

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

“Implementación y estandarización de un método sensible y específico para la detección de *Escherichia coli* genérica, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Shigella* spp.”

T E S I S

para obtener el grado de

Especialista en Biotecnología

P R E S E N T A

I.B.T. Rubén Javier Jiménez Barranco

DIRECTOR

Dr. Francisco José Fernández Perrino

CO-DIRECTOR

Dr. Jesús Hernández Romano

06 DE FEBRERO DE 2016

“La Especialización en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001467”

México D.F. a ___ de _____ del 20__

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la idónea
comunicación de resultados

"Implementación y estandarización de un método sensible y específico para la detección
de *Escherichia coli* genérica, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Shigella* spp."

que presentó

Rubén Javier Jiménez Barranco

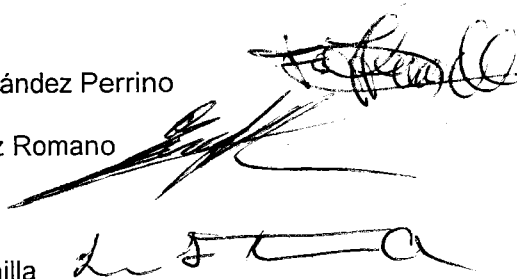
Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Co-director: Dr. Jesús Hernández Romano

Jurado:

Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla

The image shows three handwritten signatures in black ink. The top signature is for Dr. Francisco José Fernández Perrino, the middle one for Dr. Jesús Hernández Romano, and the bottom one for Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla. The signatures are written in a cursive, somewhat stylized script.

No.	Titulo	Pagina
1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN	3
3.1	Detección por técnicas moleculares	5
3.1.1.	Técnicas serológicas	5
3.1.1.1.	ELISA Directo	5
3.1.1.2.	ELISA Indirecto	6
3.1.1.3.	Pruebas inmunocromatográficas	6
3.1.2.	Técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos	7
3.1.2.1.	Hibridación de ácidos nucleicos	7
3.1.2.2.	Reacción en cadena de la polimerasa	7
4.	JUSTIFICACIÓN	10
5.	HIPÓTESIS	11
6.	OBJETIVOS	11
6.1.	Objetivo general	11
6.2.	Objetivos particulares	11
7.	METODOLOGÍA	12
7.1.	General	12
7.2.	Específica	12
7.2.1.	Materiales, equipos y reactivos	12
7.2.1.1.	Materiales	12
7.2.1.2.	Equipo	13
7.2.1.3.	Reactivos	13
7.2.2.	Búsqueda bibliográfica	15
7.2.3.	Determinación de propiedades fisicoquímicas de los oligonucleótidos	15
7.2.4.	Determinación de la especificad teórica	16
7.2.5.	Determinación individual de la temperatura de las curvas melting	16
7.2.6.	Estandarización	18

7.2.6.1.	Influencia de la [Mg²⁺] en la reacción de PCR	18
7.2.6.2.	Prueba de reacción de PCR multiplex, utilizando cuatro pares de oligonucleótidos	19
7.2.6.3.	Reacción de PCR para la detección <i>E. coli</i> y <i>Shigella</i> spp, utilizando el gen <i>uidA</i> y verificación de funcionalidad de oligonucleótidos ipaHFW e ipaHRw	22
7.2.6.4.	PCR Multiplex para la detección de <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>E. coli-Shigella</i> y PCR para discriminación de <i>Shigella</i>, con Kit ROCHE y con tres pares de oligonucleótidos.	25
7.2.6.5.	PCR multiplex para la detección de cuatro patógenos, utilizando tres pares de oligonucleótidos y optimización de reactivos	29
7.2.6.6.	Discriminación de <i>Shigella</i> spp. de <i>E. coli</i>	31
7.2.6.7.	Ajuste de reacciones de PCR en formato multiplex para la detección simultanea de <i>E. coli</i>, <i>Salmonella</i> y <i>Listeria</i>.	32
7.2.7.	Validación del método	33
7.2.7.1.	Sensibilidad	36
7.2.7.2.	Especificidad	36
7.2.7.3.	Límite de detección	37
7.2.7.4.	Selectividad	37
7.2.7.5.	Repetitividad	37
7.2.7.6.	Reproducibilidad	38
7.2.7.7.	Probabilidad de resultado positivo (PVP)	39
7.2.7.	Probabilidad de resultado negativo (PVN)	39
7.2.7.9.	Tasa de falsos positivos	39
7.2.7.10	Tasas de falsos negativos	40
7.2.7.11.	Eficiencia	40
7.2.7.12.	Selectividad	41
7.2.7.13.	Criterios de aceptación	41
8.	RESULTADOS	42
8.1.	Determinación de propiedades fisicoquímicas de los	42

oligonucleótidos seleccionados y determinación de especificidad teórica	
8.2.	Determinación individual de la T_m de las curvas melting 60
8.3.	Influencia de la [Mg²⁺] en la reacción de PCR 62
8.4.	Prueba de Reacción de PCR multiplex, utilizando cuatro pares de oligonucleótidos 62
8.5.	Reacción de PCR para la detección de <i>E. coli-Shigella</i>, utilizando el gen <i>uidA</i> y verificación de la funcionalidad de los oligonucleótidos ipaHFw e ipaHRw 63
8.6.	PCR multiplex para la detección de <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>E. coli-Shigella</i> y PCR para discriminación de <i>Shigella</i> 65
8.7.	PCR multiplex para la detección de cuatro patógenos, utilizando tres pares de oligonucleótidos y optimización de reactivos 72
8.8.	Discriminación de <i>Shigella</i> spp. de <i>E. coli</i> 75
8.9.	Ajuste de reacciones de PCR en formato multiplex para la detección simultanea de <i>E. coli</i>, <i>Salmonella</i> y <i>Listeria</i> 76
8.10.	Validación de la técnica 79
9.	DISCUSIÓN 88
10.	CONCLUSIONES 88
11.	BIBLIOGRAFÍA 90

1. RESUMEN

La implementación de un método para la detección simultánea de cuatro agentes patogénicos es de gran importancia, ya que se logra una reducción de costos y de tiempo, así como la posibilidad de encontrar simultáneamente a cuatro patógenos en una muestra. La implementación de la PCR multiplex utilizando el método SYBRGreen, fue realizada tomando en cuenta a los patógenos relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Entre los patógenos considerados peligrosos, se encuentran *E. coli* productora de las toxinas Shiga, *Salmonella entérica* subsp. *entérica*, *Shigella* spp. y *Listeria monocytogenes*, de los cuales se han reportados brotes a nivel mundial causando enfermedades diarreicas severas, enfermedades que son un problema en salud pública, afectando a los países en desarrollo, los padecimientos causados por estos patógenos, se tienen los siguientes casos; *E. coli* productora de shigatoxinas, la cual puede causar gastroenteritis que puede complicarse a colitis hemorrágica o el síndrome hemolítico-urémico, causa de insuficiencia renal en los niños, *Salmonella* entérica, patógeno que infecta a millones de personas cada año, la cual causa malestares, hospitalizaciones y muertes, otra enfermedad que ha generado gran polémica es listeriosis, causada por *Listeria monocytogenes* o *Listeria ivanovii*, de la cual cada año se han reportado alrededor de 1500 casos de listeriosis, causada casi siempre por consumo de alimentos crudos y el último caso de importancia para este trabajo tenemos a *Shigella* spp., causa shigelosis, regularmente es transmitida por consumo de agua y alimentos crudos y está relacionada por la falta de higiene de las personas. Se desarrolló un método capaz de detectar en una primera etapa a *E. coli* - *Shigella*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, y en una segunda etapa, determinar las toxinas shiga de *E. coli* y discriminar a *Shigella* de *E. coli*, no obstante, se realizó la validación del método con la finalidad de demostrar la funcionalidad del mismo mediante una serie de pruebas. El presente trabajo implementó, validó y optimizó tiempos y reactivos para la detección simultánea de cuatro patógenos en las instalaciones de la Universidad Politécnica del Estado de Morelos.

2. ABSTRACT

The implementation of a method for simultaneous detection of four pathogenic agents is of great importance, because a reduction of costs and time as well as the ability to detect simultaneously four pathogens in a sample. The implementation of multiplex PCR using the SYBRGreen method was performed taking into account the pathogens related food diseases. The Pathogens considered dangerous, are *E. coli* producing Shigatoxin, *Salmonella enterica* subsp *enterica*, *Shigella* spp and *Listeria monocytogenes*, they have been reported cases outbreaks severe diarrheal diseases worldwide, that are a public health problem, affecting developing countries, the damage caused by these pathogens, we have the following cases; *E. coli* producing Shigatoxin, which can cause gastroenteritis, hemorrhagic colitis, hemolytic-uremic syndrome and cause of kidney failure in children, *Salmonella enterica*, pathogen that infects millions of people each year, which cause discomfort , hospitalizations and deaths, another disease that has generated great controversy is listeriosis caused by *Listeria monocytogenes* or *Listeria ivanovii*, which each year have been reported over 1500 cases of listeriosis, caused mostly by eating raw food and the last case of importance of this work we have *Shigella* spp., that regularly is transmitted by consumption of water and raw food and is related by unhygienic people. In this paper, we implemented a method able to detect in a first stage to *E. coli*-*Shigella*, *Salmonella* spp, and *Listeria monocytogenes*, and in a second step, determine the shiga toxins of *E. coli* and discriminate *Shigella* of *E. coli*, however, the validation of the method was performed in order to demonstrate the functionality thereof by a series of tests . This paper implemented, validated and optimized time and reagents for the simultaneous detection of four pathogens in the building of “Universidad Politécnica del Estado de Morelos”

3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen un problema de salud a nivel mundial, no sólo en los países en vías de desarrollo sino también en los desarrollados. Diversos factores (ambientales, humanos, comerciales y culturales, entre otros) han influido para que cambien los escenarios en que estas enfermedades se manifestaban, así como los alimentos involucrados en ellas, convirtiéndolas en nuevos desafíos para la salud pública. Cada vez son más frecuentes los brotes de enfermedad gastrointestinal relacionados con la ingesta de vegetales frescos como lechuga, brócoli, hierbas aromáticas, nopal verdura, jitomate, cebolla, aguacates, etc. A pesar de la existencia de recomendaciones para la producción de alimentos con la mejor calidad microbiológica posible, la contaminación biológica sigue siendo elevada en los puestos de venta de diversos países del mundo (FDA, 2011).

Las enfermedades diarreicas continúan siendo un problema de salud pública que afectan a los países en desarrollo. A la población que afecta este tipo de enfermedades son a los niños menores de 5 años, las cuales son una de las diez principales causas de mortalidad en México, presentándose casos de más de 1 millón anualmente, afectando principalmente a los niños y niñas menores de un año de edad. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades diarreicas representan tan solo el 17% de las muertes en niños menores de cinco años de edad a nivel mundial (Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia, 2009)

Entre los patógenos ligados a vegetales que se consumen crudos se encuentran bacterias como *Escherichia coli* patógena, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Vibrio* sp., *Shigella* sp., etc., las cuales pueden causar diarrea aguda. Su remoción por métodos convencionales de lavado nunca es total, por lo que los controles de la contaminación deben realizarse en todos los niveles, desde el sitio de cultivo hasta la mesa del consumidor (FDA, 2011).

Salmonella entérica es considerada de importancia en salud pública, ya que se encuentra comúnmente ligada a la contaminación de alimentos a nivel internacional. Dicho patógeno infecta a millones de personas cada año, contabilizándose un estimado de 9.7%, 25.6% y

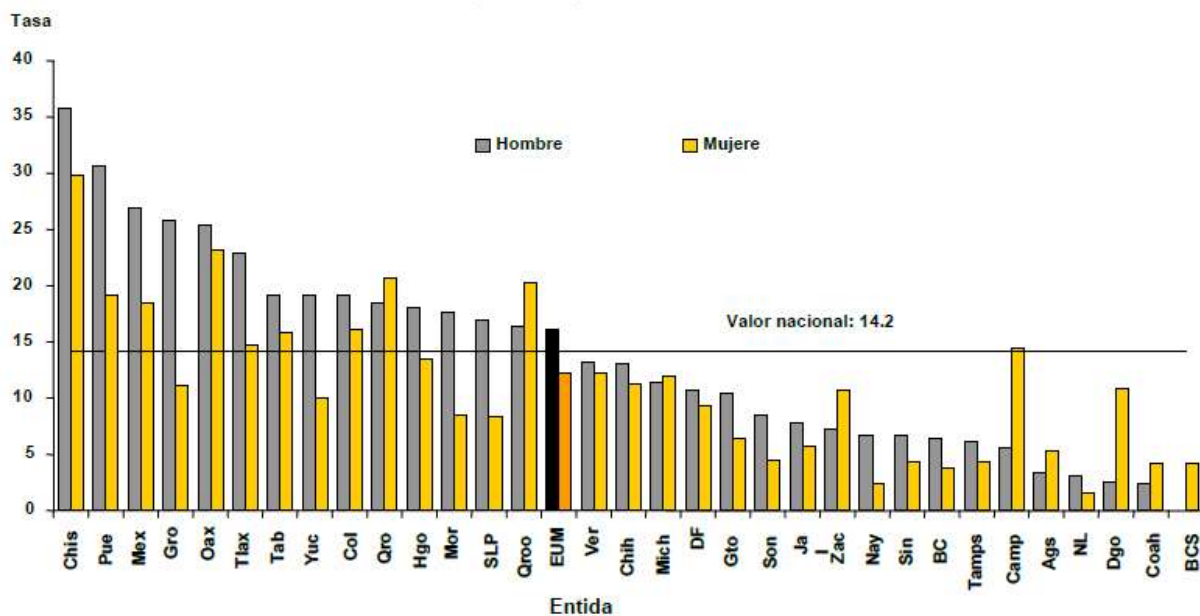
30.6% de malestares, hospitalizaciones y muertes, respectivamente, del total de casos conocidos de ETA en los Estados Unidos de América (*González-Escalona et al., 2009*).

Otra enfermedad que ha generado gran polémica es la listeriosis, causada por *Listeria monocytogenes* o *Listeria ivanovii* (aunque la mayoría de los casos de listeriosis son causados por la primera). En Europa, cada año se han reportado alrededor de 1500 casos de listeriosis, causada casi siempre por consumo de alimentos crudos (*Barbau et al., 2013*).

E. coli, se considera otro patógeno relacionado con ETA, las de mayor importancia son las productoras de shigatoxinas o verotoxinas, las cuales pueden causar enfermedades severas; en la mayor parte de los casos *E. coli* productora de shigatoxinas puede causar gastroenteritis que puede complicarse a colitis hemorrágica o el síndrome hemolítico-urémico, causa de insuficiencia renal en los niños (*Blanco et al., 2003*).

Entre otros patógenos comúnmente ligados a las ETA se encuentra *Shigella* spp. (incluso aunque comúnmente se considera transmitida por el agua). En este caso, generalmente se transmite por la falta de higiene de las personas que manipulan los alimentos. Entre los alimentos que han sido encontrados responsables de la transmisión de *Shigella* están las ensaladas de papas, mariscos, vegetales crudos y platos mexicanos. Este patógeno causa shigelosis (*Terragno et al., 2007*).

De acuerdo a los datos estadísticos de la Secretaría de Salud, el estado de Chiapas, fue quien reporto la tasa de mortalidad más alta, en cuestiones de enfermedades diarreicas, con 32.8 muertes por cada 100 mil habitantes menores de cinco años. En la siguiente figura se puede apreciar la tasa de mortalidad de cada estado, de mujeres y hombres (*López, et. al., 2009*);



1/ Tasa observada por 100 mil niños menores de 5 años
Fuente: SEED 2007, preliminar, DGIS-SS

Figura 1. Mortalidad por enfermedades diarreicas agudas en menores de cinco años por sexo y entidad federativa, México 2007. (López, *et. al.*, 2009)

Por lo comentado hasta aquí, es de vital importancia contar con técnicas moleculares sensibles, específicas y con el menor tiempo de análisis posible para la detección de dichos patógenos en alimentos frescos.

3.1. Detección por técnicas moleculares

Para la identificación correcta del agente causal de las ETA se pueden utilizar técnicas moleculares, que permiten una detección temprana del patógeno, antes de que el usuario consuma un alimento contaminado. Algunas de estas técnicas moleculares son:

3.1.1. Técnicas serológicas

Las técnicas serológicas son métodos inmunológicos ampliamente utilizados en la identificación de patógenos, dependen de la afinidad y especificidad del anticuerpo utilizado (Clark y Adams, 1977). Entre las técnicas serológicas se encuentran las siguientes:

3.1.1.1. ELISA Directo

Es una técnica serológica sencilla. El antígeno se une a una fase sólida (placa de poliestireno), y se añade un anticuerpo que se encuentra unido a una enzima que emite fluorescencia en presencia de un sustrato cromogénico. El anticuerpo unido a la enzima es

incubado con el antígeno, después de ser incubado se lava el exceso y se le agrega el sustrato cromogénico. El viraje a un color determinado indicará una interacción específica antígeno-anticuerpo (Clark y Adams, 1977).

3.1.1.2. ELISA Indirecto

En esta prueba el antígeno se adhiere a la placa, después se coloca un anticuerpo primario y por último es adicionado un anticuerpo secundario conjugado con una enzima, el cual emitirá fluorescencia cuando el antígeno, el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario conjugado con una enzima se encuentren unidos. Para obtener color, el anticuerpo primario (que es específico para el antígeno) debe estar presente en el complejo final. En el ELISA sándwich, un anticuerpo es adsorbido a la placa, después es colocada la muestra (que teóricamente contiene el antígeno de interés) con el objetivo de que el antígeno se una con el anticuerpo unido a la placa, un segundo anticuerpo acoplado a una enzima es utilizado después de agregar la muestra con el antígeno de interés. Con el anticuerpo conjugado a la enzima se obtiene el viraje del color del sustrato que indica la presencia del antígeno en la muestra. Esta técnica de ELISA es considerada la más específica y sensible comparada con las otras metodologías de ELISA (Clark y Adams, 1977). En la figura 1 se muestra como se unen los anticuerpos al antígeno.

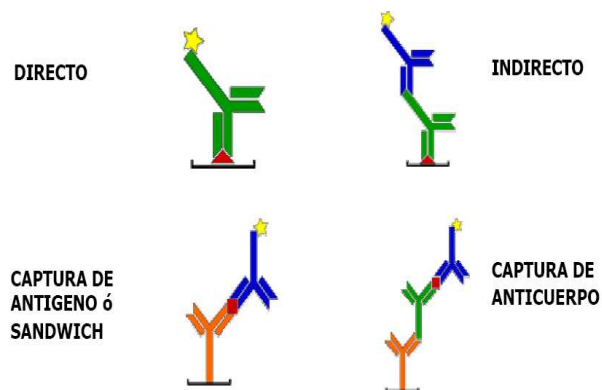


Figura 2. Esquema que muestra las variaciones de la prueba ELISA, ya sea directo, indirecto, captura del antígeno o captura del anticuerpo que capturó al antígeno (Rosales, 2002).

