el proceso de la PCR se lleve a cabo correctamente se deben diseñar un par de primers para un control negativo y un control positivo (Nolan et al. 2013).

- **Control positivo:** Consiste en un par de primers para una secuencia que se sabe se encuentra en la muestra. El fragmento para el que se diseñe los primers dependen de la muestra. Adicionalmente, si no se conoce la composición de la muestra, se pueden realizar para la secuencia de un organismo que no se encuentre en la muestra. Posteriormente se hace una extracción de DNA de células de ese organismo y se añade a la muestra problema. Dentro del control positivo se puede incluir un gen constitutivo, es decir, un gen que se encuentra dentro del organismo o grupo de organismos a identificar. Un ejemplo es el gen *16s RNA* cuando se

---

---

identifican las procariotas. El *16s RNA* es un gen constitutivo de las bacterias, es decir, todas las células procariotas lo contienen en su genoma. Al utilizar este gen como control positivo si bien no permite identificar a cual bacteria pertenece, permite conocer la presencia de una bacteria y conocer que la PCR está funcionando correctamente (Judelson 2013; Nolan et al. 2013).

- **Control negativo:** Éste consiste en un par de primers para un DNA que se sabe que no se encuentra en la muestra. Al momento de realizar la electroforesis el pozo con estos primers no debe tener amplificado, si se encuentra algún amplificado indica que algún componente de la PCR no está funcionando de la manera correcta. Esto puede indicar que los primers no tienen la especificidad necesaria o que la muestra está contaminada (Judelson 2013; Nolan et al. 2013).
- **Control de reactivos:** Éste consiste en una muestra sin DNA; de esta manera se verifica que los reactivos se encuentran libres de material genético y que no hay falsos positivos (Elsalam et al. 2013).

Después de la realización de la PCR, al momento de realizar el análisis la cadena del control positivo debe haberse amplificado, mientras que la del control negativo no debió llevar a cabo la amplificación. Si el fragmento del control positivo no se amplificó indica que la reacción no se llevó a cabo, por lo que hay que verificar las condiciones en las que se está llevando a cabo la reacción. Si el control negativo tiene un producto de amplificación puede indicar degradación del DNA y formación de productos no específicos. En ambos casos los resultados de la PCR no son confiables (Patel et al. 2015).

## 2.4 Análisis

El análisis de primers consiste en una evaluación de varias características de los oligos. Individualmente se verifica que los primers no sean complementarios al DNA de otro organismo, y que sean totalmente complementarios al DNA que se pretende amplificar. El análisis que se le realiza al conjunto de primers consiste en verificar que sus  $T_m$  sean similares y que no tengan complementariedad entre ellos para evitar la formación de dímeros.

---

---

Una vez que se tienen establecidas las secuencias que se pretenden amplificar y que se obtienen las opciones de primers, se debe verificar que éstos no sean complementarios al DNA de otro organismo. Si es así, se pueden generar productos inespecíficos que no permitirían la visualización correcta del producto amplificado (Judelson 2013). Para verificar que los primers seleccionados no amplifiquen con otro DNA se debe realizar un alineamiento del primer con la secuencia de los diferentes organismos con los que se cuenta información. Para realizar esto se pueden utilizar diferentes herramientas bioinformáticas (Elsalam 2003).

- Primer-BLAST: Además de proporcionar opciones de primers, el programa realiza un alineamiento con las secuencias de otros organismos que se especifiquen y, en caso de existir, muestra el alineamiento. El programa muestra la similitud que hay entre el DNA de los dos organismos. A partir de esta información se puede decidir si es necesario cambiar el primer propuesto o si se puede utilizar el mismo. (Jian et al. 2012).
- BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): Este programa realiza un alineamiento de la secuencia introducida con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank. Posteriormente despliega los resultados en manera de listado indicando los organismos que tienen una secuencia similar, y el grado de similitud. Adicionalmente se puede obtener el alineamiento de la secuencia para conocer el nucleótido en el que se encuentra la diferencia, de esta manera puede elegirse la mejor secuencia a amplificar y el primer a utilizar (Boratyn et al. 2013).

Los resultados obtenidos deben indicar que el primer tiene un 100% de similitud con la cadena de interés. Adicionalmente no se debe encontrar similitud con el DNA de organismos diferentes, en caso de existir similitud se debe verificar que la misma no sea alta, si esto sucede se debe evaluar si se puede utilizar el primer a pesar de la similitud presentada. Entro de los parámetros a evaluar cuando se encuentra la similitud debe considerarse el organismo con el que tiene la similitud, el número de nucleótidos que comparte la secuencia y el tipo de nucleótidos que comparte, entre otros.



---

Un primer puede tener complementariedad con él mismo, formando un dímero; de éstos hay dos tipos, el convencional, cuando el dímero se forma por dos cadenas del mismo oligo se llama homodímero, o hairpin, cuando un oligo tiene complementariedad y se alinea con si mismo, formando un doblez. Por otro lado, cuando hay dos primers que son complementarios entre ellos se le llama heterodímero. En la Figura 7 se muestra cómo puede ocurrir la formación de dímeros (Judelson 2013).

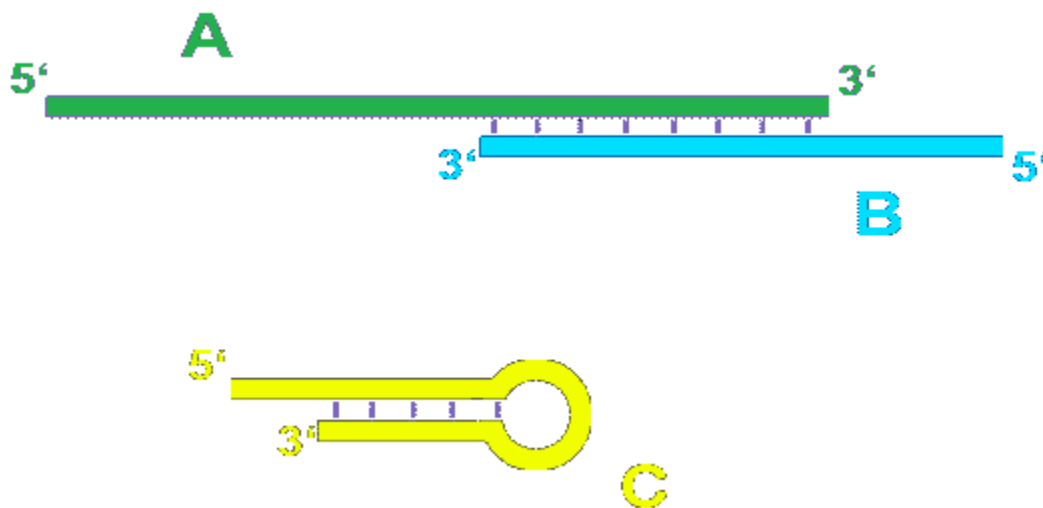


Figura 7: Representación de la formación de dímeros. Los primers A y B forman un heterodímero, mientras que el Primer C forma un homodímero en forma de “hairpin”.

Existen diversas herramientas bioinformáticas que permiten conocer si se formarán dímeros. Entre ellas están:

- OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>): Esta herramienta permite analizar primers para conocer si forman dímeros. Se puede ingresar un par de primers para conocer si formarán heterodímeros o un primer para conocer si forma un homodímero. Permite conocer el alineamiento de los dímeros, o del hairpin para identificar las bases que lo están causando. OligoAnalyzer permite establecer las condiciones de reacción como la concentración de los primers, de Sodio, Magnesio y de nucleótidos para obtener los resultados *in silico*. Adicionalmente establece la TM de cada primer. Como desventaja, esta herramienta sólo permite analizar uno o dos oligos por análisis, por lo que para realizar una PCR

---

---

multiplex deberán realizarse los análisis de todas las combinaciones que pueda haber entre los primers por separado (Owczarzy et al. 2008).

- ThermoFisher Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html?fbclid=IwAR0iF9r8gW6gtY10Q6Es0Xe40nJj-0Wk8ZpBZQ7oPdvDNBNtvGbwa3lCLME>): Esta herramienta permite introducir varias secuencias de primers y determina, con un solo análisis, si forman homodímeros o heterodímeros. Permite establecer la concentración salina y de los primers para obtener los resultados *in silico*. Adicionalmente indica la TM y la composición de nucleótidos de los primers. Como ventaja, esta herramienta permite conocer la formación de dímeros en un solo análisis, ya que permite introducir varias secuencias en una sola ocasión (Brown et al. 2017). Los cálculos que realiza son de acuerdo con: Breslauer et al. (1986) (Breslauer et al. 1986).

Con los resultados obtenidos con estas herramientas es posible verificar la complementariedad entre los primers. En caso de existir resultados positivos se debe evaluar el uso de los primers que presentan la complementariedad y cambiarlos si es necesario.

---

---

## Capítulo 3. Diarrea

### 3.1 Concepto

La diarrea consiste en un aumento en el número de deposiciones y/o una disminución en su consistencia, presentando heces blandas o acuosas. Puede estar acompañada de náuseas, vómitos, fiebre o dolor abdominal. La causa más frecuente en los países en desarrollo es una infección gastrointestinal, aunque también puede ser ocasionada por virus y parásitos (Farthing 2012).

Está considerada como una de las principales causas de muerte en infantes, siendo la segunda causa de muerte de niños menores a 5 años. La diarrea aguda puede causar la muerte en un periodo corto de tiempo si no es tratada, por lo que la identificación del agente causal es fundamental para determinar el tratamiento correcto (CDC 2016).

### 3.2 Agentes causantes de diarrea

A continuación, en la tabla 3, se mencionan los agentes que causan diarrea en el organismo.

Tabla 3: Organismos que ocasionan diarrea en el humano (Farthing 2012)

Bacterias	Virus	Parásitos
<i>Escherichia coli</i> productora de diarrea <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Vibrio cholerae</i> O1 <i>V. cholerae</i> O139 <i>Shigella</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>E. coli</i> <i>C. upsaliensis</i> <i>Salmonella</i> no tifoidea <i>Clostridium difficile</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Rotavirus</i> <i>Norovirus</i> (calicivirus) <i>Adenovirus</i> (serotipo 40/41) <i>Astrovirus</i> <i>Citomegalovirus</i>	<b>Protozoarios</b> <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Giardia intestinalis</i> <i>Microsporidia</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Isospora belli</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Blastocystis hominis</i> <b>Helmintos</b> <i>Strongyloides stercoralis</i> <i>Angiostrongylus costaricensis</i> <i>Ashistosoma mansoni</i> <i>S. japonicum</i>

La causa de diarrea más común en países en desarrollo es la infecciosa, por lo que generalmente cuando un paciente presenta esta afección se siguen tratamientos para infecciones (Farthing 2012). Los agentes mencionados en la tabla 4 son los agentes microbianos de mayor interés en el diagnóstico de la diarrea infecciosa.

Tabla 4: Enterobacterias importantes desde el punto de vista clínico (Puerta and Mateos 2010)

Género	Especies
<i>Escherichia</i>	<i>coli, alberti, alvei</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae, oxytoca, granulomatis</i>
<i>Salmonella</i>	<i>choleraesuis</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes, cloacae, agglomerans, gergoviae, sakazakii</i>
<i>Serratia</i>	<i>marcencens</i>
<i>Hafnia</i>	<i>alves</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii, amalonaticus, diversus</i>
<i>Yersinia</i>	<i>pestis, enterocolitica, pseudotuberculosis</i>
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis, vulgaris</i>
<i>Providencia</i>	<i>rettgeri, stuartii</i>
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>
<i>Shigella</i>	<i>dysenterii, flexneri, sonnei, boydei</i>
<i>Plesiomonas</i>	<i>shigelloides</i>
<i>Edwarsiella</i>	<i>tarda</i>
<i>Ewingella</i>	<i>americana</i>

### 3.2.1 Enterobacterias

Las bacterias que se alojan en el intestino son llamadas enterobacterias. En la tabla 4 se mencionan las de mayor importancia clínica, aunque no todas las enterobacterias son patógenas. Las enterobacterias son un grupo de bacterias bacilo Gram negativas que reciben su nombre debido a su localización en el tubo digestivo. Son anaerobias facultativas, no formadoras de esporas, catalasa positivas y generalmente tienen movilidad. Usualmente son saprofíticas en varios animales además del hombre, aunque también hay algunas patógenas. Frecuentemente causan problemas de salud en pacientes inmunodeficientes; sin embargo, algunas, como *Salmonella*, puede ejercer una acción dañina sin que el paciente se encuentre inmunocomprometido (Puerta and Mateos 2010).

---

---

La enterobacteria que mayormente se encuentra en el intestino es *E. coli*, que es saprofítica oportunista; sin embargo, existen varios tipos de *E. coli* que afectan la salud, como la enterotoxigénica, enterohemorrágica, enteropatógena y la enteroagregativa. Estos tipos de *E. coli* causan daño sin que el paciente tenga alguna inmunodeficiencia, por lo que en caso de presentar alguno de los síntomas que causan se debe consultar con un especialista lo antes posible para tratar el patógeno.