3.1.1.3. Pruebas inmunocromatográficas.

Es una técnica que utiliza reacciones específicas antígeno-anticuerpo y que es muy similar al test de ELISA en placa; en este caso la matriz sólida es una membrana especial de papel. El patógeno puede ser detectado en el tejido de la planta problema, al triturar un poco de muestra y ponerla en contacto con una membrana de nitrocelulosa o nylon en la que se

unirán los anticuerpos específicos del patógeno. Un cambio de color indicará un resultado positivo y mostrará la localización del patógeno en el tejido del hospedero. Este procedimiento ofrece la gran ventaja de poderse realizar en campo, con lo que se amplía el número de muestras que se pueden analizar (*Peña et al., 2006*).

3.1.2. Técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos

3.1.2.1. Hibridación de ácidos nucleicos.

Consiste en la generación de una sonda de DNA marcada con radioactividad o con un sustrato detectable, que se ha diseñado para que sea complementaria con una hebra del DNA blanco o con un RNA específico (*Levesque, 1997*). En la figura 2 se muestra como una sonda de DNA se une por hibridación con un RNA blanco.

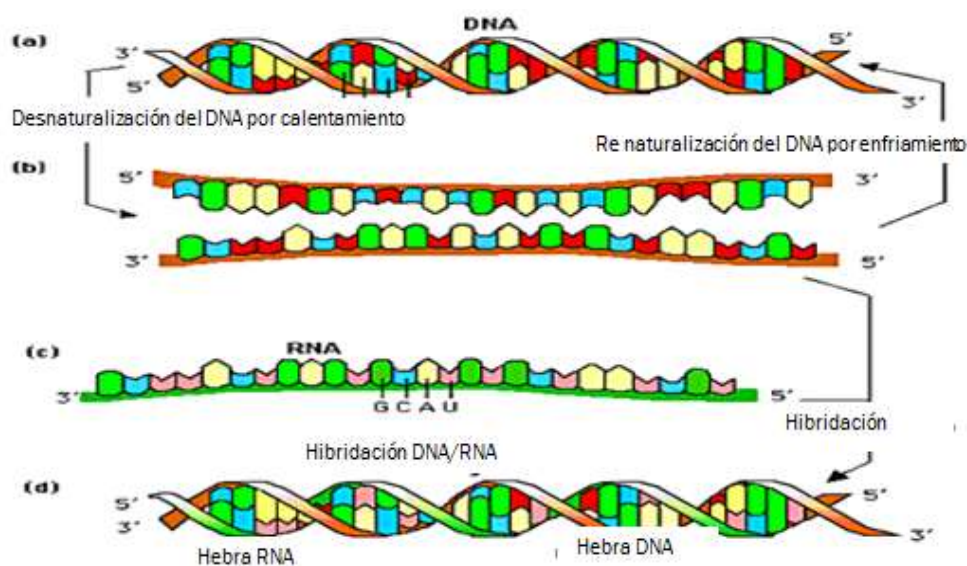


Figura 3. Hibridación de ácidos nucleicos. El DNA de doble hebra (a) es desnaturalizado por aplicación de calor (b). Una hebra del DNA hibrida por complementariedad de bases con el RNA diana (c), formando un híbrido DNA/RNA (d) al bajar la temperatura (modificado de *Miller y Martin, 1988*).

3.1.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por Kary Mullis en 1983, es un método de amplificación de ácidos nucleicos. La PCR se basa en la capacidad de la enzima DNA polimerasa para sintetizar una hebra de DNA complementaria a una hebra molde,

iniciando la síntesis a partir de unos cebadores o “primers” (oligonucleótidos sintéticos) (Lizcano, 2005). La técnica básica de PCR incluye ciclos repetidos de amplificación de secuencias seleccionadas de DNA. Cada ciclo consiste en tres pasos:

1. Desnaturalización a 94°C del DNA, en el cual se separan las dos cadenas del DNA blanco.
2. Unión de los primers o cebadores: al bajar la temperatura se unen las secuencias complementarias al blanco.
3. Extensión (72°C), en la cual la enzima DNA polimerasa extiende las secuencias a partir de los primers.

Al final de cada ciclo, la cantidad del producto se duplica. Todo el procedimiento se realiza en un termociclador programable. La siguiente figura muestra cómo funciona la técnica.

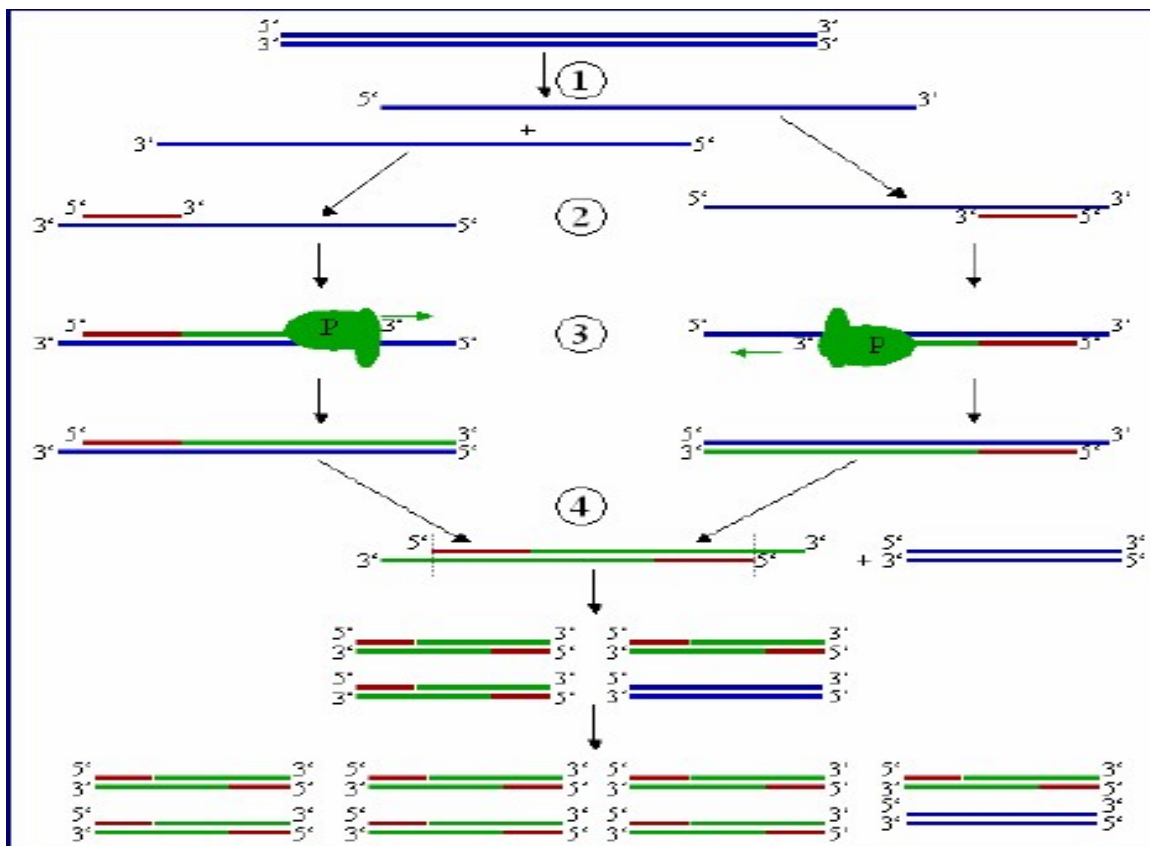


Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa. 1. Disociación de la doble hebra de DNA. 2. Hibridación de los cebadores. 3. Extensión de la hebra de DNA por medio de la incorporación de nucleótidos. 4. Doble hebra de DNA amplificadas (Rosales, 2002).

Todas estas pruebas ayudan a identificar el agente causal de la enfermedad. La técnica más sensible es la técnica de PCR, las técnicas serológicas no son tan específicas ni muy sensibles.

Existen Kits comerciales para la detección de patógenos en alimentos, entre los cuales están Kits para PCR, ELISA y pruebas bioquímicas, entre otros. Destaca la presencia de las siguientes marcas: DUPONT, BIO GX, CEPHEID, QIAGEN, ROCHE, con kits para:

- Detección de *Listeria monocytogenes* por PCR en tiempo real
- Detección de *E. coli* O157:H7 por PCR en tiempo real
- Detección de *Salmonella* spp por PCR en tiempo real
- Detección de *E. coli* Big Six por PCR en tiempo real
- Detección de *Campylobacter jejuni* por PCR en tiempo real
- Numeración de coliformes totales, pruebas rápidas por métodos convencionales

4. JUSTIFICACIÓN

La detección adecuada de agentes patógenos relacionados con las ETA, como *Shigella* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, contribuirá a que lleguen al consumidor alimentos inocuos y de calidad, logrando también que nuestro país sea competente para la exportación de productos frescos. En la actualidad, la detección de dichos patógenos, es realizada, generalmente, por pruebas bioquímicas, las cuales tardan alrededor de diez días para generar resultados confiables. Existen pruebas moleculares para su detección, sin embargo, hay pocas pruebas que detecten simultáneamente a cuatro patógenos.

La necesidad de detectar estos patógenos no sólo es importante para el consumidor, también lo es para el productor, debido a que si al producto fresco que es analizado le es detectado algunos de estos patógenos, generalmente es destruido, lo que genera pérdidas económicas cuantiosas. Los tiempos de detección también son vitales, ya que si se utilizan pruebas que tardan alrededor de 10 días, el producto fresco pierde vida de anaquel. En cambio, si se utilizan pruebas que simultáneamente detectan a cuatro patógenos en alrededor de dos días, el tiempo de vida de anaquel para el producto fresco se mantiene, evitando también pérdidas económicas al productor.

5. HIPÓTESIS

Mediante la selección de oligonucleótidos referenciados en artículos y manuales internacionales y la estandarización del método se logrará obtener una técnica sensible y específica que simultáneamente detectará a *Salmonella* spp., *E. coli*, *Shigella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

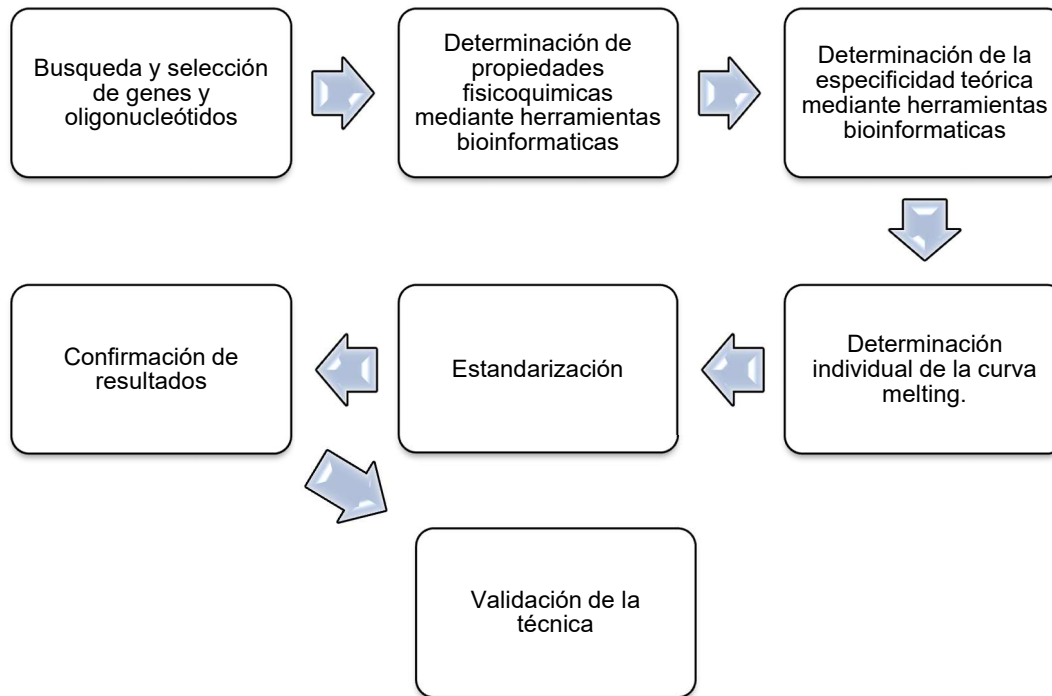
- Implementar y estandarizar una prueba sensible y específica para la detección simultánea de *Salmonella* spp., *E. coli*, *Shigella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

6.2. Objetivos particulares

- Realizar búsqueda bibliográfica de genes y oligonucleótidos utilizados para la detección de los patógenos de interés.
- Determinar las características fisicoquímicas de los oligonucleótidos seleccionados, así como la especificidad teórica.
- Estandarizar y validar el método.

7. METODOLOGÍA

7.1. General



7.2. Específica

7.2.1. Materiales, equipos y reactivos

Para llevar a cabo la metodología específica, se utilizaron los siguientes materiales, equipos y reactivos;

7.2.1.1. Materiales

- Puntas para micropipeta de 1000 μL , 200 μL y 10 μL
- Microtubos de 1.5 mL estériles
- Capilares para LightCycler
- Microtubos de 0.6 mL
- Cajas de Petri

7.2.1.2. Equipo

- Termociclador LightCycler 2.0
- Micropipeta de 200 uL
- Micropipeta de 10 uL
- Centrifuga
- Spin
- Incubadora
- Computadora

7.2.1.3. Reactivos

- Kit Fast start DNA Master SYBRGreen
- Kit de purificación de DNA, PureLink Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen
- DNA *Listeria monocytogenes*
- DNA *E. coli* O157:H7
- DNA *E. coli* O45:H10
- DNA *E. coli* O111:H8
- DNA *E. coli* O121:H19
- DNA *E. coli* O55
- DNA *E. coli* O113:H4
- DNA *E. coli* O26:H11
- DNA *E. coli* O145:H45
- DNA *E. coli* O103:H2
- DNA *Shigella flexneri* 2^a
- DNA *Shigella sonnei*
- DNA *Shigella dysenteriae*
- DNA *Shigella boydii*
- DNA *Pseudomonas aeruginosa*
- DNA *Citrobacter freundii*
- DNA *Yersinia enterocolitica*
- DNA *Streptococcus pneumoniae*
- DNA *Staphylococcus epidermidis*

- DNA *Staphylococcus aureus*
- DNA *Salmonella* Newport
- DNA *Salmonella* Agona
- DNA *Salmonella* Saint-Paul
- DNA *Salmonella* Typhimurium
- Agua grado PCR
- Oligonucleótidos para *Salmonella* spp. (González-Escalona et al., 2009)
 - InvA-176
 - 5'- CAACGTTTCCTGCGGTA CTGT- 3'
 - INvA-291-12
 - 5'- CCCGAACGTGGCGATAATT- 3'
- Oligonucleótidos para *E. coli* genérica (Feng et al., 2011)
 - UIdAF241
 - 5'- CAG TCT GGATCGCGA AAA CTG- 3'
 - UIdAR383
 - 5'- ACC AGACGTTGC CCA CAT AAT T- 3'
- Oligonucleótidos para *Shigella* spp. (Phantouamath et al., 2005)
 - ipa3
 - 5'-GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTCA-3'
 - ipa4
 - 5'-GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC- 3'
- Oligonucleótidos para *Listeria monocytogenes* (Omiccioli et al., 2009)
 - 634F
 - 5'- ACTTCGGCGCAATCAGTGA- 3'
 - 770R
 - 5'- TTGCAACTGCTCTTTAGTAACAGCTT- 3'
- Oligonucleótidos para la detección de Shigatoxina1 (Feng et al., 2011)
 - Stx1F934
 - 5'- GTGGCA TTA ATA CTG AAT TGT CAT CA -3'
 - Stx1R1042
 - 5'- GCG TAA TCC CAC GGA CTC TTC -3'
- Oligonucleótidos para la detección de Shigatoxina2 (Feng et al., 2011)

Stx2F1218

5'- GATGTT TAT GGCGGT TTT ATT TGC -3'

Stx2R1300

5'- TGG AAA ACT CAA TTT TAC CTTTAG CA -3'

Para la obtención de DNA se solicitaron cepas al Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, la solicitud fue realizada al M. en C. Armando Nava. Una vez recibidas, se procedió a promover el crecimiento, sembrando las cepas en medio BHI y posteriormente en medio TSA, con la finalidad de determinar la pureza. Para mantener viables por un año las cepas se almacenaron en glicerol al 40%. Del medio TSA se tomó una colonia y se colocó en medio BHI para posteriormente realizar la extracción de DNA con el Kit previamente mencionado. Las incubaciones se realizaron a 37°C (para todas las cepas)

7.2.2. Búsqueda bibliográfica

Se realizó búsqueda biográfica de artículos científicos, normas internacionales y nacionales para la selección de oligonucleótidos. La búsqueda se realizó en páginas de confianza, como Google Academic, Pubmed y bibliotecas virtuales de universidades.

7.2.3. Determinación de propiedades fisicoquímicas de los oligonucleótidos seleccionados

Para determinar dichas propiedades, se utilizó el software Oligo Analyzer de la página de Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/site>). Las características fisicoquímicas de interés fueron las siguientes:

- Temperatura media
- Formación de dímeros
- Formación de heterodímeros
- Formación de horquillas

Con los datos anteriores, se determinó si los oligonucleótidos eran óptimos para continuar con las pruebas en laboratorio.

7.2.4. Determinación de la especificidad teórica

La determinación de la especificidad teórica se realizó con el programa PrimerBLAST de la página del “Centro Nacional para la información en Biotecnología” (Por sus siglas en inglés, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

7.2.5. Determinación individual de la temperatura de las curvas melting

Protocolo

Se prepararon cinco mezclas de reacción, de acuerdo a la siguiente tabla;

Tabla 1. Reactivos y volúmenes necesarios para realizar la mezcla de reacción. Para realizar la mezcla, se utilizó el Kit Fast Star DNA Master SYBRGreen I, los cebadores utilizados por cada mezcla fueron los correspondientes al patógeno de interés a detectar.

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 6.5X
Vial 1 b (Mix PCR con enzima)	10 X	2X	4 uL	26 uL
MgCl ₂	25 mM	5 mM	4 uL	26 uL
H ₂ O	---	---	10.6 uL	68.9 uL
Oligo Forward	10 µM	0.10 µM	0.2 µL	1.3 uL
Oligo Reverse	10 µM	0.10 µM	0.2 µL	1.3 uL
Vol. final	---	---	19 uL	

Las mezclas preparadas fueron las siguientes:

- Mix Salm1; Oligonucleótidos utilizados; INVA-291-12 e INVA-176
- Mix *Shigella*; Oligonucleótidos utilizados; ipa3 e ipa4
- Mix Lm; Oligonucleótidos utilizados; 634F y 770R
- Mix Ecoli; Oligonucleótidos utilizados; UidA F241 y UidA R383

Preparadas las mezclas de reacción se procedió a colocar 1 uL de DNA blanco, realizando triplicados de control positivo y control negativo.

Programa del termociclador utilizado

Preparadas las reacciones, se procedió a programar el equipo, de la siguiente forma:

Tabla 2. Programa a utilizar en el termociclador.

Modo Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo de incubación	Modo Adquisición
Pre incubación					
Ninguno	1		95°C	5 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	40	Desnaturalización	95°C	10 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	10 s	Ninguno
		Extensión	72°C	15 s	Solo
Melting Curve					
Melting Curve	1	Desnaturalización	95°C	0 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	15 s	Ninguno
		Melting	95°C Rango de rampeo= 0.1°C/sec	0 s	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1		40°C	30 s	Ninguno

Interpretación de resultados

Para la interpretación de resultados se realizó un “Análisis Melting”. Dicho análisis fue realizado por el equipo, para lo cual las curvas obtenidas del “análisis Melting” debían tener un comportamiento gaussiano. Se observó a la temperatura a la cual se obtuvo el pico de la curva, temperatura que está ligada con la disociación del producto de PCR obtenido.

7.2.6. Estandarización

7.2.6.1. Influencia de la $[Mg^{2+}]$ en la reacción de PCR

Protocolo

Se prepararon tres mezclas de reacción de acuerdo a las siguientes tablas:

Tabla 3. Primera mezcla de reacción, sin adicionar magnesio.

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 4.5X
Vial 1 (Mix PCR con enzima)	5 X	1X	4 μ L	18 μ L
H ₂ O	---	---	14.6 μ L	65.7 μ L
Oligo UidA F241	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	0.9 μ L
Oligo UidA R383	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	0.9 μ L
Vol. final	---	---	19 μ L	85.5 μ L

Tabla 4. Segunda mezcla de reacción, con una concentración extra de magnesio de 2.5 mM

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 4.5X
Vial 1 (Mix PCR con enzima)	10 X	2X	4 μ L	18 μ L
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	2 μ L	9 μ L
H ₂ O	---	---	12.6 μ L	56.7 μ L
Oligo Forward	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	0.9 μ L
Oligo Reverse	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	0.9 μ L
Vol. final	---	---	19 μ L	85.5

Tabla 5. Tercera mezcla de reacción, con una concentración extra de magnesio de 5 mM

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 4.5X
Vial 1 (Mix PCR con enzima)	10 X	2X	4 µL	18 µL
MgCl ₂	25 mM	5 mM	4 µL	18 µL
H ₂ O	---	---	10.6 µL	47.7 µL
Oligo Forward	10 µM	0.10 µM	0.2 µL	0.9 µL
Oligo Reverse	10 µM	0.10 µM	0.2 µL	0.9 µL
Vol. final	---	---	19 µL	85.5 µL

Preparadas las mezclas de reacción se procedió a colocar 1 µL de DNA blanco, realizando duplicados de control positivo y control negativo.

Programa del termociclador a utilizar

El programa utilizado fue el mismo que el de la **Tabla 2**.

7.2.6.2. Prueba de reacción de PCR multiplex, utilizando los cuatro pares de oligonucleótidos.

Se realizó un ensayo de reacción de PCR para la detección de *E. coli* genérica, *Salmonella*, *Shigella* spp y *Listeria monocytogenes*, utilizando SYBR Green. La técnica de PCR en tiempo real que utiliza SYBR Green puede utilizarse para su uso en formato múltiplex, con base en la determinación de las temperaturas de disociación de las secuencias amplificadas. Esto ocurre debido a que el SYBR Green es una molécula intercalante que emite fluorescencia cuando se incorpora en el DNA de doble cadena, dicha fluorescencia se emite cuando un haz de luz de cierta longitud de onda se hace incidir en la muestra que contiene el DNA. La longitud de onda de máxima excitación del SYBR Green I es de 497 nm, un pico de excitación secundario se localiza cerca de los 254 nm.

Los pasos para realizar la PCR son los mismos que para una PCR de punto final, pero para obtener los resultados se debe anexar otro paso, conocido como "Melting Curve", donde el equipo va elevando la temperatura 0.1°C/seg y en cada cambio realiza lectura de fluorescencia. La curva resultante presenta un punto de inflexión que corresponde a la T_m

del amplicón correspondiente. De los datos de fluorescencia se obtiene la primera derivada del cambio de fluorescencia respecto la temperatura, la cual se grafica vs la temperatura, presentando un máximo que corresponde a la T_m del amplicón de interés.

Para la interpretación de los resultados se debe realizar una “Análisis de Melting”. La T_m del amplicón está ligada a su tamaño y al porcentaje de G y C. En algunos resultados pueden observarse curvas con diferente T_m a la esperada, ya que la formación de dímeros y la muestra de DNA pueden interactuar con el SYBR Green. Esto generalmente no supone un mayor problema, siempre y cuando se defina el rango de la T_m a la que se presenta la disociación del amplicón.

Protocolo

Antes de iniciar con la reacción se preparó un Mix de DNA positivo de los cuatro patógenos, tomando 10 μ L de DNA de cada patógeno y colocándolo en 1 microtubo de 1.5 mL. Para realizar la mezcla de reacción se prepararon los reactivos del Kit LightCycler Fast Start DNA Master SYBRGreen I. Se preparó la mezcla de reacción, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 6. Mezcla de reacción para detección simultanea de los patógenos de interés.

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 10.5x
Vial 1 b (Mix PCR con enzima)	10 X	2X	4 μ L	42 μ L
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	2 μ L	21 μ L
H ₂ O	---	---	11.4 μ L	120 μ L
Oligo 634 F	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	2.1 μ L
Oligo 770 R	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	2.1 μ L
Oligo INVA 291	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	2.1 μ L
Oligo INVA 176	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	2.1 μ L
Oligo UidAF241	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	2.1 μ L
Oligo UidAR383	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	2.1 μ L
Oligo IpaHFW	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	2.1 μ L
Oligo IpaHRW	10 μ M	0.10 μ M	0.2 μ L	2.1 μ L
Vol. final	---	---	19 μ L	199.5 μ L

- Preparada la mezcla de reacción, se tomaron 19 μL de la mezcla y se adicionaron a los capilares para LightCycler.
- Posterior, se colocó en cuatro capilares 1 μL del Mix DNA (el cual contenía el DNA de los cuatro patógenos)
- En tres capilares se colocó 1 μL de agua grado biología molecular, los cuales serán tomados como control negativo
- En un capilar se colocó 1 μL de DNA de *E. coli*
- En un capilar se colocó 1 μL de DNA de *Salmonella* spp.
- En un capilar se colocó 1 μL de DNA de *Shigella* spp.
- En un capilar se colocó 1 μL de DNA de *Listeria monocytogenes*
- Posteriormente se taparon los capilares para después centrifugar a 3,000 rpm durante 10 segundos.

El programa utilizado fue el siguiente:

Tabla 7. Programa para reacción de PCR LightCycler.

Modo Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo de incubación	Modo Adquisición
Pre incubación					
Ninguno	1		95°C	5 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	40	Desnaturalización	95°C	10 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	10 s	Ninguno
		Extensión	72°C	20 s	Solo
Melting Curve					
Melting Curve	1	Desnaturalización	95°C	0 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	15 s	Ninguno
		Melting	95°C Rango de rampeo= 0.1°C/sec	0 s	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1		40°C	30 s	Ninguno

Las temperaturas melting esperadas para cada gen de interés fueron las siguientes;

Tabla 8. Rango teórico de temperaturas para curvas melting de los diferentes genes

GEN	RANGO	GEN	RANGO	GEN	RANGO	GEN	RANGO
UidA	85.5°C ± 1°C	hlyA	80.1°C ± 1°C	ipaH	88.0°C ± 1°C	invA	83.1°C ± 1°C

Se realizaron dos pruebas más de PCR multiplex para detección simultánea de los microorganismos, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios y debido a la inespecificidad de los oligonucleótidos se decidió retirar los oligonucleótidos ipaHFW e ipaHRw y se probó la detección de *E. coli* –*Shigella* spp, utilizando el gen *uidA*.

7.2.6.3. Reacción de PCR para la detección *E. coli* y *Shigella* spp, utilizando el gen *uidA* y verificación de funcionalidad de los oligonucleótidos ipaHFW e ipaHRw

Se realizaron dos mezclas de reacción, de acuerdo a las siguientes tablas

Tabla 9. Mix 1. Mezcla de reacción para la detección de *E. coli*.

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 17x
Vial 1 b (Mix PCR con enzima)	10 X	2X	4 µL	68 µL
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	2 µL	34 µL
H ₂ O	---	---	12.6 µL	214.2 µL
Oligo UidAF241	10 µM	0.10 µM	0.2 µL	3.4 µL
Oligo UidAR383	10 µM	0.10 µM	0.2 µL	3.4 µL
Vol. final	---	---	19 uL	323 µL

Tabla 10. Mix .2 Mezcla de reacción para la detección de *Shigella spp.*

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 7.5x
Vial 1 b (Mix PCR con enzima)	10 X	2X	4 µL	68 µL
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	2 µL	34 µL
H ₂ O	---	---	12.6 µL	214.2 µL
Oligo IpaHFW	10 µM	0.10 µM	0.2 µL	3.4 µL
Oligo IpaHRW	10 µM	0.10 µM	0.2 µL	3.4 µL
Vol. final	---	---	19 uL	323 µL

- Preparada la mezcla de reacción, se tomaron 19 µL de la mezcla y se adicionaron a los capilares correspondientes, colocándose 1 µL de DNA molde, de acuerdo a la siguiente tabla;

Tabla 11. Orden de las muestras.

Capilar	Mezcla de reacción	Muestra
1	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O157:H7
2	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O45:H10
3	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O111:H8
4	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O121:H19
5	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O55
6	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O113:H4
7	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O26:H11
8	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O145:H45
9	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O103:H2
10	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O157:H7 35150
11	Mix1	DNA <i>Shigella flexneri</i> 2 ^a
12	Mix1	DNA <i>Shigella sonnei</i>
13	Mix1	DNA <i>Shigella dysenteriae</i>
14	Mix1	DNA <i>Shigella boydii</i>

15	Mix1	AGUA GRADO PCR
16	Mix1	AGUA GRADO PCR
17	Mix2	DNA <i>E. coli</i> O157:H7
18	Mix2	DNA <i>E. coli</i> O45:H10
19	Mix2	DNA <i>E. coli</i> O111:H8
20	Mix2	DNA <i>E. coli</i> O121:H19
21	Mix2	DNA <i>E. coli</i> O55
22	Mix2	DNA <i>E. coli</i> O113:H4
23	Mix2	DNA <i>E. coli</i> O26:H11
24	Mix2	DNA <i>E. coli</i> O145:H45
25	Mix2	DNA <i>E. coli</i> O103:H2
26	Mix2	DNA <i>E. coli</i> O157:H7 35150
27	Mix2	DNA <i>Shigella flexneri</i> 2 ^a
28	Mix2	DNA <i>Shigella sonnei</i>
29	Mix2	DNA <i>Shigella dysenteriae</i>
30	Mix2	DNA <i>Shigella boydii</i>
31	Mix2	AGUA GRADO PCR
32	Mix2	AGUA GRADO PCR

A continuación, se centrifugaron los capilares a 3,000 rpm durante 10 segundos, y posteriormente se programó el termociclador. El programa utilizado fue el siguiente:

Tabla 12. Programa para reacción de PCR LightCycler.

Modo Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo de incubación	Modo Adquisición
Pre incubación					
Ninguno	1		95°C	5 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	40	Desnaturalización	95°C	10 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	10 s	Ninguno
		Extensión	72°C	20 s	Solo
Melting Curve					
Melting Curve	1	Desnaturalización	95°C	0 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	15 s	Ninguno
		Melting	95°C Rango de rampeo= 0.1°C/sec	0 s	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1		40°C	30 s	Ninguno

Se realizó un análisis de detección cualitativa en el termociclador.

7.2.6.4. PCR Multiplex para la detección de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *E. coli-Shigella* y PCR para discriminación de *Shigella*, con Kit ROCHE y con tres pares de oligonucleótidos.

Mezcla de reacción

Se realizó la mezcla de reacción de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 13. Mezcla de reacción para detección simultánea de los patógenos de interés.

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 12.5x
Vial 1 b (Mix PCR con enzima)	10 X	1X	1 µL	12.5 µL
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	1 µL	12.5 µL
H ₂ O	---	---	6.1 µL	76.25 µL
Oligo 634 F	10 µM	0.15 µM	0.15 µL	1.88 µL
Oligo 770 R	10 µM	0.15 µM	0.15 µL	1.88 µL
Oligo INVA 291	10 µM	0.15 µM	0.15 µL	1.88 µL
Oligo INVA 176	10 µM	0.15 µM	0.15 µL	1.88 µL
Oligo UidAF241	10 µM	0.15 µM	0.15 µL	1.88 µL
Oligo UidAR383	10 µM	0.15 µM	0.15 µL	1.88 µL
Vol. final	---	---	9 µL	94.5 µL

Preparada la mezcla de reacción, se tomaron 9 µL de la mezcla y se adicionaron a los capilares correspondientes, añadiendo 1 µL de DNA molde, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 14. Orden de las muestras.

Capilar	Mezcla de reacción	Muestra	Concentración de DNA en la muestra ng/µL	Concentración de DNA original ng/µL
1	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O157:H7	1.103	11.03
2	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O157:H7	1.103	11.03
3	Mix1	DNA <i>Shigella flexneri</i>	0.36	3.6
4	Mix1	DNA <i>Shigella flexneri</i>	0.36	3.6
5	Mix1	DNA <i>Salmonella</i> spp.	1.01	10.1
6	Mix1	DNA <i>Salmonella</i> spp.	1.01	10.1
7	Mix1	DNA <i>L. monocytogenes</i>	1.25	12.5
8	Mix1	DNA <i>L. monocytogenes</i>	1.25	12.5
9	Mix1	Mezcla de DNA	Alrededor de 1	Alrededor de 10

10	Mix 1	Mezcla de DNA	Alrededor de 1	Alrededor de 10
11	Mix1	Agua PCR THERMO	NO APLICA	NO APLICA
12	Mix1	Agua PCR THERMO	NO APLICA	NO APLICA

Colocada la mezcla de reacción y el DNA molde, se colecciona el contenido en el fondo del capilar, centrifugando los capilares a 3,000 rpm durante 10 seg.

Protocolo para reacciones de PCR para la discriminación de *Shigella* y *E. coli*

Tabla 15. Mezcla de reacción para la detección de *Shigella*

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 12.5x
Vial 1 b (Mix PCR con enzima)	10 X	1X	1 µL	12.5 µL
MgCl ₂	25 Mm	2.5 Mm	1 µL	12.5 µL
H ₂ O	---	---	6.7 µL	83.8 µL
Oligo ipa3	10 µM	0.15 µM	0.15 µL	1.88 µL
Oligo ipa4	10 µM	0.15 µM	0.15 µL	1.88 µL
Vol. final	---	---	9µL	112.5 µL

Preparada la mezcla de reacción, se tomaron 9 µL de la mezcla y se adicionaron a los capilares correspondientes, añadiendo 1 µL de DNA molde, de acuerdo a la siguiente tabla;

Tabla 16. Orden de las muestras de las muestras preparadas con Maxima SYBR

Capilar	Mezcla de reacción	Muestra	Concentración de DNA en la muestra ng/µL	Concentración de DNA original ng/µL
13	Mix2	<i>Shigella flexneri</i>	0.36	3.6
14	Mix2	<i>Shigella flexneri</i>	0.36	3.6
15	Mix2	<i>Shigella boydii</i>	5.92	59.2
16	Mix2	<i>Shigella boydii</i>	5.92	59.2
17	Mix2	<i>Shigella dysenteriae</i>	6.59	65.9
18	Mix2	<i>Shigella dysenteriae</i>	6.59	65.9

19	Mix2	<i>Shigella sonnei</i>	0.38	3.8
20	Mix2	<i>Shigella sonnei</i>	0.38	3.8
21	Mix2	<i>E. coli</i> O157:H7	1.103	11.03
22	Mix2	<i>E. coli</i> O157:H7	1.103	11.03
23	Mix2	Agua PCR	NO APLICA	NO APLICA
24	Mix2	Agua PCR	NO APLICA	NO APLICA

Colocada la mezcla de reacción y el DNA molde se centrifugaron los capilares a 3,000 rpm durante 10 seg. y posteriormente se programó el termociclador, en la forma que se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 17. Programa para reacción de PCR LightCycler.

Modo Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo de incubación	Modo Adquisición
Pre incubación					
Ninguno	1		95°C	5 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	40	Desnaturalización	95°C	10 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	15 s	Ninguno
		Extensión	72°C	20 s	Solo
Melting Curve					
Melting Curve	1	Desnaturalización	95°C	0 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	15 s	Ninguno
		Melting	95°C Rango de rampeo= 0.1°C/sec	0 s	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1		40°C	30 s	Ninguno

A continuación, se procedió a colocar los capilares en su respectivo pozo, de acuerdo al orden descrito y se realizó el análisis de las curvas melting.

7.2.6.5. PCR multiplex para la detección de cuatro patógenos, utilizando tres pares de oligonucleótidos y optimización de reactivos

En este caso, se utilizó una concentración de oligonucleótidos de 0.15 μM y un volumen de reacción de 10 μL , con la finalidad de optimizar el reactivo de PCR.

Protocolo

Se realizó la mezcla de reacción de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 18. Mezcla de reacción para detección simultanea de los patógenos de interés.

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 10.5x
Vial 1 b (Mix PCR con enzima)	10 X	1X	1 μL	10.5 μL
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	1 μL	10.5 μL
H ₂ O	---	---	6.1 μL	64.05 μL
Oligo 634 F	10 μM	0.15 μM	0.15 μL	1.58 μL
Oligo 770 R	10 μM	0.15 μM	0.15 μL	1.58 μL
Oligo INVA 291	10 μM	0.15 μM	0.15 μL	1.58 μL
Oligo INVA 176	10 μM	0.15 μM	0.15 μL	1.58 μL
Oligo UidAF241	10 μM	0.15 μM	0.15 μL	1.58 μL
Oligo UidAR383	10 μM	0.15 μM	0.15 μL	1.58 μL
Vol. final	---	---	9 μL	94.5 μL

Preparada la mezcla de reacción, se tomaron 9 μL de la mezcla y se adicionaron a los capilares correspondientes, añadiéndose 1 μL de DNA molde, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 19. Orden de las muestras.

Capilar	Mezcla de reacción	Muestra
1	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O157:H7
2	Mix1	DNA <i>E. coli</i> O157:H7
3	Mix1	DNA <i>Salmonella</i> Typhimurium
4	Mix1	DNA <i>Salmonella</i> Typhimurium
5	Mix1	DNA <i>Shigella flexneri</i> 2 ^a
6	Mix1	DNA <i>Shigella flexneri</i> 2 ^a
7	Mix1	DNA <i>Listeria monocytogenes</i>
8	Mix1	DNA <i>Listeria monocytogenes</i>
9	Mix1	Agua grado PCR, Control negativo
10	Mix1	Agua grado PCR, Control negativo

Colocada la mezcla de reacción y el DNA molde se centrifugaron los capilares a 3,000 rpm durante 10 seg. y posteriormente se programó el termociclador, en la forma que se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 20. Programa para reacción de PCR LightCycler.