### **3.3 Diagnóstico**

El diagnóstico generalmente se realiza por un coprocultivo. Un coprocultivo consiste en tomar una muestra de las heces para posteriormente realizar un cultivo celular y obtener los patógenos que causan el padecimiento. El coprocultivo permite realizar el diagnóstico etiológico del agente que causa una afectación intestinal. Se realiza mediante técnicas bacteriológicas de cultivo celular que permiten el aislamiento e identificación del patógeno.

Hoy en día el diagnóstico de infecciones también se realiza por técnicas de biología molecular, aunque en menor medida. La PCR y la secuenciación han permitido la caracterización de distintos microorganismos, así como la identificación de algunos nuevos. La PCR se ha utilizado en distintas ocasiones para la identificación de microorganismos en muestras biológicas (Mahmudunnabi et al. 2018; Mason et al. 2001; Menon, Kapila, and Ohri 1999; Tsalik et al. 2010).

#### 3.3.1 Diagnóstico molecular de infecciones

El método de diagnóstico molecular de infecciones por PCR consiste en la identificación de la cadena o fragmento de cadena del organismo que se sospecha está causando la infección. Esta técnica permite identificar el agente etiológico que causa la infección. La rápida obtención de resultados y su alta especificidad han permitido mejorar el tratamiento de infecciones en casos de pacientes con enfermedades inmunodeficientes, en las que el tiempo de diagnóstico es crucial (Menon et al. 1999).

---

---

Entre las enfermedades de mayor interés que se han diagnosticado con esta técnica se encuentran:

- Pneumonia
- Faringitis por *Streptococcus*
- Ulceras urogenitales por infección
- Tuberculosis (Menon et al. 1999)

Para la identificación del agente etiológico se toman en cuenta los organismos que causan determinada patología. Dependiendo de la patología se elegirán los organismos de interés y se diseñarán los primers para su identificación (Menon et al. 1999). Por ejemplo, para infecciones gastrointestinales se elegirán primers para identificación de enterobacterias, ya que son los principales agentes que causan la patología. Para llevar esto a cabo, generalmente se eligen genes particulares de cada género para realizar la amplificación, de esta manera se asegura que el resultado corresponde con el organismo de interés. Para identificar la especie se puede realizar una RFLP o la amplificación de una cadena exclusiva de la especie (Mahmudunnabi et al. 2018; Menon et al. 1999)

Se han desarrollado distintos métodos de diagnóstico de infecciones por PCR multiplex. La PCR multiplex que se diseña se enfoca en el origen de la muestra, así, se puede realizar el diagnóstico de infecciones de vías respiratorias, meningitis, sepsis, entre otras. Para su diseño se tienen en consideración los agentes que generalmente causan el tipo de infección a diagnosticar, Debido a que la PCR es múltiplex deberán seguirse todas las indicaciones para asegurar que los resultados sean confiables (Elsalam et al. 2013).

---

---

## Capítulo 4. Resistencia antimicrobiana

### 4.1: Concepto

La resistencia antimicrobiana o farmacorresistencia se refiere a los cambios que sufren los microorganismos ocasionando que los medicamentos que son utilizados para tratar esas infecciones dejen de ser eficaces. Es un proceso que sufren únicamente las bacterias y que ocasiona que los tratamientos de infecciones sean más complicados (Clave et al. 2017).

Generalmente los antibióticos tienen la capacidad de afectar a la bacteria mediante acciones como inhibir la síntesis de la pared celular, de proteínas, de DNA o RNA, o lisis de las células afectando la membrana celular, entre otros mecanismos. Cuando un antibiótico pierde la capacidad de inhibir el crecimiento celular se determina que la célula en cuestión desarrolló resistencia al antibiótico (Clave et al. 2017).

### 4.2: Origen

Una gran parte de las cepas de bacterias resistentes a antibióticos surgieron a partir de la selección natural. Debido a que la función de los antibióticos es eliminar las bacterias, éstas desarrollan procesos naturales que fomentan la resistencia a estos agentes (Vignoli and Seija 2006).

La resistencia se da por mutaciones genéticas; posteriormente, al estar en presencia con los antibióticos estos ejercen una presión selectiva a la que responden los genes de resistencia expresándose. Adicionalmente, las bacterias pueden tener la capacidad de transmitir estos genes mutados a otras bacterias mediante la transferencia de plásmidos (Vignoli and Seija 2006).

### 4.3 Tipos de resistencia

- **Individual:** Se refiere a la interacción individual de un mecanismo de un organismo individual hacia un antibiótico específico que genera la resistencia a la molécula del antibiótico.

- 
- 
- **Poblacional:** Se refiere a el comportamiento de una población bacteriana al enfrentarse a un antibiótico.
  - **Natural:** Se refiere a las características propias de cada especie o género. Por ejemplo, todas las bacterias Gram negativos son resistentes a la vancomicina.
  - **Adquirida:** Se refiere a aquella que no es propia del género o especie y que se obtuvo a través de una mutación o de la adquisición de un plásmido. Ésta es variable de cepa a cepa y es la que causa mayor dificultad en el tratamiento de infecciones (Zaman et al. 2017).

#### **4.4 Mecanismos de resistencia antimicrobiana**

##### 4.4.1 Inactivación enzimática

Consiste en la síntesis de enzimas que degraden el compuesto del antibiótico. Principalmente se producen enzimas hidrolíticas; sin embargo, las enzimas también pueden llevar a cabo acciones como acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones. La información para la síntesis de estas enzimas se obtiene mediante mutaciones o mediante la transferencia de plásmidos

Una de las enzimas de mayor interés es el grupo de enzimas beta lactamasas, que llevan a cabo la hidrólisis de los antibióticos betalactámicos, como la penicilina. Desde su descubrimiento la penicilina es uno de los principales tratamientos para las infecciones; sin embargo, hoy en día existe una gran variedad de cepas de bacterias que codifican para enzimas beta lactamasas, por lo que una gran mayoría de antibióticos derivados de la penicilina se han vuelto ineficaces. Asimismo, se han encontrado cepas resistentes a los derivados de penicilina de nuevas generaciones (Hu et al. 2019).

##### 4.4.2 Modificaciones del sitio blanco

Este mecanismo consiste en una modificación al gen que codifica para el sitio blanco del antibiótico. La modificación de un aminoácido en una proteína genera un blanco diferente, lo que confiere una menor afinidad al sitio blanco del antibiótico y puede no intervenir en el



---

---

funcionamiento del organismo. Algunos de los mecanismos que conducen a este tipo de resistencia son:

- **Modificación de PBP (Penicilin Binding Protein):** El PBP es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano de la pared celular, principalmente en Gram positivas. Al alterarse este sitio, la unión de los antibióticos, como los beta-lactámicos no se sucede, ocasionando que no tengan su efecto. La mutación que se da debe codificar para los sustitutos de los blancos originales, como PBP2' En *Staphylococcus spp*, que ocasiona resistencia a la meticilina. Esta modificación puede producir también cepas resistentes a la penicilina e incluso a la ceftriaxona (Vignoli and Seija 2006).
- **Modificación ribosomal:** Esta resistencia va dirigida a antibióticos cuyo blanco es algún componente ribosoma, como las tetraciclinas y los macrólidos. En este caso, los organismos resistentes sintetizan una metilasa que modifica el RNA ribosomal bacteriano, por lo que su afinidad con el antibiótico disminuye (Vignoli and Seija 2006).

#### 4.4.3 Alteraciones de la permeabilidad

La permeabilidad de la membrana celular es una propiedad que se refiere al paso de sustancias hacia y desde la célula de manera selectiva. La resistencia de este tipo se puede referir a cambios en las proteínas, que permiten el paso de las sustancias o a propiedades de la membrana que impiden el paso de ciertas sustancias (Vignoli and Seija 2006):

- **Alteración de la membrana bacteriana:** Principalmente ocurre en bacterias Gram negativas ya que su pared es rica en lípidos, y por ende es impermeable a sustancias hidrofílicas, por lo que estas moléculas sólo podrán pasar a través de poros membranales. La expresión de los poros membranales puede verse disminuida, confiriendo resistencia a los antibióticos que dependen de esta vía de entrada (Vignoli and Seija 2006).
- **Alteraciones de la entrada de antibióticos dependientes de energía:** Esta resistencia generalmente se da en los antibióticos aminoglucósidos, que requieren la adherencia a moléculas de carga negativa. Posteriormente se produce un arreglo de LPS lo que conduce a la entrada del antibiótico por un sistema de transporte acoplado al

---

---

gradiente protónico que depende de la actividad de la cadena respiratoria aerobia. La resistencia se genera cuando el agente es anaerobio y se producen cambios en el gradiente electroquímico, dificultando la entrada del antibiótico a la célula (Vignoli and Seija 2006).

- Aumento de la salida de antibióticos: Se le conoce como resistencia por eflujo. Es un mecanismo de resistencia inespecífico que consiste en la síntesis de proteínas de transporte transmembranales que provocan la salida de moléculas de alto peso molecular, como los antibióticos (Vignoli and Seija 2006).

#### **4.5 Importancia y prevalencia.**

La resistencia a antibióticos aumenta a nivel global; cada día se desarrollan y propagan nuevos mecanismos de resistencia antimicrobiana. Esto ocasiona que el tratamiento para infecciones, como tuberculosis, neumonía, septicemias, entre otras, sea más complejo, y a su vez se incentive su propagación (Clave et al. 2017).

Un factor importante que ha estimulado la generación de mecanismos de resistencia es el uso inapropiado de antibióticos. Cuando la dosis de un tratamiento de antibiótico no se concluye, el patógeno puede no ser eliminado por completo y éste puede generar resistencia al antibiótico gracias al tiempo que estuvo expuesto a él. Por otro lado, la adquisición de antibióticos sin receta propicia la automedicación, cuando el tratamiento con un antibiótico no se realiza por un especialista de la salud el antibiótico puede no ser el indicado para tratar esa infección. Cuando una bacteria es expuesta ante un antibiótico hacia el que tiene una resistencia natural o adquirida ésta puede adicionalmente desarrollar un mecanismo de resistencia hacia ese antibiótico, que, posteriormente, puede ser transmitido a otros microorganismos (Clave et al. 2017).

El desarrollo de resistencia a antibióticos presenta una amenaza al tratamiento de infecciones con medicamentos de primera línea, ocasionando que los tratamientos sean de mayor duración y costo. Además, supone una amenaza para los logros de la medicina, como los trasplantes, cesáreas, quimioterapias, cirugías y cualquier procedimiento que exponga al paciente a un patógeno (Clave et al. 2017).

---

---

Si se conoce la resistencia que tiene un patógeno hacia un antibiótico no debe ser tratado con éste, en cambio se debe utilizar otro antibiótico que se conozca tiene efecto sobre el patógeno. Es así como se elimina al patógeno y no se estimula la resistencia hacia un antimicrobiano (Zaman et al. 2017).

#### **4.6 Identificación**

Para identificar si una bacteria presenta resistencia a un antibiótico se pueden realizar distintas pruebas, como el cultivo en medio con antibiótico, prueba con discos, o con diagnóstico molecular (Bagul and Sivakumar 2016). Hoy en día existen diferentes métodos para conocer si un microorganismo presente resistencia a algún antibiótico, entre ellos se encuentran:

- Métodos fenotípicos o cualitativos
  - Discos de difusión de Kirby Bauer
  - Difusión en pozos
  - Discos de difusión de Stoke
- Métodos cuantitativos
  - Prueba de dilución de caldo en tubo o macro
  - Prueba de dilución en agar
  - E test prueba de difusión por gradiente en agar (Bagul and Sivakumar 2016)

La identificación de resistencia antimicrobiana con biología molecular consiste en identificar si la bacteria posee un gen para resistencia a antibióticos (Maugeri et al. 2019). Hoy en día existen distintos métodos para identificar genes de resistencia antibacteriana (Fluit, Visser, and Schmitz 2001)

- Técnica de hibridización
- PCR RFLP
- Balizas moleculares
- DNA ramificado
- Secuenciación

- 
- 
- Matrices de DNA
  - Chips de DNA (Fluit et al. 2001)

Se puede conocer si un organismo posee un gen de resistencia antimicrobiana diseñando un par de primers para la amplificación de ese gen. Cabe mencionar que si el organismo no presenta ese gen no significa que no tenga resistencia a ese antibiótico, ya que la resistencia puede presentarse debido a otro gen de resistencia antimicrobiana (Maugeri et al. 2019).