Modo Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo de incubación	Modo Adquisición
Pre incubación					
Ninguno	1		95°C	5 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	35	Desnaturalización	95°C	10 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	10 s	Ninguno
		Extensión	72°C	15 s	Solo
Melting Curve					
Melting Curve	1	Desnaturalización	95°C	0 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	10 s	Ninguno
		Melting	95°C Rango de rampeo= 0.1°C/sec	0 s	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1		40°C	30 s	Ninguno

Se realizó una reducción de ciclos para optimizar los tiempos de detección

7.2.6.6. Discriminación de *Shigella* spp. de *E. coli*

En este punto, se realizaron reacciones de PCR utilizando diferentes genes para verificar su idoneidad. Como control negativo se utilizó DNA de *Salmonella*.

Protocolo

De acuerdo a la siguiente tabla se realizaron tres mezclas de reacción, utilizando los oligonucleótidos para la detección de los genes *ipaH*, *Stx1* y *Stx*;

Tabla 15. Mezcla de reacción para detección simultanea de los patógenos de interés.

Reactivo	Concentración del stock	Concentración de trabajo	Volumen para 1X	Volumen para 6.5x
Vial 1 b (Mix PCR con enzima)	10 X	1X	1 µL	6.5 µL
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	1 µL	6.5 µL
H ₂ O	---	---	6.6 µL	42.9 µL
Oligo 634 F	10 µM	0.2 µM	0.2 µL	1.3 µL
Oligo 770 R	10 µM	0.2 µM	0.2 µL	1.3 µL
Vol. final	---	---	9 µL	58.5 µL

El programa utilizado para que las reacciones se llevaran a cabo fue el siguiente:

Tabla 21. Programa para reacción de PCR LightCycler.

Modo Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo de incubación	Modo Adquisición
Pre incubación					
Ninguno	1		95°C	5 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	35	Desnaturalización	95°C	10 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	10 s	Ninguno
		Extensión	72°C	15 s	Solo
Melting Curve					
Melting Curve	1	Desnaturalización	95°C	0 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	10 s	Ninguno
		Melting	95°C Rango de rampeo= 0.1°C/sec	0 s	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1		40°C	30 s	Ninguno

7.2.6.7. Ajuste de reacciones de PCR en formato multiplex para la detección simultanea de *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria*.

En esta prueba se realizaron modificaciones en las concentraciones de oligonucleótidos, con la finalidad de que el método fuese capaz de poder detectar a los tres patógenos en una sola reacción.

Las concentraciones de oligonucleótidos utilizadas fueron las siguientes;

Tabla 22. Se aprecian las modificaciones realizadas en la concentración de oligonucleótidos

Oligonucleótido	MODIFICACIONES EN LAS CONCENTRACIONES						
	1	2	3	4	5	6	7
634 F	0.1 µM	0.05 µM	0.07 µM	0.07 µM	0.07 µM	0.08 µM	0.07 µM
770 R	0.1 µM	0.1 µM	0.1 µM	0.07 µM	0.1 µM	0.08 µM	0.07 µM
INVA 291	0.15 µM	0.1 µM	0.8 µM	0.08 µM	0.08 µM	0.1 µM	0.09 µM
INVA 176	0.15 µM	0.1 µM	0.8 µM	0.08 µM	0.08 µM	0.1 µM	0.09 µM
UidAF241	0.05 µM	0.1 µM	0.1 µM	0.07 µM	0.08 µM	0.06 µM	0.05 µM
UidAR383	0.05 µM	0.05 µM	0.07 µM	0.07 µM	0.06 µM	0.06 µM	0.05 µM

Las modificaciones fueron realizadas de acuerdo a la formación de dímeros sugerida teóricamente para los oligonucleótidos. Para realizar las reacciones de PCR se utilizó una mezcla de DNA de *E. coli O157:H7*, *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*, con a una concentración de cada uno de alrededor de 1 ng/μL. Debido a la posibilidad de existencia de dímeros en la reacción, se realizaron modificaciones al programa hasta obtener resultados estables.

7.2.7. Validación del método

Posterior a la estandarización se procedió a realizar la validación del método, donde se midieron los siguientes parámetros;

- Sensibilidad
- Especificidad
- Repetitividad
- Reproducibilidad
- Límite de detección
- Probabilidad de verdaderos positivos
- Probabilidad de verdaderos negativos
- Tasa de falsos positivos
- Tasa de falsos negativos
- Eficiencia

Para la validación, se utilizó el formato multiplex PCR, de los DNA's obtenidos se realizó una cuantificación en un espectrofotómetro, las concentraciones obtenidas por patógeno fueron las siguientes:

- *E. coli O157:H7*; 107.30 ng/μL
- *Salmonella spp.*; 123.42 ng/μL
- *Listeria monocytogenes*; 110.21 ng/μL

De los DNA's en mención se realizó un ajuste para obtener en los tres casos una concentración de 100 ng/μL, posteriormente se realizó una mezcla de DNA's de los tres patógenos, obteniendo una concentración por patógeno 33.33 ng/μL, obteniendo en la

mezcla de DNA's una concentración de DNA final de alrededor de 100 ng/μL, ya que la literatura recomienda utilizar menos de 100 ng/μL en la muestra (Leotta, *et. al.*, 2005, Sachse, *et. al.*, 1999). Posteriormente se realizaron diluciones de la mezcla de DNA's, obteniendo las siguientes concentraciones por patógeno; 0.83 ng/μL, 8.33 ng/μL y 16.66 ng/μL.

Para el análisis se tomaron los resultados por separado, midiendo todos los parámetros para cada patógeno (*E. coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria*). Se realizaron un total de 58 reacciones de PCR en formato multiplex para la validación. Las mezclas de reacción se realizaron de acuerdo a la siguiente tabla;

Tabla 23. Tabla de concentraciones de reactivos utilizadas en las reacciones de PCR para validación de métodos.

Reactivo	Concentración de la alicuota	Concentración de trabajo	Volumen para 1X
Vial 1 b (Mix PCR con enzima)	10 X	1X	1 μL
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	1 μL
H ₂ O	---	---	2.8 μL
Oligo 634 F	1 μM	0.07 μM	0.7 μL
Oligo 770 R	1 μM	0.07 μM	0.7 μL
Oligo INVA 291	1 μM	0.09 μM	0.9 μL
Oligo INVA 176	1 μM	0.09 μM	0.9 μL
Oligo UidAF241	1 μM	0.05 μM	0.5 μL
Oligo UidAR383	1 μM	0.05 μM	0.5 μL
DNA molde	---	---	1 μL
Vol. final	---	---	10 μL

El programa utilizado para realizar la validación del método fue el siguiente;

Tabla 24. Programa de reacción de PCR utilizado en la validación del método.

Modo Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo de incubación	Modo Adquisición
Pre incubación					
Ninguno	1		95°C	5 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	34	Desnaturalización	95°C	10 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	10 s	Ninguno
		Extensión (*)	72°C	10 s	Solo
Melting Curve					
Melting Curve	1	Desnaturalización	95°C	0 s	Ninguno
		Alineamiento	70°C	10 s	Ninguno
		Melting	95°C Rango de rampeo= 0.1°C/sec	0 s	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1		40°C	30 s	Ninguno

Realizadas las reacciones de PCR, se procedió a determinar los parámetros de validación, aunque antes de iniciar con la determinación de dichos parámetros, se debe tomar en cuenta una matriz de contingencia, tal y como se describe en la siguiente tabla:

Tabla 25. Matriz de contingencia (AENOR, ISO 16140:2003)

Resultado de la prueba	Valor de la Característica		
	Presente	Ausente	
Positivo	VP	FN	C= VP+FN
Negativo	FP	VN	D= FP+VN
TOTAL	A= VP+FP	B= FN+VN	E= VP+FN+FP+VN

Donde;

VP: Verdaderos Positivos

FN: Falsos Negativos

FP: Falsos Positivos

VN: Verdaderos Negativos

A: Es la suma de muestras verdaderas positivas y muestras falsas positivos, es decir, total de muestras obtenidas como positivo.

B: Es la suma de muestras falsas negativo y muestras verdaderas negativas, es decir, total de muestras obtenidas como negativas.

C: Es la suma de muestras verdaderas positivas y muestras falsas negativas, es decir, total de muestras que en teoría eran positivas.

D: Es la suma de muestras falsas positivas y muestras verdaderas negativas, es decir, total de muestras que en teoría eran negativas.

E: Es el total de datos o repeticiones realizadas.

7.2.7.1. Sensibilidad

La sensibilidad se define como la capacidad de un método para detectar el microorganismo de interés, cuando éste está presente en al menos el 95% de las repeticiones. El cálculo se realiza de acuerdo a la siguiente formula (Sánchez *et al.*, 2011):

$$\text{Sensibilidad \%} = \left(\frac{VP}{VP + FN} \right) (100)$$

Donde;

VP= Verdaderos Positivos

FN= Falsos Negativos

7.2.7.2. Especificidad

La especificidad es la capacidad de un método de no detectar el microorganismo de interés, si éste no está presente en un 95% del total de muestras verdaderamente negativas. Este parámetro se determinó de acuerdo a la siguiente formula (Sánchez *et al.*, 2011):

$$\text{Especificidad} = \left(\frac{VN}{VN + FP} \right) (100)$$

Donde;

FP= Falsos Positivos

VN= Verdaderos Negativos

7.2.7.3. Límite de detección

Demostrar que el método es capaz de recuperar al menos una cantidad mínima (Ejemplo, 1 ng/μL de DNA) (Sánchez, *et. al.*, 2011). Este parámetro se midió mediante el uso de una mínima concentración de DNA en la muestra, la cual fue de 0.83 ng/μL.

7.2.7.4. Selectividad

Capacidad de un método para detectar el microorganismo diana a partir de un amplio rango de cepas y es capaz de reflejar la diversidad genética y/o serológica del microorganismo diana que el método puede detectar, así como no detectar a los microorganismos no diana, es decir aquellos que pueden presentar reacciones cruzadas con el microorganismo diana. (Sánchez, *et. al.*, 2011)).

Para medir este parámetro, se utilizó la siguiente formula:

$$Selectividad = \left(\frac{VN}{VN + FP} \right) (100)$$

Donde;

FP= Falsos Positivos

VN= Verdaderos Negativos

Se utilizó un total de 25 cepas para la determinación de selectividad, cabe mencionar que, por la dificultad para adquirir estas, faltó una gama más amplia de cepas para determinar con mayor confiabilidad este parámetro.

7.2.7.5. Repetitividad

La repetitividad es la precisión de medida bajo un conjunto de condiciones repetidas. Este conjunto de condiciones incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como las mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo (Sánchez, *et. al.*, 2011).

La medición de este parámetro se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Repetitividad} = \left(\frac{VP + VN}{E} \right) (100)$$

Cabe mencionar que, de acuerdo a la tabla de contingencias, E= VP+FN+FP+VN

Donde;

VP= Verdaderos positivos

VN= Verdaderos negativos

FN= Falsos negativos

FP= Falsos positivos

7.2.7.6. Reproducibilidad

La reproducibilidad es la precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad. Este conjunto de condiciones incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares. Los diferentes sistemas de medición pueden utilizar diferentes procedimientos de medida. En la práctica conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que varían y las que no (Sánchez, *et. al.*, 2011).

Para la medición de este parámetro se determinó la repetitividad de cada operario y la fórmula utilizada para determinarlo fue la siguiente:

Reproducibilidad= Repetitividad operario 1 – Repetitividad del operario 2

El resultado de esta operación debe ser positivo.

7.2.7.7. Probabilidad de resultado positivo (PVP)

Este parámetro refleja la probabilidad de que el microorganismo de interés esté presente en la muestra cuando la prueba resultó positiva. Este se calculó de la siguiente manera (Camaró et al., 2013):

$$PVP = \left(\frac{VP}{VP + FP} \right) (100)$$

Donde;

PVP= Probabilidad de resultados positivos

VP= Verdaderos positivos

FP= Falsos Positivos

7.2.7.8. Probabilidad de resultado negativo (PVN)

Este parámetro es la probabilidad de que el microorganismo de interés esté ausente en la muestra cuando la prueba resultó negativa; se calculó de la siguiente manera (Camaró et al., 2013):

$$PVN = \frac{VN}{VN + FN} (100)$$

Donde;

PVN: Probabilidad de resultados negativos

FN: Falsos Negativos

VN: Verdaderos Negativos

7.2.7.9. Tasa de Falsos Positivos

La tasa de falsos positivos es la probabilidad o frecuencia con que la muestra sea asignada como positiva cuando en realidad es negativa. La fórmula para determinarla fue la siguiente (Camaró et al., 2013):

$$TFP = \left(\frac{FP}{FP + VP} \right) (100)$$

Donde;

TFP= Tasa de falsos positivos

FP= Verdaderos Positivos

VP= Falsos Positivos

7.2.7.10. Tasa de Falsos negativos

Es la probabilidad o frecuencia con que una muestra conocida como positiva sea asignada como negativa por el método, y se calcula de la siguiente manera:

$$TFN = \left(\frac{FN}{FN + VN} \right) (100)$$

Donde;

FN= Falsos Negativos

VN= Verdaderos Negativos

Se pueden utilizar los resultados obtenidos en los parámetros anteriores para determinar este parámetro.

7.2.7.11. Eficiencia

La eficiencia del método se calculó de la siguiente manera:

$$E = \left(\frac{VP + VN}{N} \right) (100)$$

Donde;

E= Eficiencia

VP= Verdaderos Positivos

VN= Verdaderos Negativos

N= Número total de muestras analizadas

7.2.7.12. Selectividad

Para la medición de la selectividad, se procedió a realizar 26 reacciones de PCR, en las cuales se colocó DNA de 25 cepas y un control negativo con agua PCR. Las cepas utilizadas fueron las siguientes:

Tabla 26. Cepas utilizadas para la determinación de selectividad

Muestra	Muestra
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E. coli</i> O103:H2
<i>Shigella flexneri</i> 2 ^a	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Shigella sonnei</i>	<i>Salmonella Newport</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Salmonella Agona</i>
<i>Shigella boydii</i>	<i>Salmonella Saint-Paul</i>
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Salmonella Agona</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>E. coli</i> O111:H8	<i>Enterococos faecalis</i>
<i>E. coli</i> O121:H19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>E. coli</i> O55	<i>Sthaphylococcus epidermidis</i>
<i>E. coli</i> O113:H4	<i>Sthaphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i> O26:H11	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>E. coli</i> O145:H45	Agua PCR

7.2.7.13. Criterios de aceptación

Sensibilidad

Si la sensibilidad < 95% el método analítico no tiene buena sensibilidad.

Si la sensibilidad \geq 95% el método analítico tiene buena sensibilidad.

Especificidad

Si la especificidad < 95% el método analítico no tiene buena especificidad.

Si la especificidad \geq 95% el método analítico tiene buena especificidad.

Probabilidad de resultado positivo (PVP)

Si PVP < 95% el método analítico no tiene buena probabilidad de resultado positivo.

Si PVP ≥ 95% el método analítico tiene buena probabilidad de resultado positivo.

Probabilidad de resultado negativo (PVN)

Si PVN < 95% el método analítico no tiene buena probabilidad de resultado negativo.

Si PVN ≥ 95% el método analítico tiene buena probabilidad de resultado negativo.

Límite de detección: La cantidad mínima a detectar por el equipo.

Inclusividad: ≥ 95%

Exclusividad: ≥ 95%

Repetitividad: ≥ 95%

Reproducibilidad: ≤ 5% de diferencia entre Repetitividad de operarios

Selectividad: ≥ 95%

8. RESULTADOS

8.1. Determinación de propiedades fisicoquímicas de los oligonucleótidos seleccionados y determinación de su especificidad teórica.

Secuencias utilizadas:

- Secuencia de oligonucleótidos para *Salmonella* spp. (González-Escalona et al., 2009)
>InvA-176
5'-CAACGTTTCCTGCGGTACTGT-3'
>INvA-291-12
5'-CCCGAACGTGGCGATAATT-3'
- Secuencia de oligonucleótidos para *Escherichia coli* O157:H7 (Feng et al., 2011)
>UidAF241

5'-CAGTCTGGATCGCGAAAAGT-3'

>UidAR383

5'-ACCAGACGTTGCCACATAATT-3'

- Secuencia de oligonucleótidos para *Listeria monocytogenes* (Omiccioli et al., 2009)

>634F

5'-ACTTCGGCGCAATCAGTGA-3'

>770R

5'-TTGCAACTGCTCTTTAGTAACAGCTT-3'

- Secuencia de oligonucleótidos para la *Shigella* spp. (Comunicación personal Dr. Jesus Hernández Romano, Laboratorio-UPEMOR)

>ipaHFw

5'-GGAGAGTTCTGACTTTATCC-3'

>ipaHRv

5'-ACAGTATCATGAATCTGCAC-3'

Para realizar el análisis se utilizaron los paquetes computacionales siguientes:

- IDT Tools-Oligo Analyzer (<http://www.idtdna.com/site>)
- NCBI-Primer BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)
- Vector de Invitrogen (<http://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>)

El software de IDT Tools, se utilizó para determinar las propiedades fisicoquímicas de los oligonucleótidos, concretamente:

- Temperatura media de alineamiento
- Tamaño del cebador
- Secuencia complementaria
- Contenido de guaninas y citosinas

- Peso molecular
- Formación de homodímeros
- Formación de heterodímeros

El Software Primer BLAST, se utilizó para determinar lo siguiente;

- Especificidad teórica
- Tamaño del amplicón
- Gen al que pertenece la secuencia

Los resultados obtenidos de dicho análisis son los siguientes:

Oligonucleótidos para la detección de *Escherichia coli* O157:H7

Los oligonucleótidos empleados para esta especie están diseñados para amplificar parte del gen codificante para una enzima beta-D-glucuronidasa, utilizada para la detección de *Escherichia coli* genérica.

Secuencia

>Beta_d_glucoronidasa_CP008805.1_ *Escherichia coli* O157:H7

```
TGTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTGTGGCATTAGTCTGGATCGCGAAAAC
GTGGAATTGAGCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTTAACGATCAGT
TCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGTGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAGGTTGGGCAGGCC
AGCGTATCGTGCTGCGTTTTCGATGCGGTCACCTATTACGGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGG
GCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTATGTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGTATCACAGTTTGTGTGAACAA
CGAACTGAACTGGCAGACTATCCCGCCGGGAATGGTATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAGTCTTACTTCCATGA
TTTTTTAACTACGCCGGGATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACGCCGAACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGT
GACGCATGTCGCGCAAGACTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGTATGTCAGCGTTGAACTGC
GTGATGCGGATCAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGGGGCACCAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCACCTCTGG
CAACCGGGTGAAGTTATCTCTATGAACTGTACGTACAGCCAAAAGCCGGACAGAGTGTGATATCTACCCGCTGCGCGTC
GGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAGTTCCTGATCAACCACAAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGCCGTCAT
GAAGATGCGGATTTGCGCGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGATCACGCATTAATGGACTGGATTGGGGCC
AACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTGAT
GAAACTGCAGCTGTGCGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAGAACTGTACAGCGAA
GAGGCAGTCAACGGGAAACTCAGCAGGCGCACTTACAGGCGATTAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAAAACCACCCAAG
CGTGGTGTATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCCGCAAGGTGCACGGGAATATTTGCGGCCACTGGCGGAAG
CAACGCGTAAACTCGATCCGACGCGTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCG
ATCTCTTTGATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGTTGGTATGTCCAAAGCGGCGATTTGGAAACGGCAGAGAAGGTACT
GGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGATTATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGG
GCTGCACTCAATGTACACCGACATGTGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCGC
```

GTCAGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTTGCGCGATTTTGCACCTCGCAAGGCATATTGCGCGTTGGCGGTAAC
 AAGAAGGGGATCTTCACCCGCGACCGCAAACCGAAGTCGGCGGCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTC
 GGTGAAAAACCGCAGCAGGGAGGCAAACAATGA

Tabla 27. Propiedades del par de oligonucleótidos para *Escherichia coli*

UidA F241		UidA R383	
Secuencia	5'- CAG TCT GGA TCG CGA AAA CTG -3'	Secuencia	5'- ACC AGA CGT TGC CCA CAT AAT T -3'
Complemento	5'- CAG TTT TCG CGA TCC AGA CTG -3'	Complemento	5'- AAT TAT GTG GGC AAC GTC TGG T -3'
Tamaño	21	Tamaño	22
Contenido de GC	52.4 %	Contenido de GC	45.5 %
Temperatura media	63 °C	Temperatura media	65.9 °C
Peso molecular	6455.2 g/mol	Peso molecular	6663.4 g/mol
<p>Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica.</p> <p>Homodímeros: Formación de un homodímero considerado de importancia para la técnica, el cual tiene un $\Delta G = -13.51$ Kcal/mol</p>		<p>Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica.</p> <p>Homodímeros: Sin formación de homodímeros de importancia</p>	

Tamaño del amplicón = 143 pb

ACCAGACGTTGCCACATAATTACGAATATCTGCATCGGCCGAAGCTGATCGTTAAACTGC
CTGGCACAGCAATTGCCCGGCTTTCTTGTAAACGCGCTTTCCACCAACGCTGCTCAATT
CCACAGTTTTTCGCGATCCAGACTG

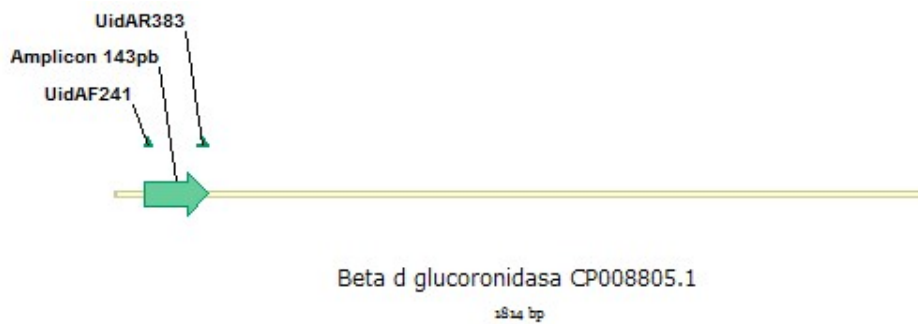


Figura 5. Gen Beta-d-glucoronidasa. La imagen representa el gen completo y se observa en que parte se alinean los oligonucleótidos, la flecha verde muestra el producto de PCR.

Oligonucleótidos para la detección de *Salmonella* spp.

En este caso, los oligonucleótidos amplifican parte del gen *invA*, que codifica una proteína asociada al sistema de secreción tipo III

Secuencia

>invA_CP009565.1|*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Newport*

GTGCTGCTTTCTCTACTTAACAGTGCTCGTTTACGACCTGAATTACTGATTCTGGTACTAATGGTGATGATCATTCTATGTTTC
GTCATTCCATTACCTACCTATCTGGTTGATTTCTGATCGCACTGAATATCGTACTGGCGATATTGGTGTTATGGGGTCGTT
CTACATTGACAGAATCCTCAGTTTTTCAACGTTTCTCGGGTACTGTTAATTACCACGCTCTTTTCGTCTGGCATTATCGATCA
GTACCAGTCGTCTTATCTTGATTGAAGCCGATGCCGGTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAATTCGTTATTGGCGATAGCCT
GGCGGTGGGTTTTGTTGCTTCTCTATTGTCACCGTGGTCCAGTTTATCGTTATTACCAAAGGTTCCAGAACGTGTCGCGGAA
GTCGCGGCCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGGTAACAGATGAGTATTGATGCCGATTTGAAGGCCGGTATTATTGATG
CGGATGCTGCGCGCAACGGCGAAGCGTACTGGAAAGGGAAAGCCAGCTTTACGGTTCCTTTGACGGTGCGATGAAGTTT
ATCAAAGGTGACGCTATTGCCGGCATCATTATTATCTTTGTGAACCTTATTGGCGGTATTTCCGGTGGGGATGACCCGCCATG
GTATGGATTTGTCCTCCGCCCTGTCTACTTATACCATGCTGACCATTGGTGATGGTCTTGTGCGCCAGATCCCCGCATTGTT
GATTGCGATTAGTGCCGGTTTTATCGTGACTCGCGTAAATGGCGATAGCGATAATATGGGGCGGAATATCATGACGCGACT
GTTGAACAACCCATTTGATTGGTTGTTACGGCTATTTGACCATTTCAATGGGAAGCTGCGGGGATTCCCCTGCCGGTTT
TTGTTATTTTATCGGTGGTTTTAAGCGTACTCTTCTATTTTAAATTCGTTGAAGCAAACGTAAGTCCGCAAAACCTAAAACCA
GCAAAGGCGAGCAGCCGCTCAGTATTGAGGAAAAAGAGGGTCTGCTGTTAGGACTGATTGGCGATCTCGATAAAGTCTCTA
CAGAGACCGTACCGTTGATATTACTTGTGCCGAAGAGCCGGCGTGAAGATCTGAAAAAGCTCAACTTGCGGAGCGTCTAC
GTAGTCAGTTCTTTATTGATTATGGCGTGCGCTGCCGGAAGTATTGTTACGCGATGGCGAGGGCCCTGGACGATAACAGCA
TCGTATTGTTGATTAATGAGATCCGTGTTGAACAATTTACGGTCTATTTGATTGATGCGAGTGGTAAATTATCCGATGAAG

TTGTTTCCTTTGGCATTAAATCCAACAATCTATCAGCAAGGTAGCAGCCAGTATTTCTGGGTAACGCATGAAGAGGGGGAGAA
 ACTCCGGGAGCTTGGCTATGTGTTGCGGAACGCGCTTGATGAGCTTTACCACTGTCTGGCGGTGACGCTGGCGCGCAACG
 TCAATGAATATTTTCGGTATTTCAGGAAACAAAACATATGCTGGACCAACTGGAAGCGAAATTTCTGATTTACTTAAAGAAGTG
 CTCAGACATGCCACGGTACAACGTATATCTGAAGTTTTGCAGCGTTTGTTAAGCGAACGTGTTTCCGTGCGTAATATGAAATT
 AATTATGGAAGCGCTCGCATTGTGGGCGCCAAGAGAAAAAGATGTCATTAACCTTGTGGAGCATATTCGTGGGGCAATGGC
 GCGTTATATTTGCCATAAATTCGCCAATGGCGGCGAATTACGAGCAGTAATGGTATCTGCTGAAGTTGAGGATGTTATTCCG
 AAAGGGATCCGTCAGACCTCTGGCAGTACCTTCTCAGCCTTGACCCGGAAGCCTCCGCTAATTTGATGGATCTCATTACAC
 TTAAGTTGGATGATTTATTGATTGCACATAAAGATCTTGTCTCCTTACGTCTGTCGATGTCCGTCGATTTATTAAGAAAATGA
 TTGAAGTTCGTTTTCCGGATCTGGAGTTTTATCTTTCGGTGAGATAGCAGATAGCAAGTCAGTGAATGTTATAAAAAACAATA
 TAA

Tabla 28. Propiedades del par de oligonucleótidos para la detección de *Salmonella* spp.

InvA 176		InvA 291-12	
Secuencia	5'- CAA CGT TTC CTG CGG TAC TGT -3'	Secuencia	5'- CCC GAA CGT GGC GAT AAT T -3'
Complemento	5'- ACA GTA CCG CAG GAA ACG TTG -3'	Complemento	5'- AAT TAT CGC CAC GTT CGG G -3'
Tamaño	21	Tamaño	19
Contenido de GC	52.4 %	Contenido de GC	52.6 %
Temperatura media	66 °C	Temperatura media	63.8 °C
Peso molecular	6388.2 g/mol	Peso molecular	5812.8 g/mol
Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica		Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica	
Homodímeros: Formación de un homodímero considerado de importancia para la técnica, el cual tiene un $\Delta G = -10.18$ Kcal/mol		Homodímeros: Sin formación de homodímeros de importancia	

Tamaño del amplicón = 116 pb

CAACGTTTCCTGCGGTAAGTGTAAATTACCACGCTCTTTCGTCTGGCATTATCGATCAGTA
 CCAGTCGTCTTATCTTGATTGAAGCCGATGCCGGTGAATTATCGCCACGTTCCGGG

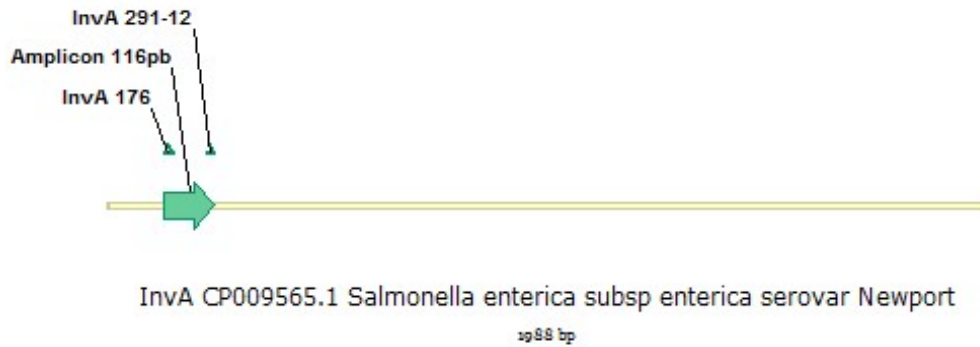


Figura 6. Gen *invA*. La imagen representa el gen completo y se observa en que parte se alinean los oligonucleótidos, la flecha verde muestra el producto de PCR.

Oligonucleótidos para la detección *Listeria monocytogenes*

El gen *hlyA* forma parte de un grupo de genes de virulencia de *Listeria monocytogenes*, responsables del parasitismo celular de la bacteria y que es considerado como precursor para la codificación de listeriolisina O.

Secuencia

>*hlyA_66285860*:*Listeria monocytogenes*

```

TTATTCGATTGGATTATCTACTTTACTATATTTTCGGATAAAGCGTGGTGTCCCGATGGAGATATTTCTATTTTTCACAAAG
TGGAAGTCCGGTCATCAATTACCGTTCTCCACCATTCCCAAGCTAAACCAGTGCATTCTTTAGCGTAAACATTAATATTTCT
CGCGTTACCTGGCAAATAGATGGACGATGTGAAATGAGCTAGCTTGCTTTTATTGTTTTCGCTCCAGTTTTTATGTTGAACAA
TTTCGTTACCTTCAGGATCATAATTTACTTCATCCCAAGAAATGTTGAATTGAGCAACGTATCCTCCAGAGTGATCGATGTTAA
TTTTCCATCTGTATAAGCTTTTGAAGTTGTTTCAATATATTCTGAGTTGTTTTAATAACAGCTAATTCATTGTCTTTTAGGAA
GTTTGTGTATAAGCAATGGGAACCTCGGTGTTTCTCGATTAAGAGTAGCGCCTTTTTTCAAATATCTCGTAAGTCTCCGA
GGTTGCCGTCGATGATTTGAACTTCATCTTTGCGGAACCTCCGTAATTACGGCTTTGAAGGAAGAATTTTTGATGATATTT
GTTAGTTCTACATCACCTGAGACAGATTTCCGCTTACGGCAGCATCAAAGCAGCTTTTACTTTAGTACTATGGGAATTAGT
TGATAATTTCAAATAAACTTGACGGCCATACGCCACACTTGAGATATATGCAGGAGGATTTTCTGCATTCACCTCAAGCGCTT
GCAACTGCTCTTTAGTAACAGCTTTGCCGAAAAATCTGGAAGGTCTGTAGGTTCAATTAACATTCACGTTATAGTAAATTTGTT
TAAACTAATGACTTCTTCTTGCAATTTCCCTTCACTGATTGCGCCGAAGTTTACATTCAAGCTATTATTTACAGCTTTAAATGC
TGTACCAAATTTTCGCAATTAATTGTGATTCACCTGTAAGCCATTTTCGTCATCATAATCAATTTTTGCACCTTACATTTGGATAGGC
TTGAGCATATTTTTCAATCCATCTTTCCACTAATGTATTTACTGCGTTGTTAACGTTTGATTTAGTGGCATTTTTTACAACGATT
TTATTGTCTTGATTAGTCATACCTGGCAAATCAATGCTGAGTGTTAATGAATCACGTTTTACAGGGAGAACATCTGGTTGATT
TCTACTAATTCGAATTCGCTTTTACGAGAGCACCTGGATAGGTTAGGCTCGAAATTCATTACAACTTGAATGTCTGCATT
ATTTTGATTGATGGATTTCTTCTTTTTCTCCACAACAATATATTCAATTTCCATCTTTGTAACCTTTTCTTGGCGGCACATTTGTC
ACTGCATCTCCGTGGTATACTAATACTGTTTTTATTGTAGTCCAATCCTTGTATATACTTATCGATTTTCATCCGCGTGTCTTCT
TTTCGATTGGCGTCTTAGGACTTGCAGGCGGAGATGCTGGTGGTGCCATGGATGAAATTTGAATTTCTTTATTGAATGCAGA
TGCATCCTTTGCTTCAGTTTGTGGCGCAATTGGTAGACTAACTAATAAAGTGAATAAAAACTAGCATTATTTTTTTCAT

```

Tabla 29. Propiedades del par de oligonucleótidos para la detección de *Listeria monocytogenes*

634F		770R	
Secuencia	5'- ACT TCG GCG CAA TCA GTG A -3'	Secuencia	5'- TTG CAA CTG CTC TTT AGT AAC AGC TT -3'
Complemento	5'- TCA CTG ATT GCG CCG AAG T -3'	Complemento	5'- AAG CTG TTA CTA AAG AGC AGT TGC AA -3'
Tamaño	19	Tamaño	26
Contenido de GC	52.6 %	Contenido de GC	38.5 %
Temperatura media	63 °C	Temperatura media	64.4 °C
Peso molecular	5812.8 g/mol	Peso molecular	7911.2 g/mol
Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica		Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica	
Homodímeros: Sin formación de homodímeros de importancia		Homodímeros: Formación de un homodímero considerado de importancia para la técnica, el cual tiene un $\Delta G = -10.94$ Kcal/mol	

Tamaño del amplicón = 137 pb

TTGCAACTGCTCTTTAGTAACAGCTTTGCCGAAAAATCTGGAAGGTCTTGTAGGTTTCATT
AACATTCACGTTATAGTAAATTTGTTTAAACTAATGACTTCTTCTTGCATTTCCCTTCAC
TGATTGCGCCGAAGT

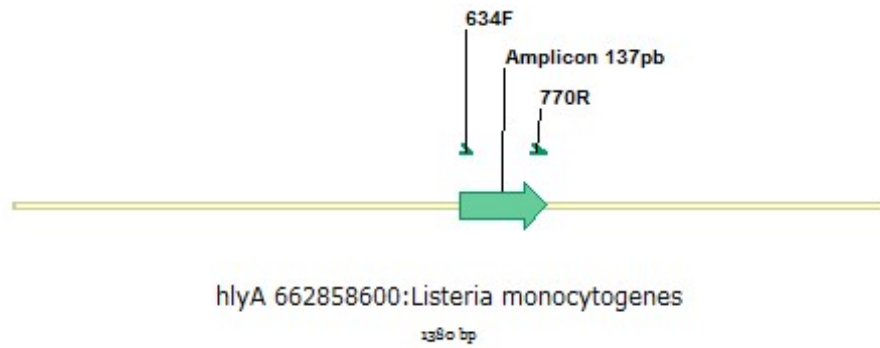


Figura 7. Gen *hlyA*. La imagen representa el gen completo y se observa en que parte se alinean los oligonucleótidos, la flecha verde muestra el producto de PCR.

Oligonucleótidos para la detección de *Shigella* spp.

Popularmente para la detección de *Shigella* spp. por PCR los investigadores se basan en el gen *ipaH*, gen relacionado al plásmido de invasión antígeno H, ya que todas las especies de *Shigella* contienen este gen.