Se han realizado distintas evaluaciones de resistencias a antibióticos, entre las que se encuentran:

1. Evaluación de resistencia antimicrobiana, en *E. coli* de Sarker y colaboradores. En este estudio evaluaron la resistencia antimicrobiana de *E. coli* mediante métodos cualitativos y mediante PCR. Mediante el método de difusión en disco se observó que todas las muestras eran resistentes a la ampicilina y tetraciclina, y algunas de ellas a la trimetoprima sulfametoxazol y al ácido nalidíxico.  
Por otro lado mediante PCR se encontró que las cepas eran multirresistentes debido a que portaban los genes *bla<sub>TEM</sub>*, *tetA*, y *Sul2* (Sarker et al. 2019).
  2. Identificación de resistencia a beta lactámicos, en *Klebsiella* por Mrowiec y colaboradoras. En este estudio se realizó la identificación de resistencia a antibióticos beta lactámicos mediante técnicas fenotípicas y mediante PCR. En este caso se utilizó la técnica de PCR para confirmar la resistencia observada en cultivo celular. De igual manera se pudo identificar el gen que originó la resistencia. Se encontró que los genes *bla<sub>TEM</sub>* eran más comunes en adultos que en niños y se llegaron a encontrar de manera duplicada y triplicada (Mrowiec et al. 2019).
- Desarrollo de una PCR multiplex para diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente a antibióticos, por Salim y colaboradores. Para el diseño de esta PCR multiplex se consideraron diferentes genes que causan resistencia a antibióticos y las mutaciones que presentan. Se evaluó la resistencia mediante la amplificación de 3 genes, RIF (*rpoB*), INH (*katG*) y EMB (*embB*). Dentro del estudio también se menciona que el estudio es eficiente en cuanto a costo, tiempo, y

---

que tiene una mayor especificidad y sensibilidad que los métodos fenotípicos. Ellos obtuvieron los siguientes resultados en un gel de electroforesis (Figura 9 y 10) en éstos se observan dos bandas cuando presenta dos genes de resistencia y uno cuando es una resistencia simple (Salim et al. 2019).

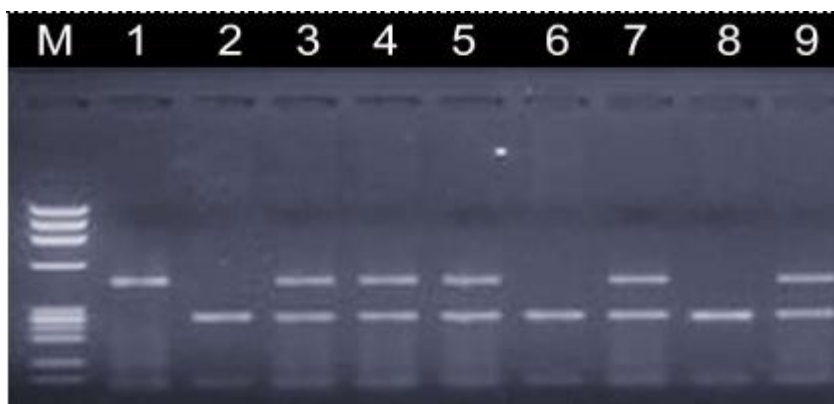


Figura 9: Patrón obtenido para resistencia simple y múltiple de cepas mltiresistentes utilizando PCR multiplex (Salim et al. 2019)



Figura 10: Patrón obtenido para cepas resistentes a EMB (Salim et al. 2019)

- Comparación para la detección de resistencia antimicrobiana de la prueba de sinergia de discos combinados y PCR, por Nusrat y colaboradores. En este estudio se comparó un método fenotípico cuantitativo contra una PCR para identificar cepas resistentes a metalo beta lactamasas. En los resultados se encontró que la PCR es una técnica altamente sensible para identificar una resistencia antimicrobiana (Nusrat et al. 2019).

---

---

## JUSTIFICACIÓN

La diarrea mata alrededor de 525,000 niños menores de 5 años al año en el mundo, siendo la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años. La diarrea causada por enfermedades entéricas es un factor de morbilidad y mortalidad mayor a nivel mundial. Se estima que cada año se dan de 2 a 4 mil millones episodios de diarrea infecciosa, especialmente en infantes. Adicionalmente la resistencia antimicrobiana ocasiona que los tratamientos con antibióticos más usados se vuelvan ineficientes, y al desconocer sobre la resistencia se propicia el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos. Por lo que hoy en día se ha vuelto esencial en el tratamiento conocer si el agente causante de infección tiene algún tipo de resistencia antimicrobiana.

El diagnóstico o procedimiento de preferencia para identificar el agente etiológico de una diarrea infecciosa es un coprocultivo. El resultado de un coprocultivo puede llegar a tardar hasta 7 días, el tratamiento para una diarrea aguda debe comenzar 3 días posteriores al inicio de los síntomas (12 horas después de la infección), por lo que se debe desarrollar un método de diagnóstico más rápido. El diagnóstico por biología molecular mediante una PCR brinda resultados en un día o menos, lo que facilita la detección del patógeno y agiliza la indicación del tratamiento. Adicionalmente al identificar si tiene un gen de resistencia a antibiótico permite conocer un tratamiento más efectivo para la infección. Esta propuesta de PCR multiplex permite la identificación de las enterobacterias *Shigella spp*, *Enterococcus spp*, *Salmonella spp* y *E. coli*, y de 3 genes para resistencia a antibióticos comúnmente encontrados en enterobacterias para eficientizar el diagnóstico de diarrea causada por infección

---

---

## OBJETIVOS

### GENERAL

Realizar un diseño *in silico* para una PCR multiplex mediante el uso de herramientas bioinformáticas para proponer el diagnóstico molecular de *Shigella spp*, *Enterococcus spp*, *Salmonella spp* y *E. coli* y su posible resistencia a antibióticos beta-lactámicos y quinolonas.

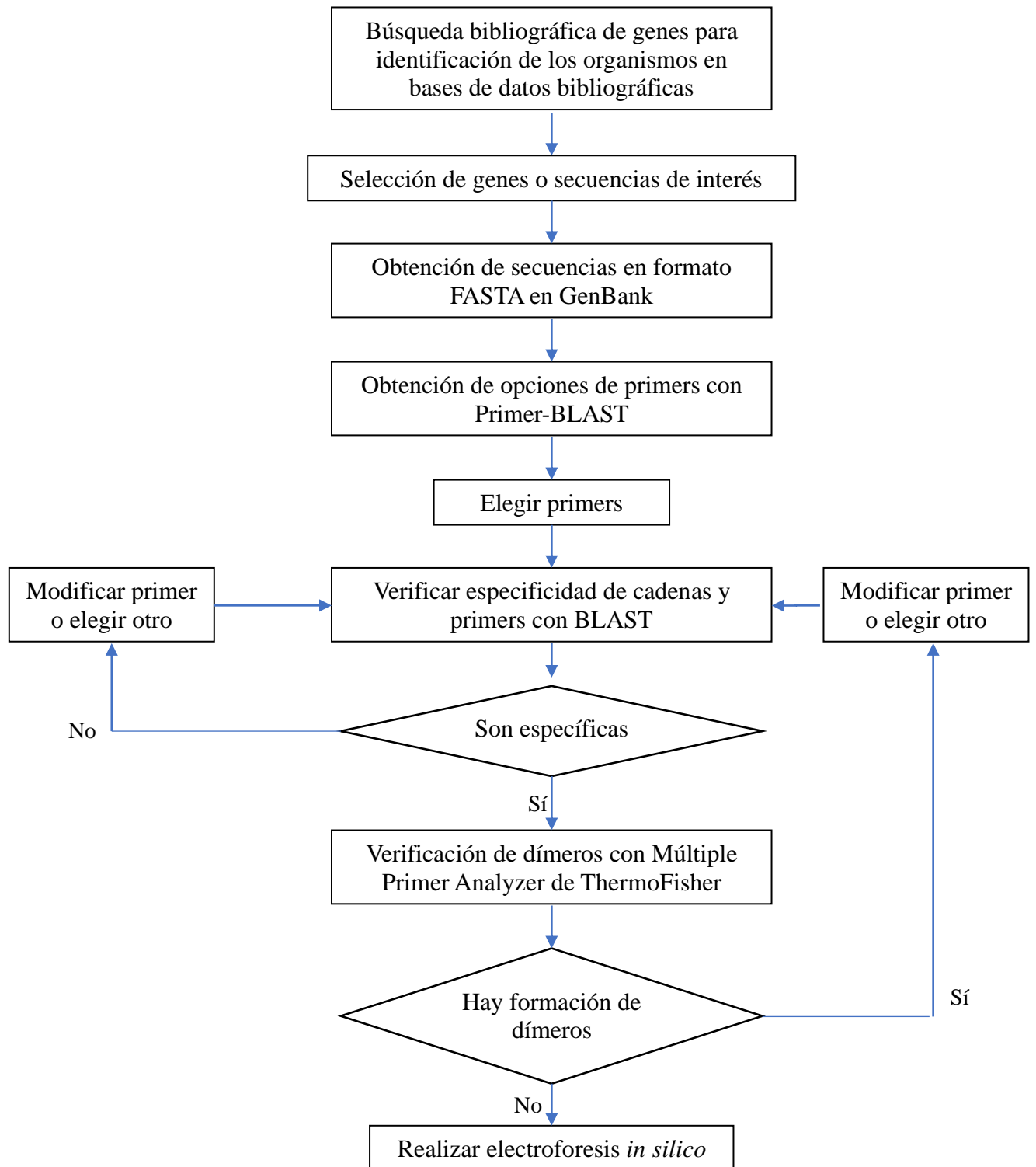
### PARTICULARES

- Mediante una revisión bibliográfica identificar los genes candidatos para el diseño de primer que permitan la identificación específica de *Shigella spp*, *Enterococcus spp*, *Salmonella spp* y *E. coli*.
- Obtener las secuencias de los genes seleccionados en las bases de datos especializadas
- Hacer uso de diversas herramientas bioinformáticas para llevar a cabo el diseño de los primers.
- Realizar el análisis bioinformático de los pares de primers para verificar los parámetros necesarios que garanticen su especificidad, eficiencia y fidelidad.
- Realizar una electroforesis *in silico* para visualizar los resultados posibles de la PCR multiplex.

---

---

## MATERIAL Y MÉTODOS





---

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Selección de secuencias

Mediante una revisión bibliográfica se determinaron los genes más característicos de cada género. La búsqueda bibliográfica se realizó en las bases de NCBI, Nature y Springer. Con los resultados en la búsqueda se determinaron los genes a amplificar en la PCR multiplex para la identificación de cada organismo y de las resistencias antimicrobianas, así como los controles (tabla 5).

Tabla 5: Genes objetivo de amplificado para la identificación de organismos, resistencia a antibióticos y controles.

	Gen
<i>Shigella spp.</i>	Fragmento de genoma
<i>E. coli (enteropatógena)</i>	<i>bfpA</i>
<i>Salmonella spp.</i>	<i>invA</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>tuf</i>
Resistencia a beta lactámicos	<i>Tem-1</i> y <i>blaIMP</i>
Resistencia a quinolonas	<i>qnrB</i>
Control negativo	Fragmento de cromosoma X de <i>Drosophila melanogaster</i>
Estándar interno	<i>16s rRNA</i>

- Identificación de *Shigella*

Los géneros de *Shigella* y *Escherichia* comparten una gran parte de su genoma y la mayoría de sus genes, por lo que realizar una PCR múltiple que los identifique individualmente requiere la amplificación de fragmentos que no compartan. Brenner y colaboradores determinaron que la similitud de la secuencia entre *Shigella* y *E. coli* se encuentra entre el 80% y 90% dependiendo de la especie (Brenner et al. 1972). El género *Shigella* es filogenéticamente un *E. coli* que posteriormente fue clasificada como especie separada debido a sus características bioquímicas y relevancia clínica. Su identificación generalmente se realiza con pruebas bioquímicas y serológicas; sin embargo, debido a su

---

---

similitud, algunas veces no es posible su diferenciación por estos métodos (Devanga Ragupathi et al. 2018).

Para la identificación de *Shigella* por PCR, algunos de los genes que se utilizan en ensayos para su identificación son el *virA* y el *ipaH*. El gen *ipaH* es un gen que codifica para una ubiquitina quinasa que regula la respuesta inflamatoria aguda en el hospedero, Vu y colaboradores desarrollaron un método de identificación de *Shigella* mediante la amplificación del gen *ipaH*, encontrándolo en 55 muestras de las 60 analizadas (93%). En el estudio se propuso la amplificación de este gen como método de identificación de este género, ya que las 4 especies de *Shigella* lo contienen; sin embargo, también se menciona que este gen puede encontrarse en *E. coli* (Vu et al. 2004). Al analizar la secuencia con la herramienta de BLAST, se encontró un 100% de similitud con algunas cepas de *E. coli*, por lo que utilizar este gen para la identificación no generaría resultados específicos del género, por lo que se opta por utilizar un fragmento del genoma que no está relacionado a un gen en particular.