Secuencia

>*ipaH*_CP004057.1|*Shigella*_flexneri

```

TTATGAATGGTGCAGTTGTGAGCCGTTTTTCAGACAATCGCAGGGCCAGTACCTCGTCAGTCAGCTGACGGTAAATCTGCTGT
TCAGTCTCAGGCATCACCTGTGCACCGGCTTCCCTCTCCGCATCCGCATCACCGCTCAGACCTGATGCTTTTCAGCCGGTCA
GCCACCCTCTGAGGGTACTCATTCTCCAGCATCTCATACTTCTGCTCTTCTGCCTGCGCCCAGCGGTCAGCTTCCGTACGCT
TCAGTACAGCATGCCATGGTCCCCAGAGGGAGAACCAGTCCGTAATTCATTCTCTTCACGGCTTCTGACCATGGCTTCGG
CAGTGCGGAGGTCATTTGCTGTCACTCCCGACACGCCATAGAAACGCATTTCTTCACGGCAGTGGAGAGCTGAAGTTTCT
CTGCGAGCATGGTCTGGAAGGCCAGGTAGACTTCTATCTCATCCACAAAATGGAGAGTTCTGACTTTATCCCGGGCAATGTC
CTCCAGAATTTTCGAGGCGGAACATTTCCCTGCCAGGGAGAGCAGAGCGCCGGTATCATTATCGAAAAGGCCCTTCTGATGC
CTGATGGACCAGGAGGGTTTTCCGGAGATTGTTCCATGTGAGCGCGACACGGTCTCACAGCTCTCAGTGGCATCAGCAGC
AACAGCGAAAGACTGCTGTGGAAGCTCCGCAGAGGCACTGAGTTTTTCCAGCCATGCAGCGACCTGTTACGGAATCCGGA
GGTATTGCGTGCAGAGACGGTATCGGAAAGCGGTCAAGGAACGCGGAAAAGGTGTTGGCATGCTCTTCATGTTCAAAGC
ATGCCATATCTGTGATACATCAGATTGTTTGTTCGGGAACCATGCTGTACGGCATCAGCCAGGGGGCGATGGAGTGTA
TTCTGTTGTCCGTCACTCATGGAGAAGTAAATCTGTGGGCCGTGGTAGTCCGGCGAAGAGGTTAATCTTTGCAGGGATTGC
AGAGTGCGAGTCGACAATGGATTGTATAAATATTAACATCTGCATAAATGTGCAGATTTCATCTATGACA

```


Tabla 30. Propiedades del par de oligonucleótidos para la detección de *Shigella* spp.

ipaHFw		ipaHRv	
Secuencia	5'- GGAGAGTTCTGACTTTAT CC -3'	Secuencia	5'- ACAGTATCATGAATCTGC AC -3'
Complemento	5'- GGATAAAGTCAGAACTCT CC -3'	Complemento	5'- GTGCAGATTCATGATACT GT -3'
Tamaño	20	Tamaño	20
Contenido de GC	45 %	Contenido de GC	40 %
Temperatura media	55.8 °C	Temperatura media	56.6 °C
Peso molecular	6123 g/mol	Peso molecular	6085 g/mol
Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica		Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica	
Homodímeros: Sin formación de homodímeros de importancia		Homodímeros: Sin formación de homodímeros de importancia	

Tamaño del amplicón = 588 pb

GGAGAGTTCTGACTTTATCCCGGGCAATGTCCTCCAGAATTTTCGAGGCGGAACATTTCC
 CTGCCAGGGAGAGCAGAGCGCCGGTATCATTATCGAAAAGGCCTTCTGATGCCTGAT
 GGACCAGGAGGGTTTTCCGGAGATTGTTCCATGTGAGCGCGACACGGTCCTCACAGCT
 CTCAGTGGCATCAGCAGCAACAGCGAAAGACTGCTGTCTGAAGCTCCGCAGAGGCACTG
 AGTTTTTCCAGCCATGCAGCGACCTGTTACGGAATCCGGAGGTATTGCGTGACAGAGAC
 GGTATCGGAAAGGCGGTCAAGGAACGCGGAAAAGGTGTTGGCATGCTCTTCATGTTCAA
 AAGCATGCCATATCTGTGATACATCAGATTGTTTGTTCGGAACCATGCTGTCCAGG
 CATCAGCCAGGGGGCGATGGAGTGTATTCTGTTGTCCGTCCTCATGGAGAAGTAAATC
 TGTGGCCGTGGTAGTCCGGCGAAGAGGTTAATCTTTGCAGGGATTGCAGAGTGCGAG
 TCGACAATGGATTGTTATAAATATTAACATCTGCATAAATGTGCAGATTCATCTATGACA



Figura 8. Gen *ipaH*. La imagen representa el gen completo y se observa en que parte se alinean los oligonucleótidos, la flecha verde muestra el producto de PCR.

En la siguiente tabla se observan los dímeros considerados de importancia, los cuales podrían afectar a la técnica y provocar que no existiera amplificación debido a su interacción:

Tabla 31. Interacción de oligonucleotidos (formación de heterodímeros en una reacción multiplex)

Par de oligos		No. dímeros	ΔG (Kcal/mol)	Par de oligos		No. dímeros	ΔG (Kcal/mol)
InvA-176	INvA-291	0	NA	UidAF24 1	UidAR38 3	0	NA
InvA-176	UidAF241	0	NA	UidAF24 1	634F	0	NA
InvA-176	UidAR383	1	-10.29	UidAF24 1	770R	0	NA
InvA-176	634F	0	NA	UidAF24 1	ipaHFw	0	NA
InvA-176	770R	0	NA	UidAF24 1	ipaHRv	0	NA
InvA-176	ipaHFw	0	NA	UidAR38 3	634F	0	NA
InvA-176	ipaHRv	0	NA	UidAR38 3	770R	0	NA

INvA-291	UidAF2 41	0	NA	UidAR38 3	ipaHFw	0	NA
INvA-291	UidAR3 83	0	NA	UidAR38 3	ipaHRv	0	NA
INvA-291	634F	1	-10.2	634F	770R	0	NA
INvA-291	770R	0	NA	634F	ipaHFw	0	NA
INvA-291	ipaHFw	0	NA	634F	ipaHRv	0	NA
INvA-291	ipaHRv	0	NA	770R	ipaHFw	0	NA
ipaHFw	ipaHRv	0	NA	770R	ipaHRv	0	NA

En total hay una dimerización de 2 interacciones entre oligonucleótidos, que teóricamente podría interferir en la técnica de detección simultánea.

Tabla 32. Especificidad Teórica

Par de oligos	Agente blanco	Agente no blanco que detecta
UidaF241 y UidaR383	<i>Escherichia coli</i> genérica	<i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>Rhizobium</i> sp., <i>Shigella sonnei</i> .
INVA-176 e INVA-291	<i>Salmonella</i> spp.	Ninguno
634F y 770R	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i> , <i>Listeria innocua</i>
ipaHFw e ipaHRV	<i>Shigella</i> spp.	Ninguno

Derivado de los resultados obtenidos, se determinó que los cebadores utilizados para la detección de *Escherichia coli* genérica, también detectan a *Shigella* spp., por lo que sería necesario un paso adicional (por ejemplo, un par de oligonucleótidos que permitan detectar la presencia de las toxinas Shiga de *Escherichia coli* patógena. También se utilizará otro

par de oligonucleótidos que apoyaran el análisis para diferenciar y confirmar a *Shigella* spp. de *Escherichia coli* patógena).

Los oligonucleótidos utilizados para la confirmación son los que a continuación se describen junto con su análisis bioinformático.

Oligonucleótidos para la detección de la Shigatoxina 1

El gen *stx1* codifica la toxina Shiga 1 la cual está relacionada con la patogenicidad de *Escherichia coli* y la lisis de las células epiteliales. La secuencia del gen se muestra a continuación:

>Shiga_toxin_1_Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA.

```
TCAACTGCTAATAGTTCTGCGCATCAGAATTGCCCCAGAGTGGATGAATCCCACAATATTTTATTGTGCGTAATCCCACGGA
CTCTTCCATCTGCCGGACACATAGAAGGAACTCATCAGATGCCATTCTGGCAACTCGCGATGCATGATGATGACAATTCAG
TATTAATGCCACGCTTCCAGAATTGCATTAATGCTTCCAAAAGAAATCTTCCCTACACGAACAGAGTCTTGTCCATGATAATC
AGGCAGGACACTACTCAACCTTCCCAGTTCAATGTAAGATCAACATCTTCAGCAGTCATTACATAAGAACGCCCACTGAGA
TCATCCAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGTATTTGCCGAAAACGTAAAGCTTCAGCTGTCACAGTAACAAACCGTAACATCGC
TCTTGCCACAGACTGCGTCAGTGAGTTCCACTATGCGACATTAATCCAGATAAGAAGTAGTCAACGAATGGCGATTATC
TGCATCCCCGTACGACTGATCCCTGCAACACGCTGTAACGTGGTATAGCTACTGTCACCAGACAATGTAACCGCTGTTGTAC
CTGAAAAGGTAACATGTGAAAAATCAGCAAAGCGATAAAAAACATTATTTGTCCTGTAAACAAATCCTGTCACATATAAATTAT
TTCGTTCAACAATAAGCCGTAGATTATTAACCGCCCTTCTCTGGATCTATCCCTCTGACATCAACTGCAACAAATTATCC
CCTGTGCCACTATCAATCATCAGTAAAGACGTACCTCCTGATGAAATAGTCTGTAATGGAGTACCTATTGCAGAGCGAATGA
CATTAGCGAATCTACATACGTCTTTGCAGTCGAGAAGTCTAAGGTAATTCCTTCGCAACCACATTAAGTAAAAAGATAACA
AAGAAAAAGTTAGCACTCTAAAAATAATTATTTTCAT
```

Tabla 33. Propiedades del par de oligonucleótidos para la detección de la toxina Shiga 1.

Stx1F934		Stx1R1042	
Secuencia	5'- GTGGCA TTA ATA CTG AAT TGT CAT CA -3'	Secuencia	5'- GCG TAA TCC CAC GGA CTC TTC -3'
Complemento	5'- TGA TGA CAA TTC AGT ATT AAT GCC AC -3'	Complemento	5'- GAA GAG TCC GTG GGA TTA CGC -3'
Tamaño	26	Tamaño	21
Contenido de GC	34.6 %	Contenido de GC	57.1 %

Temperatura media	61.7 °C	Temperatura media	64.7°C
Peso molecular	7984.2 g/mol	Peso molecular	6342.2 g/mol
Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica		Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica	
Homodímeros: Forma dos, uno con un $\Delta G = -7.8$ kcal/mol y otro con un $\Delta G = -5.36$ kcal/mol		Homodímeros: Sin formación de homodímeros de importancia	

Tamaño del amplicón = 109 pb

GCGTAATCCCACGGACTCTTCATCTGCCGGACACATAGAAGGAAACTCATCAGATGCC
ATTCTGGCAACTCGCGATGCATGATGATGACAATTCAGTATTAATGCCAC



Figura 9. Gen *stx1*. La imagen representa el gen completo y se observa en que parte se alinean los oligonucleótidos, la flecha verde muestra el producto de PCR.

Oligonucleótidos para la detección de la Shigatoxina 2

El gen *stx2* codifica la toxina Shiga 2 la cual está relacionada con la patogenicidad de *Escherichia coli* y la lisis de las células epiteliales. La secuencia del gen se muestra a continuación:

Secuencia

>Shiga_toxina_2_Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA.

ATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGCTTCTGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGTGCTAAAGGTAAAATTGA
 GTTTTCCAAGTATAATGAGGATGACACATTTACAGTGAAGGTTGACGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCTGCAA
 CCGTTACTGCAAAGTGCTCAGTTGACAGGAATGACTGTCACAATCAAATCCAGTACCTGTGAATCAGGCTCCGGATTTGCTG
 AAGTGCAGTTTAATAATGACTGA

Tabla 34. Propiedades del par de oligonucleótidos para la detección de la toxina Shiga 2.

Stx2F1218		Stx2R1300	
Secuencia	5'- GAT GTT TAT GGC GGT TTT ATT TGC -3'	Secuencia	5'- TGG AAA ACT CAA TTT TAC CTT TAG CA -3'
Complemento	5'- TGC TAA AGG TAA AAT TGA GTT TTC CA - 3'	Complemento	5'- TGC TAA AGG TAA AAT TGA GTT TTC CA -3'
Tamaño	24	Tamaño	26
Contenido de GC	37.5 %	Contenido de GC	30.8 %
Temperatura media	62.3 °C	Temperatura media	62.9°C
Peso molecular	7984.2 g/mol	Peso molecular	7928.2 g/mol
Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica Homodímeros: Forma dos, uno con un $\Delta G = -7.8$ kcal/mol y otro con un $\Delta G = -5.36$ kcal/mol		Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica Homodímeros: Formas dos homodímeros; $\Delta G = -5.83$ kcal/mol, $\Delta G = -5.36$ kcal/mol	

Tamaño del amplicón = 83 pb

GATGTTTATGGCGGTTTTATTTGCATTAGCTTCTGTTAATGCAATGGCGGCGGATTGTGC
 TAAAGGTAAAATTGAGTTTTCCA

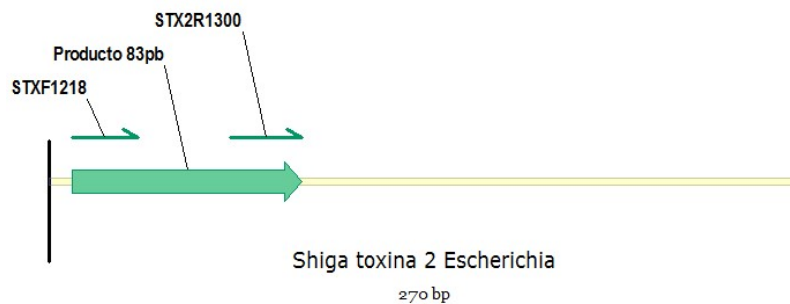


Figura 10. Gen *stx2*. La imagen representa el gen completo y se observa en que parte se alinean los oligonucleótidos, la flecha verde muestra el producto de PCR.

Tabla 35. Formación de heterodímeros. La reacción de confirmación de PCR es una reacción multiplex, por lo que se toma en cuenta la interacción entre estos oligonucleótidos

Par de oligos		No. dímeros	ΔG (Kcal/mol)	Par de oligos		No. dímeros	ΔG (Kcal/mol)
Stx1F9 34	Stx1R1 042	1	-6.37	Stx1F93 4	Stx2R13 00	1	-7.32
Stx1F9 34	Stx2F1 218	2	-5.09 y -5	Stx1F93 4	UidAF24 1	0	0
Stx1F9 34	UidA38 3	4	-8.16, -6.37, -5.36 y - 5.02	Stx1R10 42	Stx2F12 18	1	-5.02
Stx1R1 042 +	StxR13 00	1	-5.02	Stx1R10 42	UidAF24 1	3	-6.75, -6.12 y -5.02
Stx1R1 042	UidAr3 83	0	0	Stx2R13 00	UidA F241	1	-5.83
Stx2R1 300	UidAR3 83	3	-5.09, -5.02 y -5.02	UidAF24 1	UidAR38 3	2	-9.54 y .5.02

Oligonucleótidos para la detección del gen *ipaH*

El gen *ipaH* está relacionado con la virulencia de *Shigella*.

Secuencia

>*ipaH*_Shigella flexneri 2a str. 301, complete genome

TTATGAATGGTGCAGTTGTGAGCCGTTTTTCAGACAATCGCAGGGCCAGTACCTCGTCAGTCACTTGACGGTAAATCTGCTGT
 TCAGTCTCACGCATCACCTGTGCACCGGCTTCCCTCTCCGCATCCGCATCACCGCTCAGACCTGATGCTTTCAGCCGGTCA
 GCCACCCTCTGAGAGTACTCATTCTCCAGCATCTCATATTTCTGCTCTTCTGCCTGCGCCCAGCGGTGAGCTTCCGTACGCT
 TCAGTACAGCATGCCATGGTCCCCAGAGGGAGAACCAGTCCGTAAATTCATTCTCTTCACGGCTTCTGACCATGGCTTCGG
 CAGTGCAGGAGTCAATTTGCTGTCACTCCCGACACGCCATAGAAACGCATTTCCCTTCACGGCAGTGGAGAGCTGAAGTTTCT
 CTGCGAGCATGGTCTGGAAGGCCAGGTAGACTTCTATCTCATCCACAAAATGGAGAGTTCTGACTTTATCCCGGGCAATATC
 CTCCAGAATTTTCGAGGCGGAACATTTCCCTGCCAGGGAGAGCAGAGCGCCGGTATCATTATCGAAAAGGCCCTTCTGATGC
 CTGATGGACCAGGAGGGTTTTCCGGAGATTGTTCCATGTGAGCGCGACACGGTCTCACAGCTTTCAGTGGCATCAGCAGC
 AACAGCGAAAGACTGCTGTGCAAGCTCTGCAGAGGACTGAGTTTTCCAGCCATGCAGCGACCTGTTACAGGAATCCGGA
 GGTATTGCGTGCAGAGACGGTATCGGAAAGCGGTCAAGGAACCGGAAAAGGTGTTGGCGTGCTTTCATGTTCAAAG
 CATGCCATATCTGTGATACATCAGATTGTTTGTTCGGGAACCATGCTGTACGGCATCAGCCAGGGGGCGATGGAGTG
 TATTCTGTTGTCCGCTCACTCATGGAGAAGTAAATCCGTGGGCCGTGGTAGTCCGGTTGGGCGGTTTTGTTGCGACAGAGACT
 CCCTGATCCGTGAGGACAGAGGATTGTCTTCGAGGATGATAGTGCAGGTCCGATCAAGGCTAAGTATATTTCCGGAATGT
 GTGTGATGCGATTCTCGCGCACCGGAAAAATATCTCGTTTTCTCTGAGTGATGATTTCTTACAGGTACGGCTGGTAGGCT
 TTCCAGAAGATTAGTACTTACATCGAGCGCTTCCAGTGATTCAGGTAACCTCAGGGAGAAATGTCAGCTGGTTATTTCTACTG
 AGAGCACTTCCAGCGATGTAGGTAATTCAGGAAGCATGGTTAGCTGATTGTTATCTGCATTAATATATTCCAGCAATGCAGG
 CAATTCAGGAAGCATGGTTAGTTGTTGTTATCTACATCAAGATGTTTCAGAGATGCGGGTAATTCAGGAAGTGTGACAGG
 CGATTGTCACAGGCGTCAAGGTATTCCAGCGATGCTGGCAATTCGGTAATGATATTAGGGCATTCTGAGTAATTTCCAGAA
 CAGTGATTTGAGGTGGTAAGTTGTCAGGTAGCGAGGACAGATTTAAACGATTTCAGTTGAAGCTCACTGAAGTATTGATGAG
 ACATTCTTTAAGTAGGGAGACCGCTTCATTCCGATTTTACCAGGGAGCGCTTGTTCATTTCCATTTATCCCATGCTGAAAAGT
 AATCAGCATATGTACCGGAAATAGTGTTATAAAAAGAATTTGGGACAATGAAAAGTTATTATTTATCGGTAACATGATGGACA
 T

Tabla 36. Propiedades del par de oligonucleótidos para la detección de *ipaH*.

Ipa3		Ipa4	
Secuencia	5'- GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT CA-3'	Secuencia	5'- GCCGGTCAGCCACCCT CTGAGAGTAC- 3'
Complemento	5'- TGA CGG TAT CGG AAA GGC GGT CAA GGA AC -3	Complemento	5'- GTA CTC TCA GAG GGT GGC TGA CCG GC -3'
Tamaño	29	Tamaño	26

Contenido de GC	55.2%	Contenido de GC	65.4%
Temperatura media	64.9°C	Temperatura media	65.9°C
Peso molecular	8755.9g/mol	Peso molecular	7917.2g/mol
Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica Homodímeros: No forma homodimeros		Horquillas: No forma horquillas consideradas de importancia para la técnica Homodímeros: Formas dos homodimeros; $\Delta G = -9.75$ kcal/mol, $\Delta G = -5.13$ kcal/mol	

Las interacciones de ambos oligonucleótidos forman tres heterodímeros considerados de importancia, los cuales tienen un $\Delta G = -11.55$ kcal/mol, -8.02 kcal/mol y -6.68 kcal/mol.