El gen *virA* codifica para un factor de virulencia implicado en la diseminación intracelular. Cassabone y colaboradores desarrollaron un método de diagnóstico por PCR para identificar *Shigella* en pacientes con diarrea; encontraron que el gen *virA* servía para la identificación de *Shigella*. Se diseñaron distintos primers para la identificación de *Shigella* mediante la amplificación de distintos genes pertenecientes al género *Shigella* (*ial*, *ipaH*, (Pavlovic et al. 2011)*set*, *sen*, y *virA*). De estos genes se encontró *virA* en el 100% de las muestras (Casabonne et al. 2016). Por otro lado, Villalobo y Torres realizaron una PCR para identificar *Shigella* y *E. coli* utilizando el gen *virA*. Dentro de la PCR que realizaron encontraron que *virA* se encontraba en ambas especies (Villalobo and Torres 1998).

Debido a la gran similitud de *Shigella* con *E. coli* se han desarrollado técnicas para su diferenciación a nivel molecular. Pavlovic y colaboradores desarrollaron una PCR duplex para la diferenciación de ambas. La PCR que se desarrolló fue una PCR en tiempo real que determinó la presencia de dos genes, *lacY* y *uidA*.

---

---

*uidA* es un gen presente en el género *Shigella* y *E. coli*, por otro lado, *lacY* es un gen presente exclusivamente en *E. coli*. Con esos datos se analizaron muestras previamente identificadas como *E. coli* y de todos los géneros de *Shigella*. Para la diferenciación de los géneros se determinó que si la muestra analizada contenía ambos genes se trataba de *E. coli*, por otro lado, si sólo contenía el gen *uidA* la muestra se trataba de *Shigella*. Pavlovic y colaboradores encontraron que todas las muestras fueron positivas para el gen *uidA*, y de estas todas las muestras negativas para el gen *lacY* correspondían a *Shigella* (Pavlovic et al. 2011).

Por otro lado, Løbersli y colaboradores realizaron también una PCR duplex con los genes *lacY* e *ipaH*, en este caso el gen *ipaH* se encuentra presente en ambos géneros y el *lacY* solamente en *E. coli*. El análisis se realizó mediante PCR en tiempo real y dentro de sus resultados encontraron un 100% de concordancia (Løbersli et al. 2016).

- Identificación de *E. coli*

*E. coli* es una bacteria saprofítica del intestino que causa diarrea; sin embargo, existen distintas cepas que pueden causarla; la más común es la cepa enteropatógena (EPEC). Para la identificación de *E. coli* se amplificó un fragmento del gen *bfpA*, éste codifica para la subunidad estructural principal del *pilli* formador de haces, este gen es exclusivo de la cepa enteropatógena, por lo que un resultado positivo indica que se trata de esta cepa en particular. Shimu y colaboradores realizaron un análisis de las deposiciones de pacientes con diarrea para identificar *Shigella*, *Salmonella* y *E. coli*, dentro del cual diferenciaron *E. coli* EPEC utilizando el gen *bfpA*. Encontraron que realizar una PCR para el gen *bfpA*, para identificar las *E. coli*, EPEC resultaba más económico y requería un menor tiempo que el diagnóstico tradicional (Shimu et al. 2013). Con el uso de este gen también se evitan falsos positivos debido a que no se identificará cualquier otro tipo de *E. coli* que pueda encontrarse en la muestra.

- Identificación de *Enterococcus*

El gen *tuf* fue utilizado para identificar el patógeno *Enterococcus*, éste es el factor de elongación *tu*. Este gen está conservado en el género, por lo que su amplificación permite la

---

---

identificación específica del género (Ois Picard et al. 1999). Ke y colaboradores desarrollaron en 1999 una PCR para identificar *Enterococcus* a nivel de género, mediante la amplificación del gen *tuf*, ya que previamente el diagnóstico molecular sólo incluía a las especies clínicamente relevantes. La secuencia de *tuf* se encuentra en todas las especies de *Enterococcus*; sin embargo, en algunas especies tiene variaciones en la secuencia. A pesar de lo anterior, hay regiones que se comparten, por lo que se debe elegir como blanco de amplificación una parte de esta secuencia (Ke et al. 1999). Para este diseño se verificó que la cadena amplificada se encontrara en las diferentes especies de *Enterococcus* que se encuentran en la base de datos de GenBank.

- Identificación de *Salmonella*

Para la identificación de *Salmonella* se utilizó el gen *invA* que codifica para la proteína de invasión A. Este gen es propio del género *Salmonella* y se encuentra dentro del locus que permite la entrada de *Salmonella* a las células epiteliales. Su amplificación permite la identificación específica de este género.

Rahn y colaboradores identificaron el género de *Salmonella* mediante una PCR que amplificaba el gen *invA*, encontrando el amplificado en todas las especies estudiadas, a excepción de dos cepas de *S. litchfield* y dos cepas de *S. senftenberg*. (Rahn et al. 1992)

- Control interno

Por otro lado, el control interno que se utilizó fue *16s rRNA*, ésta es una región conservada en todas las bacterias, por lo que amplificará en el caso de existir cualquiera bacteria dentro de las muestras. El control interno se utiliza como un control positivo, ya que siempre debe amplificar cuando se encuentren bacterias en la muestra. El gen *16s rRNA* se utiliza frecuentemente como control interno y adicionalmente existen bases de primers para su amplificación. El par de primers para este gen se tomó del artículo de Lu y Pandit en el que se establecen primers universales para la identificación de esta secuencia (Lu et al. 2000; Pandit et al. 2005). De esta manera se asegura que la secuencia se amplificará correctamente bajo las condiciones especificadas, ya que ha sido utilizado en diferentes ocasiones. Adicionalmente, su amplificación permite conocer si se está llevando a cabo una

---

---

infección. Si este fragmento se amplifica, pero no se observa la amplificación de otro fragmento se puede determinar que hay bacterias en la muestra, y se pueden descartar las bacterias dentro de esta PCR multiplex (Pandit et al. 2005).

- Identificación de resistencia a beta lactamasas

Para la enzima de la beta lactamasa se utilizaron los genes *Tem-1* y *blaIMP*. Existen distintos genes que brindan resistencia a los antibióticos beta lactámicos (Hu et al. 2019). Identificar una resistencia a algún antibiótico con sólo un gen resulta inespecífico, ya que el patógeno puede presentar la resistencia debido a un gen diferente al estudiado, por lo que realizar el análisis de la resistencia con más de una familia de genes aumenta la posibilidad de determinar la resistencia mediada por genes.

El gen *Tem-1* codifica para una beta lactamasa de espectro extendido. Es uno de los genes con mayor prevalencia en bacterias resistentes a antibióticos, especialmente en *E. coli* (Samaha-kfoury and Araj 2003). El gen *blaIMP* codifica para una metalo beta lactamasa que brinda resistencia a los antibióticos beta lactámicos (Bunney, et al 2017). Se ha identificado en distintas enterobacterias, por lo que es un gen de interés al analizar la resistencia de antibióticos beta lactámicos. Es un gen de resistencia que surgió recientemente, y se ha encontrado en varias bacterias Gram negativo, como lo son las enterobacterias (Galani et al. 2008).

- Identificación de resistencia a quinolonas

Para la resistencia a la quinolona se utilizó el gen *qnrB*, los genes *qnr* son una familia que proporciona resistencia a las quinolonas. El gen *qnrB* se ha encontrado en diversos plásmidos en bacterias resistentes a quinolonas en enterobacterias. Su amplificación permite conocer si la bacteria presenta la resistencia a este antibiótico (Yan et al. 2017). Migma et al identificaron bacterias resistentes a las quinolonas mediante la identificación por PCR de genes de la familia *qnr*. Aislaron los genes *qnrA*, *qnrS* y *qnrB* de cepas resistentes a quinolonas. Dentro de los resultados encontraron que el gen *qnrB* es el que presentaba mayor prevalencia dentro de las muestras analizadas. Adicionalmente encontraron una relación entre la presencia de genes *qnr* y genes de resistencia a beta

lactámicos de amplio espectro, lo que indica que los genes están relacionados en las bacterias multirresistentes (Migma et al. 2008). Debido a que la PCR está diseñada para la identificación de enterobacterias se decidió utilizar el gen *qnrB* para la identificación de la resistencia.

## Obtención de secuencias

Se identificaron los genes de cada género en la página de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) como se muestra a continuación en la figura 11:

Nucleotide  [Create alert](#) [Advanced](#)

Summary ▾ 20 per page ▾ Sort by Default order ▾ [Send to: ▾](#)

See [invA](#) EscV/YscV/HrcV family type III secretion system export apparatus protein in the Gene database  
[invA](#) reference sequences [Protein \(1\)](#)

**Items: 1 to 20 of 255843**

<< First < Prev Page  of 12793 [Next](#) > [Last](#) >>

- [Salmonella typhimurium \*invA\* \(\*invA\*\) gene, complete cds](#)
  1. 2,176 bp linear DNA  
Accession: M90846.1 GI: 154154  
[Protein](#) [PubMed](#) [Taxonomy](#)  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)
- [Salmonella enterica subsp. houtenae strain ATCC 43974 \*invA\* \(\*invA\*\) gene, complete cds](#)
  2. 2,058 bp linear DNA  
Accession: MK017942.1 GI: 1583088039  
[Protein](#) [Taxonomy](#)  
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

Figura 11: Captura de pantalla de GenBank con los resultados para el gen *invA* para la identificación de *Salmonella*. Se muestra la barra de búsqueda y los resultados con los secuencias con las que se cuenta para la solicitud.

---

---

Una vez elegidos los genes a utilizar se obtuvo la secuencia en formato FASTA para el diseño de los primers. En la Figura 5 se muestra un ejemplo de la secuencia FASTA que se obtuvo.

FASTA ▾

### Salmonella enterica subsp. houtenae strain ATCC 43974 InvA (invA) gene, complete cds

GenBank: MK017942.1

[GenBank](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

>MK017942.1 Salmonella enterica subsp. houtenae strain ATCC 43974 InvA (invA) gene, complete cds

```
GTGCTGCTTTCTACTTAAACAGTGCTGTTTACGACCTGAATTACTGATCCTGGTACTAATGGTGATGA
TCATTTCTATGTTCTGTCATTCCATTACCTACCTATCTGGTTGATTTTCTGATCGCACTAAATATCGTACT
GGCGATTTTAGTGTTTATGGGGTCGTTCTACATTGACAGAATCCTCAGTTTTCAACGTTTCTCGCGTA
CTGTTAATTACAACGCTCTTTCTGCTGGCATTATCGATCAGTACCAGTCTCTATTTTATGATCGAAGCTG
ATGCCGGGAAATTTATCGCCACGTTTCGGGCAATTGTTATTGGCGATAGCCTGGCGGTGGTTTTGTTGT
CTTCTCTATTGTCCAGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTTCAAGCGCTCGCGGAAAGTCGCG
GCCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAACAGATGAGTATCGATGCCGATTTGAAGGCCGATTTA
TTGATGCGGATGCCGCGCGCAACGACGAAGCGTACTGGAAAGGAAAGCCAGCTTTATGGTTCCTTTGA
CGGTGCGATGAAGTTTATCAAAGGTGACGCCATTGCCGGCATCATTATCATCTTTTGTGAATTTATGGC
GGTATTTCTGGTGGGGATGACCCGCCATGGTATGGATTTATCCTCCGCTCTGTCTACTTATACCATGCTGA
CCATTGGTGGTGTCTTGTGCGCCAGATCCCCGATTGTTGATTGCGATTAGTGCCGGTTTTATCGTGAC
TCGCGTCAATGGCGATAGCGATAAATGCGGCGAAATCATGACGCGAGCTGTTGAACAACCCATTTGTA
TTGGTTGTTACGGCTATTCTGACCATCTCAATGGGGACTCTGCGGGATTTCCGCTGCCAGTTTTTGTTA
TTCTGGCGGTGGTTTTAAGCGTGCTCTTCTATTTTAAATCCGTGAAGCAAAACGTAGCGCCGCAAGCC
TAAAACAGTAAAGGCGAGCAGCCGCTCAGTATTGAGGAAAAAGAAAGGACGTCGTTAGGACTGATTGGC
GATCTCGATAAAGTCTCTACAGAGACCGTACCTTTGATATTAAGTGGTCCGAAAGTCGACGTGAAGATT
TGGAGAAAGCGCAGCTTGGGATCGTTTACGTAGCCAGTCTTTATTGACTATGGTGGCGCTTGGCGGA
GGTATTATTACCGGATGGTGAGGGCGTGAGCGATAACAGCATTGTATTGTTGATTAAATGAGATCCGTGT
GAACAATTTACGGTCTACTTTGATTGATGCGCGTGGTAAATATTCCGATGAAGTCGCTTCTTTGGCA
TTAATCCAACGACCTATCATCAAGGTAGTAGTCAATTTCTGGGTAACGCATGAAGAAGGAGAAAAACT
TCGGGAGCTTGGTTACGTGCTGCGAAATGCGCTTGACGAGCTTTATCATTTGCTGGCGGTGACACTCGCG
CGTAACGTCAATGAATATTTCCGGTATTCAGGAAACAAAACATATGCTGGATCAGCTGGAGGGCAAAATTC
CTGATTTACTTAAAGAAGTGTCTCAGACATGCCACGGTGAACGTATCTCTGAAGTTTGCAGCGTTTGT
AAGCGAACGTGTTCCGTGCGTAAATGAAATTAATTATGGAAGCGCTCGCATTGTGGGCACCAAGAGAA
AAAGACGTTATTAACCTTGTGGAACATATTCGTGGAGCAATGGCGGTTATATCTGCCATAAATTCGCCA
ATGGCGGTGAATTACGAGCAGTAAATGGTATCAGCTGAAGTTGAGGATGTTATTCGCAAAGGGATCCGTCA
GACCTCTGGCAGTACCTTCTCAGTCTTGAACCGGAGGCTCCGCTAATTTGATGGATCTCATTACGCTT
AAGCTGGATGATTTATTGATCGCACATAAAGATCTTGTCTCCTTACGTCTGTTGATGTCGCCGATTTA
TTAAGAAGATGATTGAAGGTGTTTTCCGGATCTGGAGGTTTTGCTTTTGGTGAATAGCAGATAGCAA
GTCAGTAAATGTCATAAAAAACATATAA
```

Figura 11: Resultado de FASTA de la secuencia utilizada para la identificación de *Salmonella*

La secuencia FASTA (Figura 11) muestra la secuencia de nucleótidos en dirección 5' a 3' del gen seleccionado. Con esta secuencia se prosigue al paso del diseño de primers.

### Diseño de primers

El diseño de primers se realizó en Primer-BLAST. Primer-BLAST se basa en Primer3 para diseñar la cantidad de primers solicitados, adicionalmente analiza las secuencias arrojadas mediante BLAST para verificar la especificidad de los primers. Posteriormente utiliza un

algoritmo para determinar que los primers no tengan complementariedad. En caso de no cumplir con los requisitos se analiza otra secuencia hasta que todas las secuencias solicitadas cumplan con las especificaciones (Jian et al. 2012).

Se introdujo la secuencia y se eligió la longitud del amplificado de acuerdo con el tamaño de los genes. Para que se pueda realizar el análisis de la PCR es necesario que los amplificados tengan una longitud diferente. Durante el diseño se especificó la longitud aproximada que deben tener los amplificados para que la lectura no sea confusa, como se observa en la figura 13, resaltado en amarillo, la herramienta permite especificar la longitud deseada del producto.

The image shows the Primer-BLAST web interface. The top section is titled "PCR Template" and contains a text area for entering a sequence, with a "Clear" button and a "Range" section for "Forward primer" and "Reverse primer". Below this is a "Seleccionar archivo" button and the text "Ningún archivo seleccionado". The bottom section is titled "Primer Parameters" and contains several input fields: "Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)" with a "Clear" button, "Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)" with a "Clear" button, "PCR product size" with "Min" (290) and "Max" (310) fields highlighted in yellow, "# of primers to return" (10), and "Primer melting temperatures (Tm)" with "Min" (57.0), "Opt" (60.0), "Max" (63.0), and "Max Tm difference" (3) fields.

Figura 13: Captura de pantalla de Primer-BLAST. Se observa, en las casillas marcadas con amarillo, la especificación del intervalo de longitud de producto de PCR deseado para la identificación de *Salmonella*. Resultado en amarillo se indican las casillas para especificar la longitud del producto de PCR Tomada el 15 de octubre de 2019.

Como se muestra en la figura 12, esta herramienta permite especificar las características de los primers. Dentro de las características que se pueden determinar son: Tamaño del amplificado, Tm de los primers y especificar el primer a utilizar.

Cuando la diferencia de la longitud es mínima los resultados no son claros al correrlos en un gel de electroforesis. Los marcadores de peso comúnmente utilizados son de 100 bp, por lo que una diferencia aceptable entre las longitudes de los amplificados es de alrededor de



100 bp. De esta manera se seleccionó la longitud aproximada de los amplificadores para el diseño de la PCR multiplex y se diseñaron los primers con la especificación del amplificado.

Para elegir la longitud de los amplificadores, primeramente, se consideró la longitud del gen del que se obtuvo el amplificado. Con estos datos se determinó el orden en que se espera se encuentren en el gel de electroforesis (Tabla 6).

Los primers obtenidos son los siguientes:

Tabla 6: Primers obtenidas para amplificación y sus características fisicoquímicas. La Tm de mayor valor es de 67.0°C y la de menor valor es de 61.9°C, con una diferencia de 5.1°C

	Tamaño del amplificado	Gen	Tm (°C)	Primer	Secuencia de primer
<i>Shigella spp.</i>	71 bp	<i>ipaH</i>	62.9	Forward	GACCATGCTCGCAGAGAAAC
			64.9	Reverse	CTCCCGACACGCCATAGAAA
	544	<i>lacY</i>	62.9	Forward	GGGAGCCTACTTCCCGTTTT
			64.3	Reverse	GTTGGCACCTACCGCATTG
<i>E. coli</i>	132 bp	<i>bfpA</i>	62.9	Forward	GGGAGCCTACTTCCCGTTTT
			64.3	Reverse	GTTGGCACCTACCGCATTG
<i>Salmonella spp</i>	188 bp	<i>invA</i>	64.0	Forward	ACTATTCAGGGATGCGCCAG
			64.2	Reverse	GGACAGCGCTTGAAATGCTT
<i>Tem-1</i>	448 bp	<i>Tem-1</i>	66.3	Forward	TGAGAGTTTTTCGCCCCGAAG
			64.2	Reverse	TTGTTGCCGGGAAGCTAGAG
<i>qnrB</i>	247 bp	<i>qnrB</i>	63.7	Forward	GTGAAAGCCAGAAAGGGTGC
			65.0	Reverse	ACGACTTTCGAAAAATTGGCGT
<i>Drosophila Melanogaster</i>	413 bp	Fragmento cromosoma X	61.9	Forward	CACTTACCTCACTGACCGCA
			67.0	Reverse	TGCATGGATGCGTGTCTTCA
<i>Enterococcus spp.</i>	336 bp	<i>tuf</i>	63.6	Forward	GACAAGTTCGCGTTGGTGAC
			63.4	Reverse	AAGCACCGATGTTATCGCCT
<i>16s rRNA</i>	201 bp	<i>16s rRNA</i>	65.9	Forward	AGGAGGTGATCCAACCGCA
			63.6	Reverse	AACTGGAGGAAGGTGGGGAT

## Análisis de composición de primers

Las opciones de primers, así como su Tm y %GC se obtuvieron mediante el uso de Primer-BLAST. Con las especificaciones de esta herramienta se puede obtener una serie de pares de primers que cumplan con las especificaciones señaladas que se adecuen a las necesidades de la PCR. En la figura 13 se observa que dentro de los resultados se incluyen los valores de Tm y %GC.

**Detailed primer reports**

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGCTGGATGTGCCTGACTAT	Plus	20	21	40	59.89	55.00	2.00	2.00
Reverse primer	CCCTGACGTGGAACCTGTCA	Minus	20	182	163	59.89	55.00	4.00	3.00
Product length	162								
Primer pair 2									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACTATTCAGGGATGCGCCAG	Plus	20	36	55	59.89	55.00	4.00	1.00
Reverse primer	CTCGTCGAGCAGGGATGAAA	Minus	20	131	112	59.83	55.00	7.00	0.00
Product length	96								
Primer pair 3									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTATTCAGGGATGCGCCAGA	Plus	20	37	56	59.61	55.00	4.00	2.00
Reverse primer	GGACAGCGCTTGAATGCTT	Minus	20	223	204	59.76	50.00	6.00	3.00
Product length	187								
Primer pair 4									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTTTTTCATCCCTGCTCGACG	Plus	20	110	129	59.28	55.00	4.00	3.00
Reverse primer	TGACGTGGAACCTGTCAACCG	Minus	20	179	160	60.53	55.00	4.00	2.00
Product length	70								
Primer pair 5									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATTGCGCGGTGACAAGTTCC	Plus	20	154	173	59.04	50.00	4.00	0.00
Reverse primer	ATCCGGACAGCGCTTGAAA	Minus	19	227	209	60.00	52.63	6.00	2.00
Product length	74								
Primer pair 6									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CACCTCAGTCTCAGGGCAAAT	Plus	21	135	155	60.00	52.38	7.00	2.00
Reverse primer	AATCCGGACAGCGCTTGAA	Minus	19	228	210	60.00	52.63	6.00	3.00

Figura 14: Captura de pantalla de los resultados de primers de Primer-BLAST para *Salmonella*. Los resultados indican la secuencia, la longitud del producto de PCR, la longitud del primer, el %GC y la Tm. Tomada el 9 de septiembre de 2020.

Las opciones de primers que arroja la herramienta de Primer-BLAST se generan de acuerdo con los parámetros especificados dentro del formulario. A partir de las opciones que arroja la herramienta se eligen los que mejor se adapten a los parámetros de la reacción.

Adicionalmente se verifica que no formen dímeros, en cuyo caso se debe elegir otro juego de primers. Los parámetros a considerar para la elección de primers son la  $T_m$ , ya que la diferencia entre los oligos no debe ser mayor a  $5^{\circ}\text{C}$ , el %GC, y que no tengan complementariedad. Primer-BLAST verifica que los primers arrojados como opciones no presenten complementariedad; sin embargo, debido a que se trata de una PCR multiplex las opciones de primers pueden tener complementariedad con los primers de los otros amplificados.

Los parámetros utilizados para el diseño y evaluación de primers fueron los siguientes (Tabla 7).

Tabla 7: Parámetros establecidos para la obtención de primers en Primer-BLAST

Parámetro	Valor
Longitud de primers	15-25 pb
$T_m$	$57-63^{\circ}\text{C}$
Concentración de primers	$.05 \mu\text{M}$
Concentración de sales	50 mM

### **Análisis de dímeros**

Posteriormente se comprobó que no formarían dímeros mediante el programa Multiple Primer Analyzer de ThermoFisher, con el que se comprobó que su formación era negativa. En la figura 15 se observa que no se encontraron resultados para formación de dímeros.

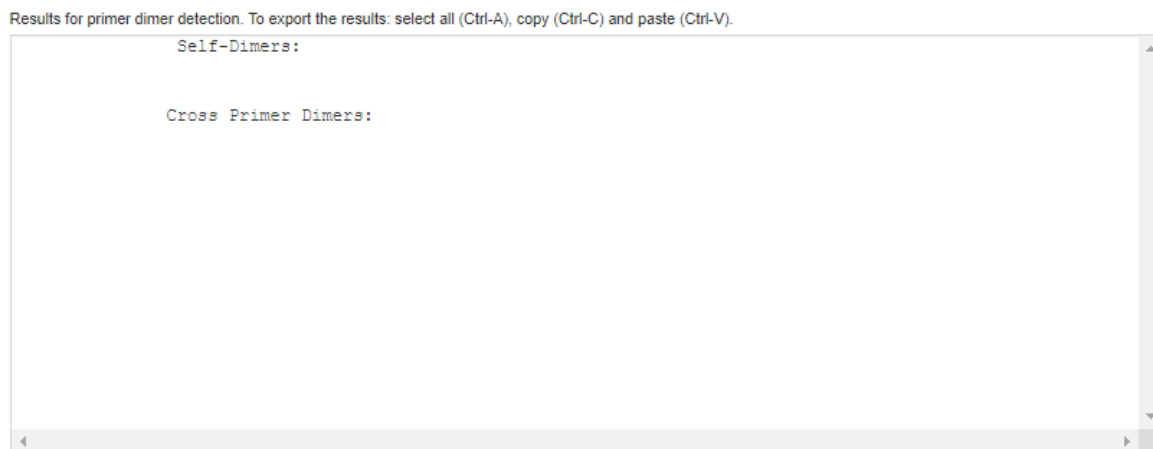


Figura 15: Captura de pantalla del resultado ThermoFisher Multiple Primer Analyzer para los primers diseñados. Tomada el 15 de octubre de 2019.

El programa Multiple Primer Analyzer de ThermoFisher utiliza los datos termodinámicos obtenidos por Breslauer et al en 1986, en donde caracterizaron termodinámicamente las interacciones de los pares de bases en cadena doble. Con los resultados obtenidos se desarrollaron fórmulas termodinámicas que permiten predecir la estabilidad de la doble hélice conociendo la conformación de una cadena simple (Breslauer et al. 1986).

### **Análisis de especificidad**

Para comprobar que las secuencias amplificadas y los primers fueran específicos se utilizó la herramienta de BLAST. Mediante el alineamiento se puede conocer que las secuencias amplificadas corresponden al organismo de interés y que los primers no amplifiquen con otras secuencias, formando falsos positivos. En el caso de los organismos y de los controles se encontró que las secuencias amplificadas son exclusivas de los organismos de interés, por lo que se elimina la posibilidad de productos no específicos.

Debido a que para *Salmonella*, *Shigella* y *Enterococcus* se requiere identificar el género, se verificó que en los resultados de BLAST se encontraran las distintas especies de los géneros. En el caso de *E. coli*, se verificó que sólo se obtuviera coincidencias con las cepas enteropatógenas, debido a que ésta conforma parte de la microbiota (Guillaume Dalmasso

---

---

2015). Si se diseñaran los primers para todas las especies se encontraría siempre un valor positivo y no permitirían conocer el verdadero origen del padecimiento.