Tamaño del amplicón = 620 pb

GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTACTCATTCTCCAGCATCTCATATTTCTGCTCTTCTG
CCTGCGCCCAGCGGTCAGCTTCCGTACGCTTCAGTACAGCATGCCATGGTCCCCAGAG
GGAGAACCAGTCCGTAATTCATTCTCTTCACGGCTTCTGACCATGGCTTCGGCAGTGC
GGAGGTCATTTGCTGTCACTCCCGACACGCCATAGAAACGCATTTCCCTTCACGGCAGTG
GAGAGCTGAAGTTTCTCTGCGAGCATGGTCTGGAAGGCCAGGTAGACTTCTATCTCATC
CACAAAATGGAGAGTTCTGACTTTATCCCGGGCAATATCCTCCAGAATTTGAGGCGGA
ACATTTCCCTGCCAGGGAGAGCAGAGCGCCGGTATCATTATCGAAAAGGCCTTCTGAT
GCCTGATGGACCAGGAGGGTTTTCCGGAGATTGTTCCATGTGAGCGCGACACGGTCCT
CACAGCTTTCAGTGGCATCAGCAGCAACAGCGAAAGACTGCTGTGGAAGCTCTGCAGAG
GTACTGAGTTTTTCCAGCCATGCAGCGACCTGTTCCACGGAATCCGGAGGTATTGCGTGC
AGAGACGGTATCGGAAAGGCGGTCAAGGAAC

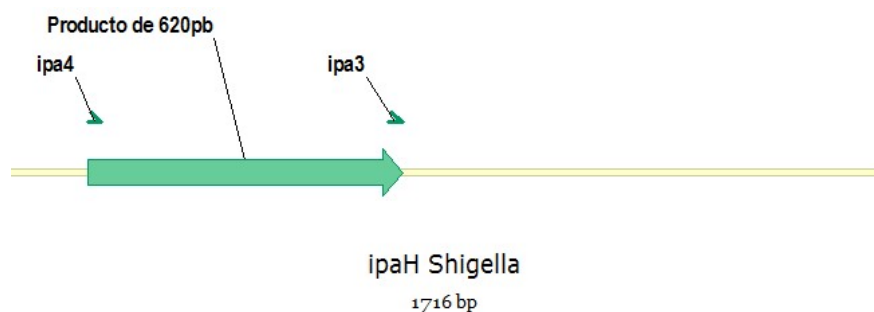


Figura 11. Gen *ipaH*. La imagen representa el gen completo y se observa en que parte se alinean los oligonucleótidos, la flecha verde muestra el producto de PCR.

8.2. Determinación individual de la Tm de las curvas Melting

De las reacciones realizadas para la determinación de la Tm, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 37. Tm de las Curvas melting. En la tabla se muestran las temperaturas medias de las curvas de reacción. En el caso de *Shigella* no se presente amplificación debido a que no se contaba con DNA de *Shigella*.

Patógeno blanco	Mix utilizado	Melting Curve Obtenidas de las reacciones					
		Repetición 1 Control +	Repetición 1 Control +	Repetición 2 Control +	Repetición 3 Control -	Repetición 2 Control -	Repetición 3 Control -
<i>Salmonella</i>	Salm1	83.09°C	83.12°C	83.10°C	Sin interferir	Sin interferir	Sin interferir
<i>Shigella</i>	<i>Shigella</i>	Sin amplificar	Sin amplificar	Sin amplificar	Sin interferir	Sin interferir	Sin interferir
<i>Listeria m.</i>	Lm	79.98°C	80.24°C	80.22°C	Sin interferir	Sin interferir	Sin interferir
<i>E. coli</i>	Ecoli	86.48°C	86.47°C	86.52°C	Sin interferir	Sin interferir	Sin interferir

En la Figura 4 se observan con mayor detalle los resultados de la Tm de las Curvas melting.

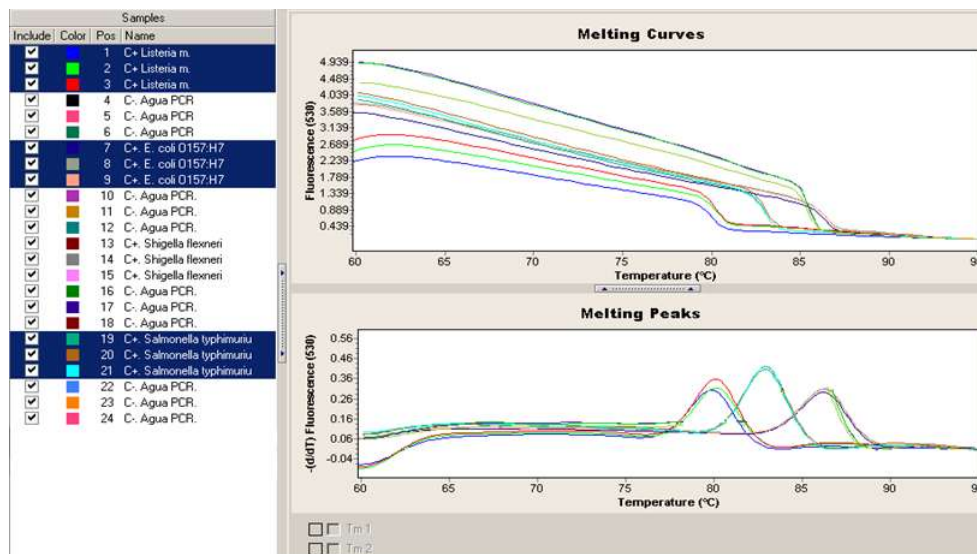


Figura 12. Tm de las Curvas melting. En los gráficos se muestran las Curvas melting y las temperaturas medias a las cuales se presentan la Tm sw los oligos utilizados.

En la tabla 17 y en la figura 4, se puede observar que las Tm de las Curvas melting son diferentes, este comportamiento es bueno para realizar una multiplex PCR utilizando SYBR Green. Para el caso de *Shigella* no se mostraron resultados debido a que no se contaba con DNA genómico de *Shigella*. En el caso de los controles negativos, no hay dimerizaciones que intervengan en los resultados individuales, dichos resultados se muestran en la figura 5. En la figura se puede observar que no hay Curvas melting que interfieran en los resultados, por lo que se considera que los oligonucleótidos no forman dímeros que interfieran en la interpretación de los resultados.

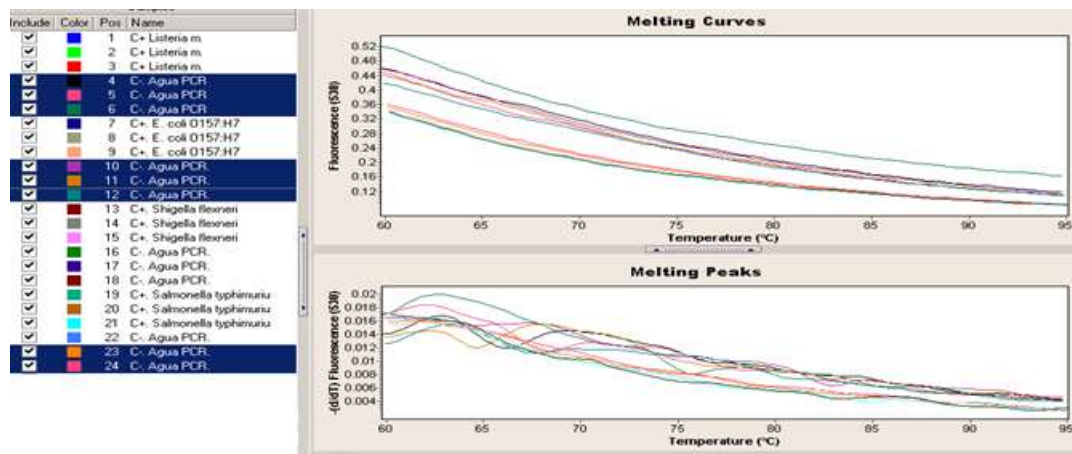


Figura 13. Resultado de los controles negativos

8.3. Influencia de la concentración de magnesio en la reacción de PCR

Tabla 38. Resultados de la influencia de la concentración de magnesio en las reacciones de PCR. En la tabla se puede observar las temperaturas y resultados de fluorescencia.

Modificación	1- Control positivo		2- Control positivo		1- Control negativo		2- Control negativo	
	Tm Curva °C	Fluorescencia	Tm Curva °C	Fluorescencia	Tm Curva	Fluorescencia	Tm Curva °C	Fluorescencia
Sin adición de magnesio	92.71	5.739	92.47	6.509	No present ó	0.398	No present ó	0.381
2.5 mM de magnesio extra	86	5.541	86.51	8.301	No present ó	0.412	No present ó	0.375
5 mM de magnesio extra	85.96	2.542	86.21	4.189	No present ó	0.484	No present ó	0.565

En la tabla anterior se puede observar la Temperatura de las Curvas melting y los resultados de fluorescencia, visualizándose claramente que utilizando concentraciones de magnesio de 2.5 mM se presentan Curvas melting con temperaturas similares y en el caso de las muestras a las que no se adicionó magnesio, se presentó una Curva melting con mayor temperatura, debido a que la fluorescencia proviene de la muestra de DNA genómico. Es importante recordar que el SYBR Green es una molécula intercalante en DNA de doble cadena y la muestra contiene DNA genómico, el cual interfiere en las lecturas, por lo que si no se tienen los criterios correctos, se puede confundir un producto amplificado con la muestra de DNA genómico.

8.4. Prueba de reacción de PCR multiplex, utilizando cuatro pares de oligonucleótidos

No se obtuvieron Curvas melting de los DNA molde utilizados, debido a que no hubo amplificación de PCR, por lo que se consideró que la PCR multiplex con cuatro pares de oligonucleótidos no era viable. Para reducir la cantidad de oligonucleótidos utilizados, y de acuerdo a la especificidad teórica calculada, se elaboró un protocolo para la detección del gen *uidA* de las cepas de *Escherichia coli* y cepas de *Shigella spp.*

8.5. Reacción de PCR para la detección de *Escherichia coli-Shigella spp.*, utilizando el gen *uidA* y verificación de la funcionalidad de los oligonucleótidos ipaHFw e ipaHRw

Se realizaron PCR para detectar *Escherichia coli-Shigella spp.*, utilizando el gen *uidA*, el cual se encuentra en ambos patógenos. También se verificó la funcionalidad de los oligonucleótidos para discriminar *Shigella spp* de *Escherichia coli*. Se utilizaron como DNA molde diez serotipos de *Escherichia coli* y cuatro especies de *Shigella spp.*

En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos de las reacciones realizadas.

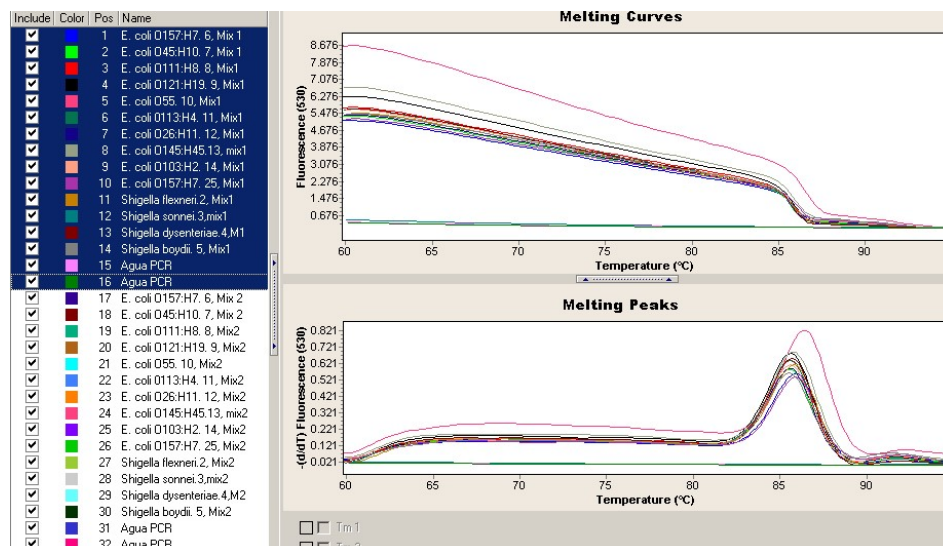


Figura 14. Las muestras marcadas pertenecen a la mezcla de reacción que contenía los oligonucleótidos para la detección del gen *uidA*, los cuales detectaron tanto a *Escherichia coli* como a *Shigella spp.*

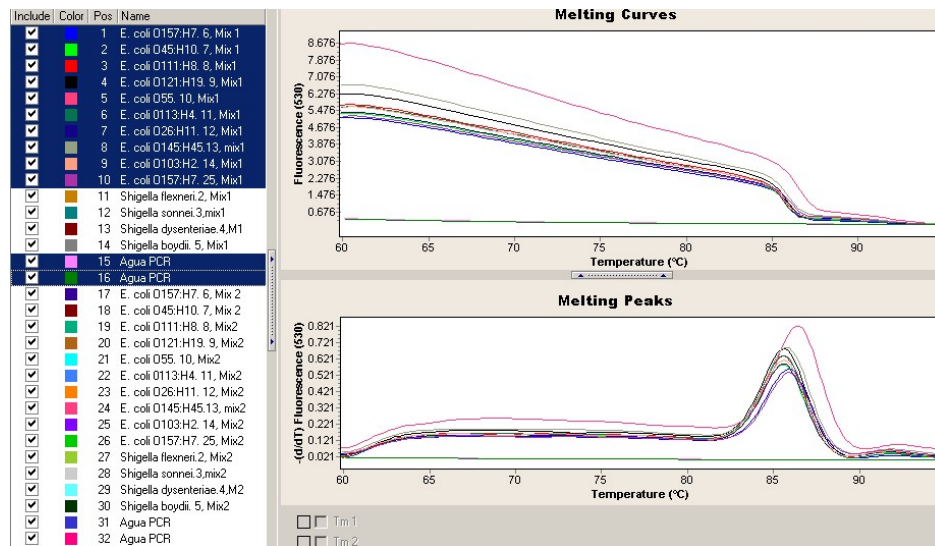


Figura 15. Gen *uidA*. En la figura se muestra la comparación de las cepas de *Escherichia coli* y los negativos, donde se observan las Curvas melting bien definidas, lo cual confirma una buena amplificación.

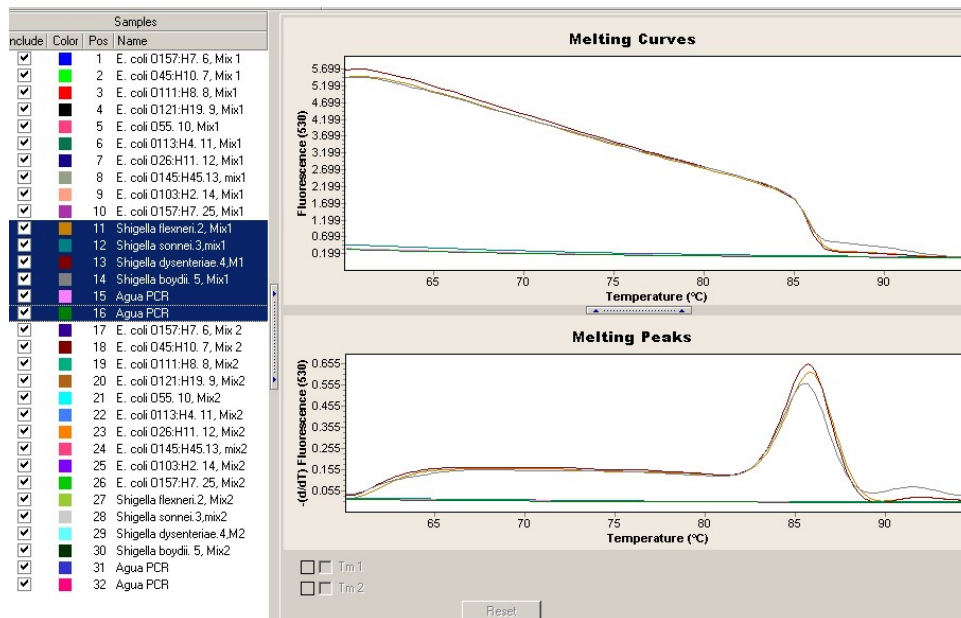


Figura 16. Gen *uidA*. Se observa la comparación de las cepas de *Shigella* spp con los controles negativos. Para el caso de *Shigella sonnei* no se presentó una curva, debido a que en la suspensión bacteriana utilizada de esta cepa no se observó crecimiento (por lo que no se pudo obtener DNA); sin embargo, se utilizó la muestra para confirmar la ausencia del patógeno.

Las figuras anteriores, pertenecen a la detección del gen *uidA*, y los oligonucleótidos utilizados en esta reacción son capaces de detectar a *Escherichia coli* y *Shigella* spp. La discriminación entre las dos especies requiere del uso de otro par de oligonucleótidos, para la detección del gen *ipaH* (característico de *Shigella* spp.). En la siguiente figura se pueden observar los resultados obtenidos de dichas reacciones, cabe mencionar que no hubo amplificación.

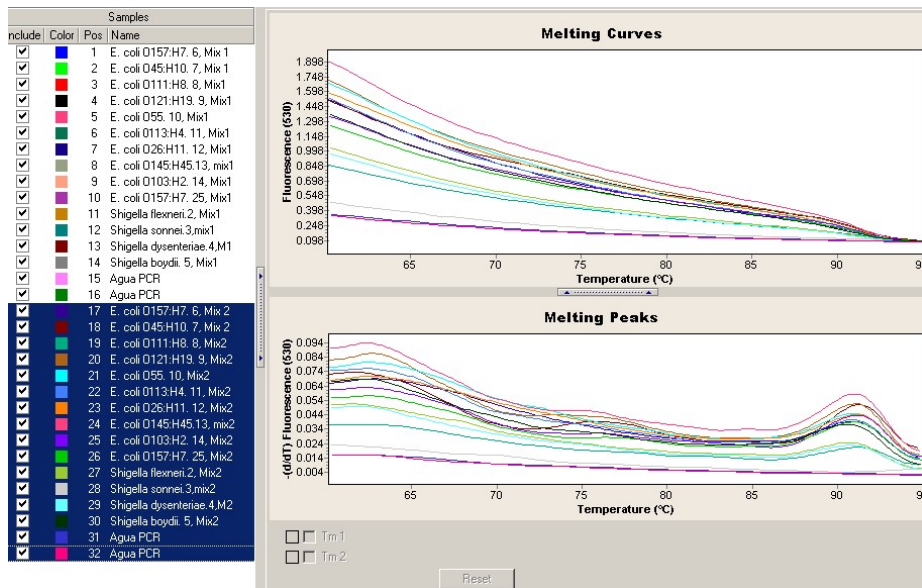


Figura 17. Detección de *Shigella* spp. En la figura se puede apreciar que no existen Curvas melting, debido a que no hubo amplificación, por lo que los oligonucleótidos utilizados no son adecuados.

Se obtuvieron resultados satisfactorios para la reacción que detecta el gen *uidA*, recordando que se utilizaron oligonucleótidos capaces de detectar a *Escherichia coli* y *Shigella* spp. En cuanto a los oligonucleótidos utilizados para la detección de *Shigella* spp., se consideraron no viables por lo que se procedió a realizar una nueva búsqueda de oligonucleótidos para la detección de *Shigella* spp.

8.6. PCR multiplex para la detección de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli-Shigella* spp y PCR para discriminación de *Shigella* spp.

Las temperaturas melting para cada gen de interés fueron las siguientes;

Tabla 39. Rango de temperaturas para Curvas melting.