Para la resistencia antimicrobiana en el análisis con BLAST se buscó que los primers tuvieran similitud con varios organismos, como se observan en la figura 16. Si sólo se identifica en un género o especie el diseño de la PCR pierde la capacidad de identificar la resistencia en cualquiera de los organismos para los que se diseñó.

Rathore y colaboradores realizaron una PCR multiplex para la identificación de genes de resistencia a antibióticos en distintas cepas de *S. aureus*. Para esto primeramente realizaron la caracterización fenotípica y la confirmaron mediante biología molecular. Para la identificación de la resistencia a antibióticos realizaron una PCR para distintos genes de resistencia a diversos antibióticos, posteriormente realizaron la prueba de resistencia fenotípica en medio de cultivo con discos Kirby-Bauer de antibiótico. Encontraron que de 12 cepas que presentaban el gen de resistencia meticilina, sólo 11 presentaban la resistencia fenotípicamente. Encontraron que la identificación molecular para la detección de genes de resistencia es mejor que la prueba fenotípica (Rathore et al. 2018). Por lo que el tener el gen de resistencia no implica que la cepa presente la resistencia; sin embargo, es muy probable que la presente fenotípicamente. Por otro lado, debido a la gran cantidad de genes de resistencia a antibióticos que se han desarrollado, el no tener un gen de resistencia a antibiótico no implica que la cepa no sea resistente, ya que puede tener resistencia brindada por un gen no analizado molecularmente.

En el caso de *tem-1* el análisis de BLAST del amplificado indica que tiene una alta similitud (>99%) con una gran cantidad de patógenos y que cumple con lo que se buscaba. Adicionalmente el alineamiento de los primers es positivo con las bacterias de interés. De esta manera se asegura que la amplificación se llevará a cabo de manera correcta y no formará productos inespecíficos. Al analizar las cadenas con una similitud menor al 100% se verificó que los nucleótidos que no correspondían dentro de análisis no se encontraban en los primers y no causaran deleciones o inserciones. De esta manera se asegura que, a pesar de tener una diferencia en la secuencia de nucleótidos, el tamaño del amplificado será

igual en cualquier organismo en el que se identifique el gen de resistencia. Por otro lado, la verificación permite saber que se podrá conocer si el organismo en la muestra presenta la resistencia

Para *tem-1* el análisis de BLAST dio positivo con un 100% de similitud en una gran cantidad de bacterias, como se observa en la figura X. Con este resultado se puede afirmar que si la bacteria presenta este gen será identificado por la PCR. Es necesario que el alineamiento dé positivo con varias especies, ya que de esta manera se asegura que la resistencia será detectada independientemente de la especie que se analice.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	<a href="#">Klebsiella pneumoniae strain HKP0018 plasmid pHKP0018.2, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP061064.1</a>
✓	<a href="#">Klebsiella pneumoniae strain HKP0067 plasmid pHKP0067.2, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP061055.1</a>
✓	<a href="#">Cloning vector pcDNA3.1/ICUE3, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MT800778.1</a>
✓	<a href="#">Cloning vector pcDNA3.1/AKAR, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MT800777.1</a>
✓	<a href="#">Leclercia adecarboxylata strain 16400 chromosome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP060824.1</a>
✓	<a href="#">Klebsiella pneumoniae strain 25 CARB A plasmid pKP25CA-KPC, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MT571488.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica strain s21 plasmid pS21, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MT316184.1</a>
✓	<a href="#">Escherichia coli strain CE1681 plasmid pCE1681-D, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MT180433.1</a>
✓	<a href="#">Escherichia coli strain CE1537 plasmid pCE1681-B, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MT180431.1</a>
✓	<a href="#">Raoultella ornithinolytica strain 193104922 plasmid p104922-NDM, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MT062912.1</a>
✓	<a href="#">Pasteurella multocida strain Ban-PM7 chromosome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP052765.1</a>
✓	<a href="#">Pasteurella multocida strain Ban-PM4 chromosome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP052764.1</a>
✓	<a href="#">Citrobacter freundii strain MGH283 plasmid unnamed1, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP060655.1</a>
✓	<a href="#">Cloning vector pGPS-ArPi-Cre-Amp, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MN687827.1</a>
✓	<a href="#">Cloning vector pGPS-ArPi-Dre-Amp, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MN687826.1</a>
✓	<a href="#">Cloning vector pGPS-ArPi-FIpe-Amp, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MN687825.1</a>
✓	<a href="#">Cloning vector pGPS-LaPi-FIpe-Amp, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MN687820.1</a>
✓	<a href="#">Escherichia coli strain 253 plasmid p253, complete sequence</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MT648288.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Derby strain SA1982 plasmid unnamed, complete se</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">MT513102.1</a>

Figura 16: Resultados de BLAST del primer Reverse para TEM-1. En la figura se observa que la identidad es del 100% con distintos géneros de microorganismos patógenos. Tomada el 16 de septiembre de 2020.

De igual manera, para el gen *qnrB* se introdujo la secuencia a amplificar en la herramienta de BLAST y se verificó que amplificara en los diversos organismos de interés. Se obtuvo un 100% de similitud con varias especies, lo que indica que se puede utilizar para identificar la resistencia a quinolonas en distintos organismos. Esto es igualmente necesario para asegurar la identificación de la resistencia en cualquier especie.

Para verificar adicionalmente que los primers fueran específicos para cada producto a amplificar se introdujo la secuencia complementaria al primer en la herramienta de BLAST. Con este alineamiento se buscó comprobar la especificidad de los primers, obteniendo resultados positivos de 100% de identidad para los organismos en cuestión. De esta manera se asegura la especificidad de los primers y se evita la formación de productos inespecíficos. Como ejemplo en la figura 17 se muestra el alineamiento del primer Reverse para *Salmonella*, en la que se observa que los alineamientos obtenidos coinciden al 100% con el género de *Salmonella*

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	<a href="#">Salmonella enterica strain FDAARGOS_711 plasmid unnamed</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP055131.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain SL7207 plasmid pSL7202-1, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP053866.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain SS2017 plasmid pSS2017-1, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP053871.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi C strain 07-0715 plasmid unnamed, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP053399.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. arizonae serovar 13.g.z51:- strain 2009K0967 chromosome, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP053401.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica strain 2014K-0203 chromosome, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP053409.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica strain 2014K-1020 chromosome, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP053584.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. arizonae serovar 41;z4_z23:- strain 2016K-0011 chromosome, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP053321.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain OLF-FSR1_WB_Gull_ST-29 plasmid</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP051287.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain OLF-FSR1_WB_Junco_ST-35 plasmid</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP051281.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain OLF-FSR1_WB_Sparrow_ST-87 plasmid</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP051277.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella Enteritidis</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">LR794377.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain OLF-FSR1_WB_Hawk_ST-33 plasmid</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP051268.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium strain ST56 plasmid pST56-2, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP050741.1</a>
✓	<a href="#">Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain SE95 plasmid pSE95-2, complete genome</a>	40.1	40.1	100%	0.53	100.00%	<a href="#">CP050718.1</a>

Figura 17: Resultados de BLAST para la secuencia GGACAGCGCTTGAAATGCTT (reverse primer de *Salmonella*). En los resultados arrojados se encuentra *Salmonella* con 100% de identidad Tomada el 07 de Septiembre del 2020.

---

---

## Evaluación por electroforesis *in silico*

Para verificar que los productos pudieran ser evaluados se realizó una electroforesis *in silico*, obteniendo los siguientes resultados. La electroforesis se realizó en el software de SnapGene (Figura 18) en la que se puede obtener una simulación de un gel de agarosa y permite seleccionar un marcador, y la concentración y composición del gel.

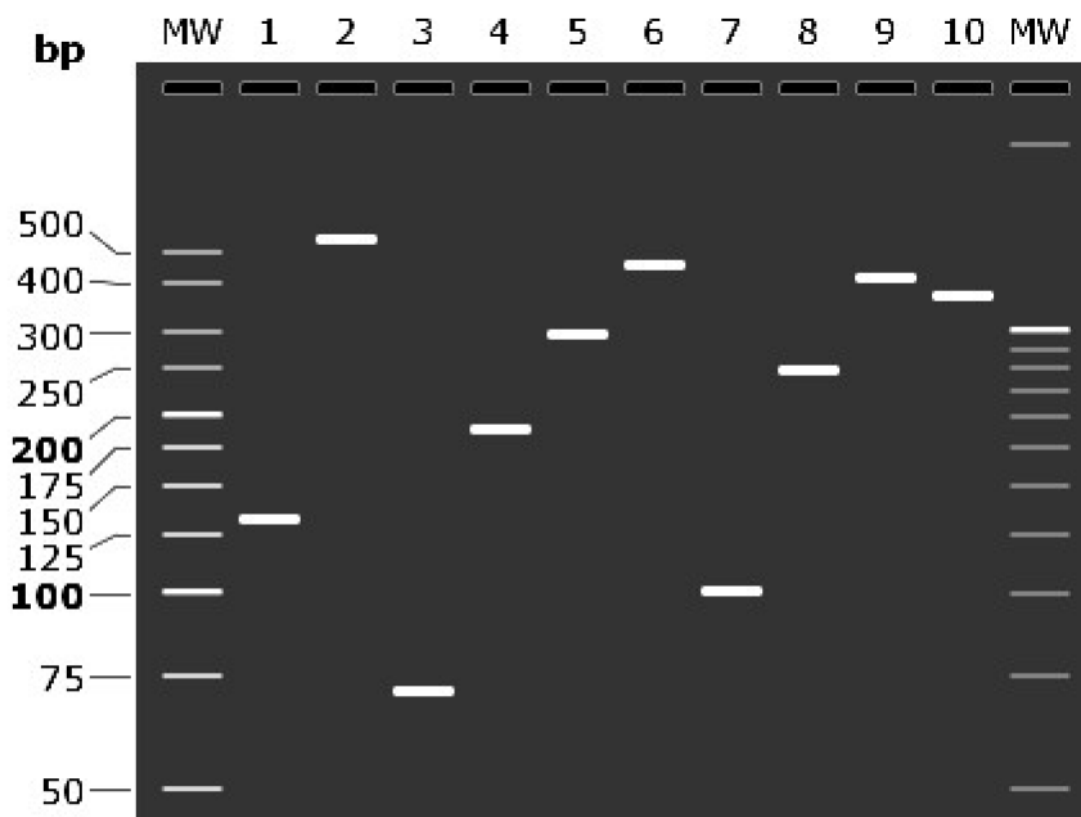


Figura 18: Electroforesis *in silico* de los amplificadores obtenidos. En el carril 1 se encuentra el gen *tuf*, en el carril 2 el gen *lacY*, en el carril 3 el gen *ipaH*, en el carril 4 el gen *invA*, en el carril 5 el gen *BlaIMP*, en el carril 6 el gen Tem-1, en el carril 7 el gen *bfpA*, en el carril 8 el gen *qnrB*, en el carril 9 el control negativo del cromosoma X de *Drosophila melanogaster*, y en el carril 10 el control positivo del gen *16srRNA*. La concentración de agarosa es de 3.5, con una simulación de una hora. Se utilizaron dos marcadores de peso, a la izquierda uno de 500bp y a la derecha otro de 25 bp.



---

Para comprobar que en caso de que se presentaran varios patógenos y resistencias en una sola muestra se pudieran diferenciar las bandas se realizó la electroforesis simulando una muestra con todos los posibles resultados (Figura 19). En esta se encontró que con las condiciones de la corrida electroforéticas las bandas se definen claramente y no se sobrelapan.

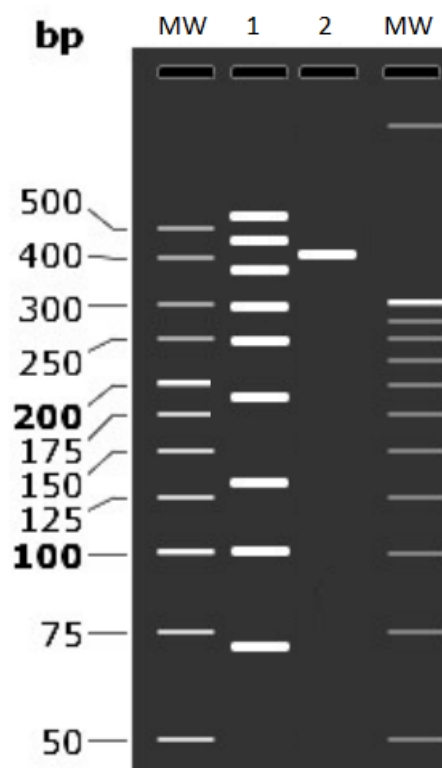


Figura 19: Electroforesis *in silico* de los amplificadores obtenidos en un solo carril. Se utilizó un marcador de peso de 500 bp, en el primer carril y otro de 25 bp en el último carril. La concentración de agarosa fue de 3.5% y se simuló a 1 hora. En el carril 1 se encuentran los fragmentos de los patógenos y genes de resistencia de interés y en el carril dos se encuentra cómo se observaría el control negativo en caso de presentarse.

Para la elaboración de la electroforesis *in silico* se introdujeron las secuencias amplificadas en la herramienta de SnapGene como se muestra en la figura 20. Una vez que se tuvieron delimitados todas las secuencias se obtuvo la electroforesis *in silico*. (Figura 18).

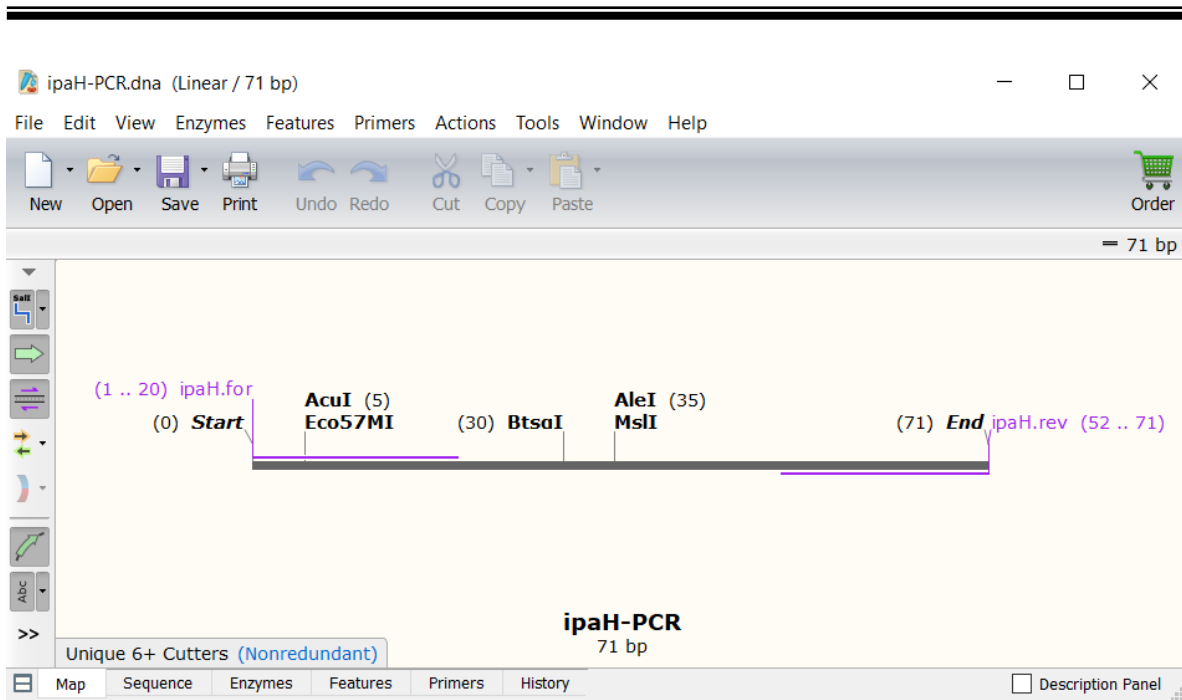


Figura 20: Captura de pantalla del software Snapgene en la que se muestra la delimitación de la secuencia de interés por los primers (morado) para el gen ipaH.

En la figura 20 se observan las secuencias de corte para enzimas de restricción, así como características del fragmento amplificado, en este caso se indica que el amplificado tiene una longitud de 71 bp, y se indica la localización de los primers.

Las herramientas utilizadas durante la elaboración permiten obtener una predicción del comportamiento de la reacción y de los resultados. De esta manera se puede tener más seguridad de que los primers funcionarán para el diagnóstico.

---

---

## CONCLUSIONES

Se realizó el diseño de una PCR multiplex para la identificación de *Shigella spp*, *Enterococcus spp*, *Salmonella spp* y *E. coli* para la resistencia a antimicrobianos beta-lactámicos y quinolonas. Se utilizó como control negativo un fragmento de cromosoma X de *Drosophila melanogaster* y como control interno el gen 16s rRNA. Se obtuvieron 9 pares de primers que permiten la identificación de las enterobacterias mencionadas y la identificación de los genes *Tem-1*, *blaIMP* y *qnrB*, que codifican para enzimas que dan resistencia a antibióticos beta lactámicos y quinolonas.

Con el software de SnapGene se realizó una electroforesis *in silico*, Las especificaciones de ésta (concentración de agarosa 2% y marcador de 500 pb) permiten conocer a qué corresponde el fragmento amplificado.

Con este trabajo se propone un método de diagnóstico para enterobacterias más económico y rápido. Esto permitirá el diagnóstico de *Shigella spp*, *Enterococcus spp*, *Salmonella spp* y *E. coli*, así como de resistencias a antibióticos beta lactámicos y quinolonas. De esta manera se facilita el diagnóstico de infecciones que causan diarrea.

---

---

## LITERATURA CITADA

- Ahsen, Nicolas V, Carl T. Wittwer, and Ekkehard Schu. 2001. "Oligonucleotide Melting Temperatures under PCR Conditions: Nearest-Neighbor Corrections for Mg." *Clinical Chemistry* 47(11):1956–61.
- Bagul, Uddhav S., and Sivagurunathan M. Sivakumar. 2016. "Antibiotic Susceptibility Testing: A Review On Current Practices." *Int J Pharm* 6(3):11–17.
- Batra, Vinod, Beard William, David Shock, Joseph Krahn, Lars Pedersen, and Wilson Samuel. 2006. "Magnesium Induced Assembly of a Complete DNA Polymerase Catalytic Complex." *Structure* 14(4):757–66.
- Bolivar, Ana Maria, Agustina Rojas, and Pablo Garcia-lugo. 2014. "PCR y PCR-Múltiple Parámetros Críticos y Protocolo de Estandarización." *Avances En Biomedicina* 3(1):25–33.
- Boratyn, Grzegorz M., Christiam Camacho, Peter S. Cooper, George Coulouris, Amelia Fong, Ning Ma, Thomas L. Madden, Wayne T. Matten, Scott D. McGinnis, Yuri Merezuk, Yan Raytselis, Eric W. Sayers, Tao Tao, Jian Ye, and Irena Zaretskaya. 2013. "BLAST: A More Efficient Report with Usability Improvements." *Nucleic Acids Research* 41(Web Server issue):29–33.
- Brenner, D. J., G. R. Fanning, A. G. Steigerwalt, I. Orskov, and F. Orskov. 1972. "Polynucleotide Sequence Relatedness among Three Groups of Pathogenic Escherichia Coli Strains." *Infection and Immunity* 6(3):308–15.
- Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker, and L. A. Marky. 1986. "Predicting DNA Duplex Stability from the Base Sequence." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(11):3746–50.
- Brown, Silas S., Yun-Wen Chen, Ming Wang, Alexandra Clipson, Eguzkine Ochoa, and Ming-Qing Du. 2017. "PrimerPooler: Automated Primer Pooling to Prepare Library for Targeted Sequencing." *Biology Methods and Protocols* 2(1):1–10.
- Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz, C. M. 2017. "乳鼠心肌提取 HHS Public Access." *Physiology & Behavior* 176(9):139–48.
- Burland, Timothy. 2000. "DNASTARS LASEGENE SEQ ANA SOFT.Pdf." Pp. 71–91 in *Methods in Molecular Biology*, vol.
- Casabonne, Cecilia, Agustina González, Virginia Aquili, and Claudia Balagueá. 2016.

---

---

“Prevalence and Virulence Genes of Shigella Spp. Isolated from Patients with Diarrhea in Rosario, Argentina.” *Japanese Journal of Infectious Diseases* 69(6):477–81.

CDC. 2016. “Diarrhea : Common Illness , Global Killer.” 1–4.

Clave, Puntos, Claudia Moreno M, Rubén González E, Constanza Beltrán, R. Vignoli, V. Seija, M. Farthing, Lei Yan, Dan Liu, Xin-hua Wang, Yunkun Wang, Bo Zhang, Mingyu Wang, Hai Xu, Sojib Bin Zaman, Muhammed Awlad Hussain, Rachel Nye, Varshil Mehta, Kazi Taib, Amira A. Moawad, Helmut Hotzel, Heinrich Neubauer, Ralf Ehricht, Stefan Monecke, Herbert Tomaso, Hafez M. Hafez, Uwe Roesler, Hosny El Adawy, Tamay De Dios L, C. Ibarra, and C. Velasquillo. 2017. “A Review on Antibiotic Resistance : Alarm Bells Are Ringing Origin of Antibiotic Resistance.” *Nature Publishing Group* 10(6):1–12.

Devanga Ragupathi, N. K., D. P. Muthuirulandi Sethuvel, F. Y. Inbanathan, and B. Veeraraghavan. 2018. “Accurate Differentiation of Escherichia Coli and Shigella Serogroups: Challenges and Strategies.” *New Microbes and New Infections* 21:58–62.

Elsalam, Kamel A. Abd-. 2003. “Bioinformatic Tools and Guideline for PCR Primer Design.” *African Journal of Biotechnology* 2(5):91–95.

Elsalam, Kamel A. Abd-, Md Mahbubur Tahminur Rahman, Muhammed Salah Uddin, Razia Sultana, Arumina Moue, Muntahina Setu, Mohini Joshi, J. D. Deshpande, Ana Maria Bolivar, Agustina Rojas, Pablo Garcia-lugo, Golam Mahmudunnabi, Al Nahian Khan Majlish, Farhana Momtaz, Md Javed Foysal, Md Mahbubur Tahminur Rahman, Kamrul Islam, Tania Nolan, Jim Huggett, Elena Sanchez, Howard Judelson, IRAM Rodríguez, HUGO Bareera, Claudia Moreno M, Rubén González E, Constanza Beltrán, Sojib Bin Zaman, Muhammed Awlad Hussain, Rachel Nye, Varshil Mehta, Kazi Taib, Jang J. Lu, Cherg L. Perng, Shih Y. Lee, Chih Chieng Wan, Lekha Pandit, Sanath Kumar, Indrani Iddya Karunasagar, Indrani Iddya Karunasagar, C. M. Bunney, P. E., Zink, A. N., Holm, A. A., Billington, C. J., & Kotz, L. B. Reller, M. P. Weinstein, C. A. Petti, Sheikheldin A. Abdelgader, Donglin Shi, Mianmian Chen, Lei Zhang, Hassan M. A. Hejair, Umair Muhammad, Huochun Yao, Wei Zhang, Adriana Cortazar, Elsa Silva, Pei Yun Lee, John Costumbrado, Chih-yuan Hsu, Yong Hoon Kim, Sameh Magdeldin, Zeev Ronai, M. Yakubovskaya, R. Vignoli, V. Seija, Puntos

- 
- Clave, M. Farthing, Lei Yan, Dan Liu, Xin-hua Wang, Yunkun Wang, Bo Zhang, Mingyu Wang, Hai Xu, Amira A. Moawad, Helmut Hotzel, Heinrich Neubauer, Ralf Ehricht, Stefan Monecke, Herbert Tomaso, Hafez M. Hafez, Uwe Roesler, Hosny El Adawy, Tamay De Dios L, C. Ibarra, C. Velasquillo, Sahil V Patel, Tejas C. Bosamia, Hiren N. Bhalani, Pratibha Singh, and Abhay Kumar. 2013. "PCR in Clinical Diagnosis." *Primer Guidelines* 2(1):1–12.
- Farthing, M. 2012. *Diarrea Aguda En Adultos y Niños : Una Perspectiva Mundial*. Reino Unido: Organización Mundial de Gastroenterología.
- Fluit, A., M. Visser, and F. Schmitz. 2001. "Molecular Detection of Antimicrobial Resistance." *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* 14(4):836–71.
- Galani, Irene, Panagiota Danai Rekatsina, Despina Hatzaki, Diamantis Plachouras, Maria Souli, and Helen Giamarellou. 2008. "Evaluation of Different Laboratory Tests for the Detection of Metallo- $\beta$ -Lactamase Production in Enterobacteriaceae." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61(3):548–53.
- Guillaume Dalmasso, Julien Delmas. 2015. "Escherichia Coli: The Good, the Bad and the Ugly." *Clinical Microbiology: Open Access* 04(02):2–4.
- Hartley, J. C., S. Kaye, S. Stevenson, J. Bennett, and G. Ridgway. 2001. "PCR Detection and Molecular Identification of Chlamydiaceae Species." *Journal of Clinical Microbiology* 39(9):3072–79.
- Howley, Peter M., Mark a Israel, Ming-Fan Law, and Malcolm a. Martin. 1979. "For Detecting Heterologous DNAs and Mapping Homology." *The Journal of Biological Chemistry* 254(11):4876–83.
- Hu, Yanhong Jessika, Anju Ogyu, Benjamin J. Cowling, Keiji Fukuda, and Herbert H. Pang. 2019. "Available Evidence of Antibiotic Resistance from Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Paediatric Patients in 20 Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Bulletin of the World Health Organization* 97(7):486–501.
- Huang, Shu Huan, Yi Fang Lin, Ming Han Tsai, Shuan Yang, Mei Ling Liao, Shao Wen Chao, and Cheng Cheng Hwang. 2018. "Detection of Common Diarrhea-Causing Pathogens in Northern Taiwan by Multiplex Polymerase Chain Reaction." *Medicine (United States)* 97(23):1–5.

- 
- Jian, Ye, Coulouris George, Zaretskaya Irena, Cutcutache Ioana, Rozen Steve, and L. Madden Thomas. 2012. "Primer- BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction." *BMC Bioinformatics* 13(1):134.
- Joshi, Mohini, and J. D. Deshpande. 2011. "Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application." *International Journal of Biomedical Research* 2(1).
- Judelson, Howard. 2013. "Guidelines for Designing Primers." *Primer Guidelines* 10.06(April):1–5.
- Ke, Danbing, François J. Picard, Francis Martineau, Christian Ménard, Paul H. Roy, Marc Ouellette, and Michel G. Bergeron. 1999. "Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci." *Journal of Clinical Microbiology* 37(11):3497–3503.
- Khan Academy. 2019. "Polymerase Chain Reaction ( PCR ) Key Points : What Is PCR ?" Retrieved September 20, 2019 (<https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>).
- Konietzny, Ursula, and Ralf Greiner. 2003. "The Application of PCR in the Detection of Mycotoxigenic Fungi in Foods." *Brazilian Journal of Microbiology* 34(4):283–300.
- Kumari, Lavanya, and Amaravathi .Y. 2016. "Computation of Melting Temperatures (T<sub>m</sub>) of Oligonucleotides for High Throughput PCR Using MS-Excel." *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry* 02(06):06–11.
- L, Tamay De Dios, C. Ibarra, and C. Velasquillo. 2013. "Fundamentos de La Polimerasa (PCR) y de La PCR En Tiempo Real." *Investigación En Discapacidad* 2(2):70–78.
- Lee, Pei Yun, John Costumbrado, Chih-yuan Hsu, and Yong Hoon Kim. 2012. "Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments." (April):1–5.
- Løbersli, I., A. L. Wester, Å. Kristiansen, and L. T. Brandal. 2016. "Molecular Differentiation of Shigella Spp. from Enteroinvasive E. Coli ." *European Journal of Microbiology and Immunology* 6(3):197–205.
- Lorenz, Todd C. 2012. "Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol plus Troubleshooting and Optimization Strategies." *Journal of Visualized Experiments* (63):1–15.
- Lu, Jang J., Cherng L. Perng, Shih Y. Lee, and Chih Chieng Wan. 2000. "Use of PCR with Universal Primers and Restriction Endonuclease Digestions for Detection and Identification of Common Bacterial Pathogens in Cerebrospinal Fluid." *Journal of*

---

---

*Clinical Microbiology* 38(6):2076–80.

Magdeldin, Sameh. 2012. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. Croatia: InTech.

Mahmudunnabi, Golam, Al Nahian Khan Majlish, Farhana Momtaz, Md Javed Foysal, Md Mahbubur Rahman, and Kamrul Islam. 2018. “Molecular Detection and PCR-RFLP Analysis Using Pst1 and Alu1 of Multidrug Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Causing Urinary Tract Infection in Women in the Eastern Part of Bangladesh.” *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16(1):77–82.

Mason, W. J., J. S. Blevins, K. Beenken, N. Wibowo, N. Ojha, and M. S. Smeltzer. 2001. “Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection.” *Journal of Clinical Microbiology* 39(9):3332–38.

Maugeri, Gaetano, Iana Lychko, Rita Sobral, and Ana C. A. Roque. 2019. “Identification and Antibiotic-Susceptibility Profiling of Infectious Bacterial Agents: A Review of Current and Future Trends.” *Biotechnology Journal* 14(1):1–31.

Menon, P., K. Kapila, and V. Ohri. 1999. “Polymerase Chain Reaction and Advances in Infectious Disease Diagnosis.” *Medical Journal Armed Forces India* 55(3):229–31.

Migma, Dorji Tamang, Yong Seol Sung, Jae Young Oh, Young Kang Hee, Chul Lee Je, Chul Lee Yoo, Taek Cho Dong, and Jungmin Kim. 2008. “Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants QnrA, QnrB, and QnrS among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in a Korean Hospital.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(11):4159–62.

Mrowiec, Paulina, Karolina Klesiewicz, Marianna Małek, Iwona Skiba-Kurek, Iwona Sowa-Sierant, Małgorzata Skąłkowska, Alicja Budak, and Elżbieta Karczewska. 2019. “Antimicrobial Susceptibility and Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Strains of *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Pediatric and Adult Patients of Two Polish Hospitals.” *New Microbiologica* 14(42):1–23.

Nakatsu, C. 2013. *Microbial Processes/Community Analysis*. IN, USA: Purdue University.

Nolan, Tania, Jim Huggett, and Elena Sanchez. 2013. “Good Practice Guide for the Application of Quantitative PCR (QPCR).” *National Measurement System* 50.

Nusrat, Akter, Haque, Rahman, Dewanjee, Ahmed, and D. Rozario. 2019. “Comparative Study of CDST & Multiplex PCR to Detect MBL Producing Gram-Negative Bacilli among VAP Patients Admitted in a Public Medical College Hospital of Bangladesh.”



---

---

*Pathogens* 8(3):151.

- Ois Picard, Franç J., Francis Martineau, Christian Mé Nard, Paul H. Roy, Marc Ouellette, and Michel G. Bergeron. 1999. "Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci." *Journal of Clinical Microbiology* 37(11):3497–3503.
- Owczarzy, Richard, Andrey V. Tataurov, Yihe Wu, Jeffrey A. Manthey, Kyle A. McQuisten, Hakeem G. Almabrazi, Kent F. Pedersen, Yuan Lin, Justin Garretson, Neil O. McEntaggart, Chris A. Sailor, Robert B. Dawson, and Andrew S. Peek. 2008. "IDT SciTools: A Suite for Analysis and Design of Nucleic Acid Oligomers." *Nucleic Acids Research* 36(Web Server issue):163–69.
- Pandit, Lekha, Sanath Kumar, Indrani Karunasagar, and Iddya Karunasagar. 2005. "Diagnosis of Partially Treated Culture-Negative Bacterial Meningitis Using 16S RRNA Universal Primers and Restriction Endonuclease Digestion." *Journal of Medical Microbiology* 54(6):539–42.
- Patel, Sahil V, Tejas C. Bosamia, Hiren N. Bhalani, Pratibha Singh, and Abhay Kumar. 2015. "Polymerase Chain Reaction ( PCR )." *A Monthly Magazine of Agricultural and Biological Sciences* 13(9):10–12.
- Pavlovic, M., A. Luze, R. Konrad, A. Berger, A. Sing, U. Busch, and I. Huber. 2011. "Development of a Duplex Real-Time PCR for Differentiation between E. Coli and Shigella Spp." *Journal of Applied Microbiology* 110(5):1245–51.
- Polaina, Julio, and Andrew P. MacCabe. 2007. "Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications." *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* (January):1–641.
- Polysom. n.d. "Software for DNA, RNA and Cloning.Pdf." 1. Retrieved (<https://polysom.verilite.de/science/DNARNACloning.html>).
- Puerta, A., and F. Mateos. 2010. "Enterobacterias." *Medicine* 10(51):3426–31.
- Rahman, Md Tahminur, Muhammed Salah Uddin, Razia Sultana, Arumina Moue, and Muntahina Setu. 2013. "Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review." *Anwer Khan Modern Medical College Journal* 4(1):30–36.
- Rahn, K., S. A. De Grandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galán, and C. Ginocchio. 1992. "Amplification of an InvA Gene Sequence of Salmonella Typhimurium by Polymerase Chain Reaction as a Specific

- 
- Method of Detection of Salmonella.” *Molecular and Celular Probes* 6:271–79.
- Rathore, K., B. Joseph, D. Sharma, A. Gaurav, S. Sharma, M. Milind, P. Patel, C. Prakash, and L. Singh. 2018. “Evaluation of Multiplex Polymerase Chain Reaction as an Alternative to Conventional Antibiotic Sensitivity Test.” *Veterinary World* 11(4):474–79.
- Reller, L. B., M. P. Weinstein, and C. A. Petti. 2007. “Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing.” *Clinical Infectious Diseases* 44(8):1108–14.
- Rodríguez, IRAM, and HUGO Bareera. 2012. “La Reacción En Cadena de La Polimerasa a Dos Décadas de Su Invención.” *Ciencia UANL* 7(3).
- Romero Viamonte, Katherine, and Adriana Ulloa Castro. 2016. “Multiplex Polymerase Chain Reaction as Diagnostic Method of Sexually Transmitted Diseases.” *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecologia* 42(4):557–69.
- Ronai, Zeev, and M. Yakubovskaya. 1995. “PCR in Clinical Diagnosis.” *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 9:269–83.
- Salim, Saira, Gohar Zaman, Sidra Younis, Wajid Hussain, Umar Khurshid, and Muhammad Khadim. 2019. “Multiplex PCR for Rapid Diagnosis of Drug Resistant Mycobacterium Tuberculosis.” *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 29(09):833–37.
- Samaha-kfoury, Joumana N., and George F. Araj. 2003. “Clinical Review Spectrum Lactamases.” *Bmj* 327(22 November 2003):1209–13.
- Sarker, Md, Md Mannan, Md Ali, Md Bayzid, Abdul Ahad, and Zamila Bupasha. 2019. “Antibiotic Resistance of Escherichia Coli Isolated from Broilers Sold at Live Bird Markets in Chattogram, Bangladesh.” *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 6(3):272.
- Shimu, Saha, Tahmina Jhora Sanya, Paul Shikha, Jahan Azmi Israt, and Mahnub Khan Tarek. 2013. “Isolation and Identification of Enteropathogenic Escherichia Coli (EPEC) in Paediatric Diarrhoeal Patients by Detection of BfpA Gene by PCR.” *Bangladesh Journal of Medical Microbiology* 07(02):2–5.
- SnapGene. 2021a. “Create a Primer.” 1–4. Retrieved ([https://help.snapgene.com/m/user\\_guide/1/878663-create-a-primer](https://help.snapgene.com/m/user_guide/1/878663-create-a-primer)).

- 
- SnapGene. 2021b. "Features." 1–11. Retrieved (<https://www.snapgene.com/features/>).
- Tsalik, Ephraim L., Daphne Jones, Bradly Nicholson, Lynette Waring, Oliver Liesenfeld, Lawrence P. Park, Seth W. Glickman, Lauren B. Caram, Raymond J. Langley, Jennifer C. Van Velkinburgh, Charles B. Cairns, Emanuel P. Rivers, Ronny M. Otero, Stephen F. Kingsmore, Tahaniyat Lalani, Vance G. Fowler, and Christopher W. Woods. 2010. "Multiplex PCR to Diagnose Bloodstream Infections in Patients Admitted from the Emergency Department with Sepsis." *Journal of Clinical Microbiology* 48(1):26–33.
- Urbain, Jean. 2001. "Sense , Antisense , and Common Sense." *The Journal of Nuclear Medicine* 42(11):1670–73.
- Vignoli, R., and V. Seija. 2006. "Principales Mecanismos de Resistencia Antibiótica." Pp. 649–62 in *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Montevideo, Uruguay: Oficina del Libro FEMUR.
- Villalobo, Eduardo, and Antonio Torres. 1998. "PCR for Detection of Shigella Spp . in Mayonnaise These Include : PCR for Detection of Shigella Spp . in Mayonnaise." *Journal of Clinical Microbiology* 64(4):1242–45.
- Vincze, Tamas, Janos Posfai, and Richard J. Roberts. 2003. "NEBcutter: A Program to Cleave DNA with Restriction Enzymes." *Nucleic Acids Research* 31(13):3688–91.
- Vu, Thiem D., Orntipa Sethabutr, Lorenz V Seidlein, Tung V Tran, Canh G. Do, Chien T. Bui, Tho H. Le, Hyejon Lee, Huo-shu Houg, Thomas L. Hale, John D. Clemens, Carl Mason, and Trach D. Dang. 2004. "Detection of Shigella by a PCR Assay Targeting the IpaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam." *Journal of Clinical Microbiology* 42(May 2004):2031–35.
- Yan, Lei, Dan Liu, Xin-hua Wang, Yunkun Wang, Bo Zhang, Mingyu Wang, and Hai Xu. 2017. "Bacterial Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Aquatic Environments in China." *Nature Publishing Group* 7(40610):1–12.
- Zaman, Sojib Bin, Muhammed Awlad Hussain, Rachel Nye, Varshil Mehta, and Kazi Taib. 2017. "A Review on Antibiotic Resistance : Alarm Bells Are Ringing Origin of Antibiotic Resistance." *Cereus* 9(6):e1403.