GEN	Rango de Tm (°C)
<i>uidA</i>	85.5 ± 0.5
<i>hlyA</i>	79.5 ± 1
<i>invA</i>	83.1 ± 1
<i>ipa</i>	88 ± 0.5

Una vez terminada la reacción se procedió a anotar los resultados obtenidos de acuerdo a la siguiente tabla;

Tabla 40. Resultados de la reacción de PCR

No. capilar	Muestra	Melting Curves obtenidas de las reacciones					
		Tm 1	Tm 2	Tm 3	Tm 4	Tm 5	Tm 6
1	<i>E. coli</i> O157:H7	85.16	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
2	<i>E. coli</i> O157:H7	85.02	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
3	<i>Shigella flexneri</i>	85.49	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
4	<i>Shigella flexneri</i>	85.42	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
5	<i>Salmonella</i>	82.81	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
6	<i>Salmonella</i>	82.76	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
7	<i>Listeria m.</i>	79.05	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
8	<i>Listeria m.</i>	78.92	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
9	Mix DNA's	85.09	83.06	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
10	Mix DNA's	84.91	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
11	Agua PCR	80.38	77.53	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
12	Agua PCR	80.51	77.70	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
13	<i>Shigella flexneri</i>	87.97	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
14	<i>Shigella flexneri</i>	87.97	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
15	<i>Shigella boydii</i>	88.13	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
16	<i>Shigella boydii</i>	88.11	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
17	<i>Shigella dysenteriae</i>	88.12	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA

18	<i>Shigella dysenteriae</i>	88.10	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
19	<i>Shigella sonnei</i>	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
20	<i>Shigella sonnei</i>	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
21	<i>E. coli</i> O157:H7	65.43	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
22	<i>E. coli</i> O157:H7	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
23	Agua PCR	84.36	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA
24	Agua PCR	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA	SIN CURVA

Los resultados obtenidos de esta prueba fueron los siguientes:

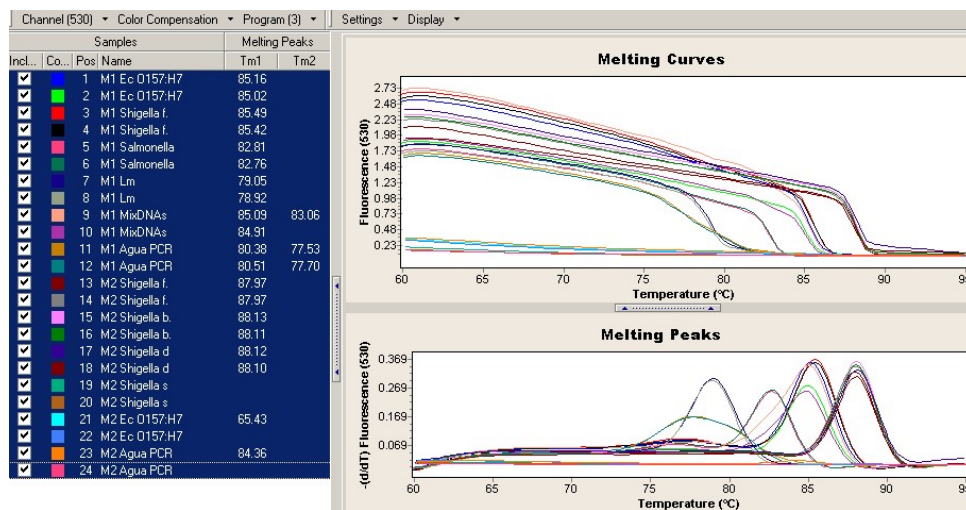


Figura 18. Total de reacciones en el termociclador. En la figura se muestra el total de reacciones realizadas en el termociclador, tanto de las multiplex PCR como de las reacciones para la detección de *Shigella* spp.

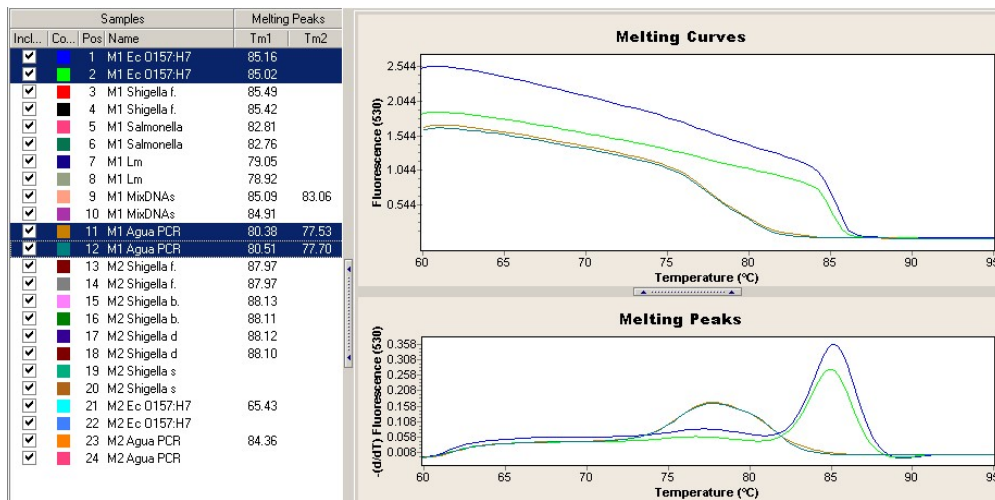


Figura 19. Multiplex PCR. Se muestra una comparación de resultados entre controles positivos con DNA de *Escherichia coli* O157:H7 y controles negativos con agua grado PCR. La temperatura de las Curvas melting de los controles positivos se encuentra alrededor de los 85°C, en cuanto a los controles negativos, se aprecian Curvas melting hacia los 77.5°C. El máximo de fluorescencia de los controles positivos fue de 2.544, con resultados en la primera derivada de fluorescencia igual a 0.358. Los controles positivos presentaron un máximo de fluorescencia de 1.8, aproximadamente, con resultados en la primera derivada de 0.158.

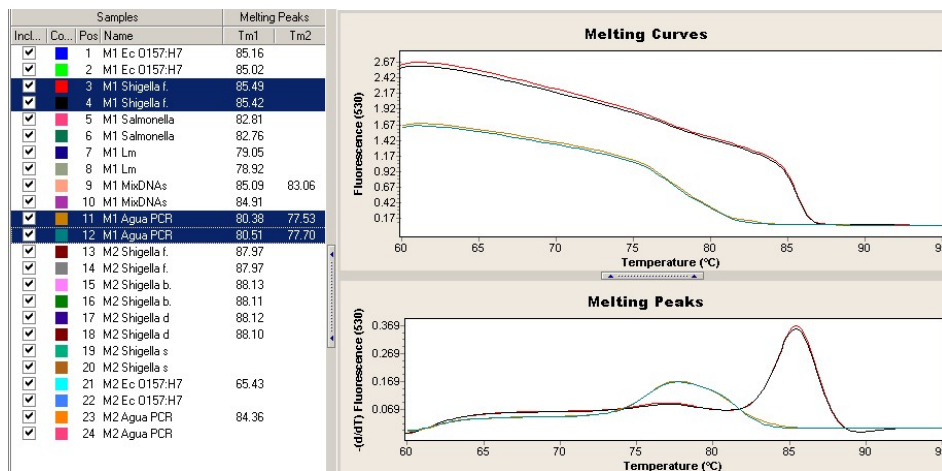


Figura 20. Multiplex PCR. Se muestra una comparación de resultados entre controles positivos con DNA de *Shigella flexneri* y controles negativos con agua grado PCR. La temperatura de las Curvas melting de los controles positivos se encuentra alrededor de los 85°C, en cuanto a los controles negativos, se aprecian Curvas melting entre los 77.5°C. El máximo de fluorescencia de los controles positivos fue de 2.57, con resultados en la primera

derivada de fluorescencia igual a 0.369. Los controles positivos presentaron un máximo de fluorescencia de 1.8, aproximadamente, con resultados en la primera derivada de 0.158.

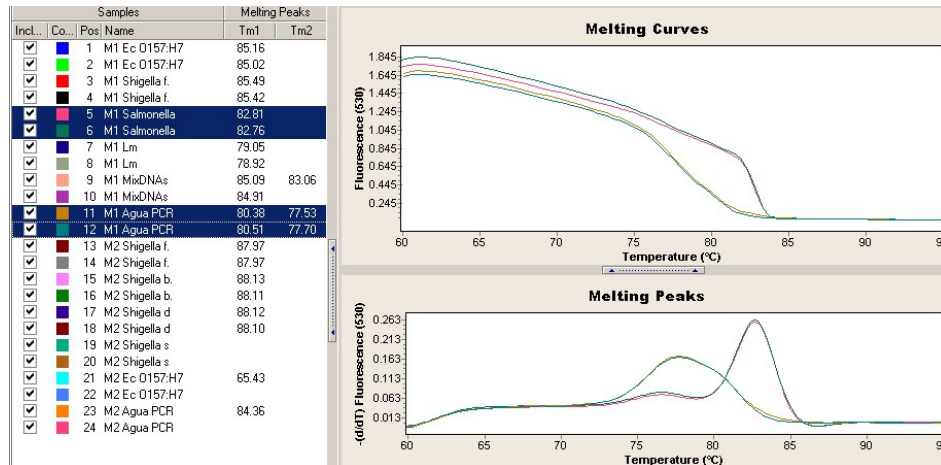


Figura 21. Multiplex PCR. Se muestran una comparación de resultados entre controles positivos con DNA de *Salmonella typhimurium* y controles negativos con agua grado PCR. La temperatura de las Curvas melting de los controles positivos se encuentra alrededor de los 82.8°C, en cuanto a los controles negativos, se aprecian Curvas melting entre los 77.5°C. El máximo de fluorescencia de los controles positivos fue de 1.845, con resultados en la primera derivada de fluorescencia igual a 0.263. Los controles positivos presentaron un máximo de fluorescencia de 1.8, aproximadamente, con resultados en la primera derivada de 0.158.

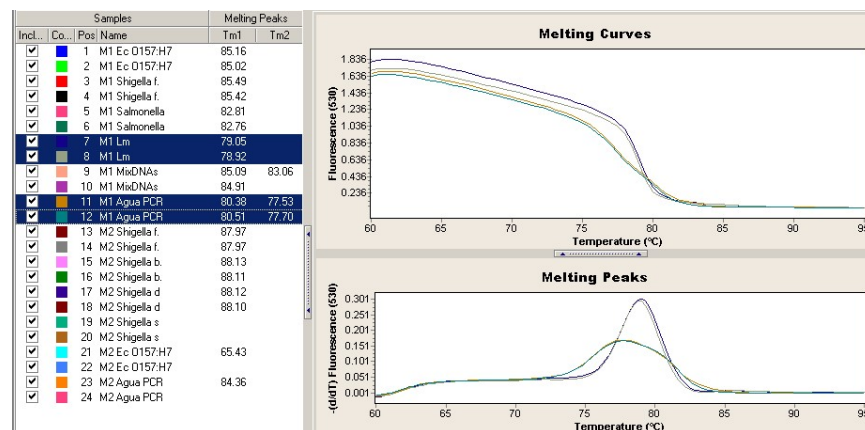


Figura 22. Multiplex PCR. Se muestra una comparación de resultados entre controles positivos con DNA de *Listeria monocytogenes* y controles negativos con agua grado PCR. La

temperatura de las Curvas melting de los controles positivos se encuentra alrededor de los 79°C, en cuanto a los controles negativos, se aprecian Curvas melting entre los 77.5°C. El máximo de fluorescencia de los controles positivos fue de 1.836, con resultados en la primera derivada de fluorescencia igual a 0.301. Los controles positivos presentaron un máximo de fluorescencia de 1.8, aproximadamente, con resultados en la primera derivada de 0.158.

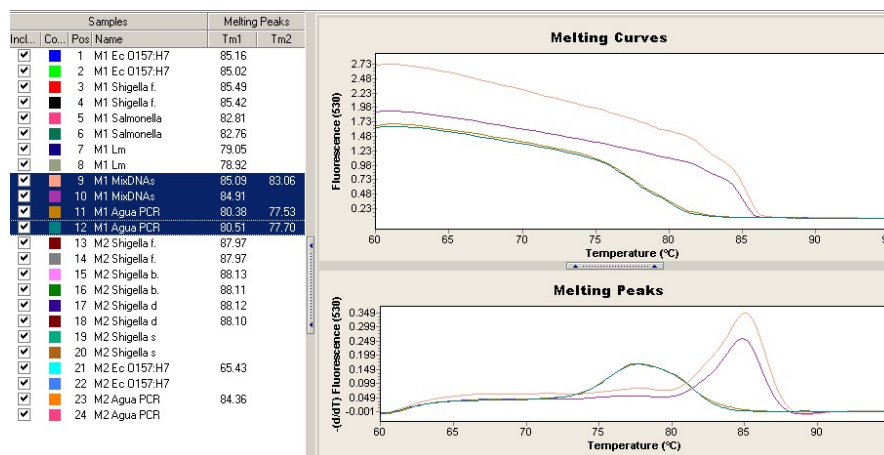


Figura 23. Multiplex PCR. Se muestra una comparación de resultados entre controles positivos con DNA de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7 y controles negativos con agua grado PCR. En este caso, se deben observar tres tipos de Curvas melting en la muestra, sin embargo solo se muestra dos picos, donde, uno se encuentra a una temperatura de alrededor de los 85 y el otro pico es muy tenue y puede apreciarse entre los 78°C, en cuanto a los controles negativos, se aprecian Curvas melting entre los 77.5°C. El máximo de fluorescencia de los controles positivos fue de 2.73, con resultados en la primera derivada de fluorescencia igual a 0.349. Los controles positivos presentaron un máximo de fluorescencia de 1.8, aproximadamente, con resultados en la primera derivada de 0.158.

Resultados de reacción de PCR para la detección de *Shigella spp.*, utilizando los oligonucleótidos ipa3 e ipa4.

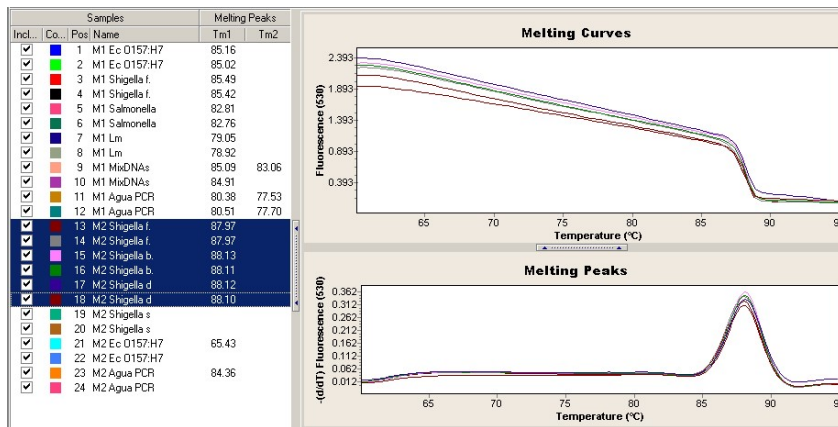


Figura 24. Reacciones PCR para detección de *Shigella* spp. Se muestran los controles positivos de *Shigella* spp., los controles observados fueron las amplificaciones que se llevaron a cabo en la reacción, los controles que amplificaron corresponden a *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella dysenteriae*. Las Curvas melting, pueden apreciarse entre los 88°C. El máximo de fluorescencia de los controles positivos fue de 2.393, con resultados en la primera derivada de fluorescencia igual a 0.362.

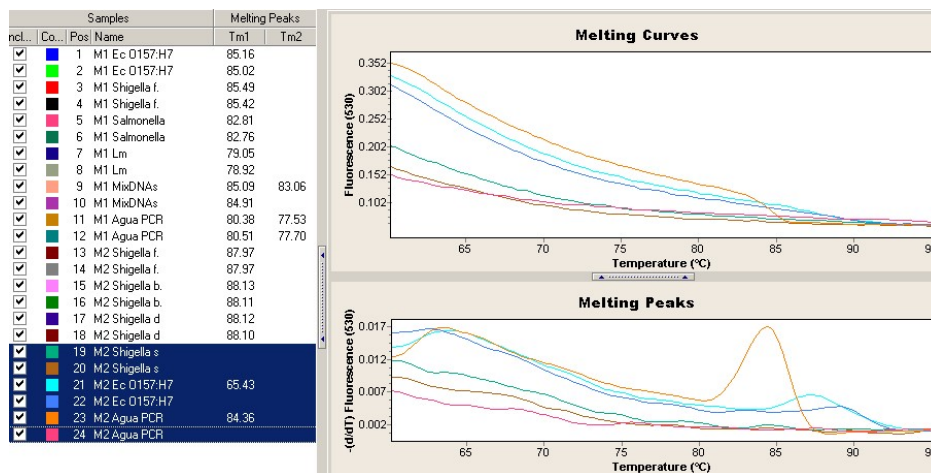


Figura 25. Reacciones PCR para detección de *Shigella* spp. En la figura se observan los resultados obtenidos de un par de controles positivos que contenían DNA de *Shigella sonnei*, controles negativos que contenían DNA de *Escherichia coli* O157:H7 y controles negativos que contenían agua grado PCR. Se aprecia una curva, pero es considerada ruido del sistema debido a la fluorescencia máxima obtenida, que fue de 0.363, con resultados en la primera derivada de 0.017

8.7. PCR multiplex para la detección de cuatro patógenos, utilizando tres pares de oligonucleótidos y optimización de reactivos

Para realizar esta reacción se consideraron los oligonucleótidos para la detección del gen *uidA* (utilizados para la detección de *Escherichia coli* y *Shigella*), los oligonucleótidos para la detección del gen *hlyA* (utilizados para la detección de *Listeria monocytogenes*) y los oligonucleótidos para la detección del gen *invA* (utilizados para la detección de *Salmonella* spp.).

Para la optimización de reactivo de PCR, es relevante recordar que las reacciones anteriores se realizaron a un volumen final de 20 μ L. Por ello se decidió reducir el volumen final a la mitad.

En las siguientes figuras se observan los resultados de esta prueba:

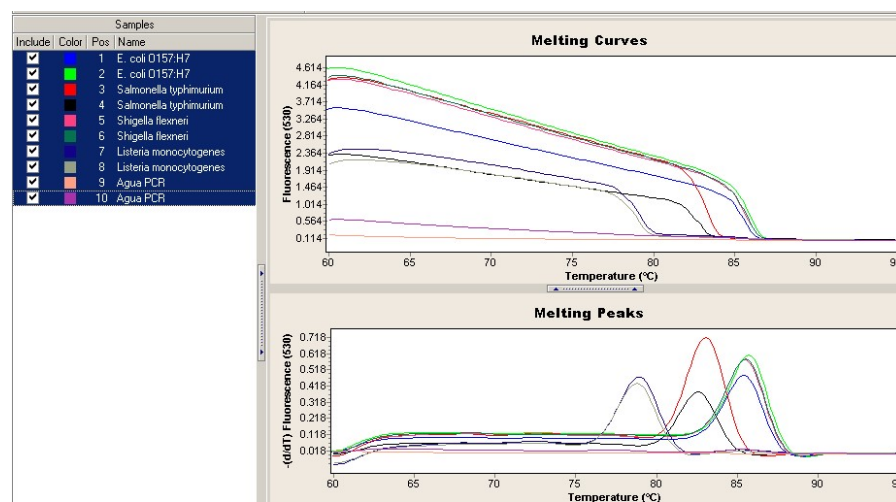


Figura 26. Reacción multiplex para la detección de cuatro patógenos. Se observa una comparación de las curvas de *Escherichia coli* y los controles negativos.

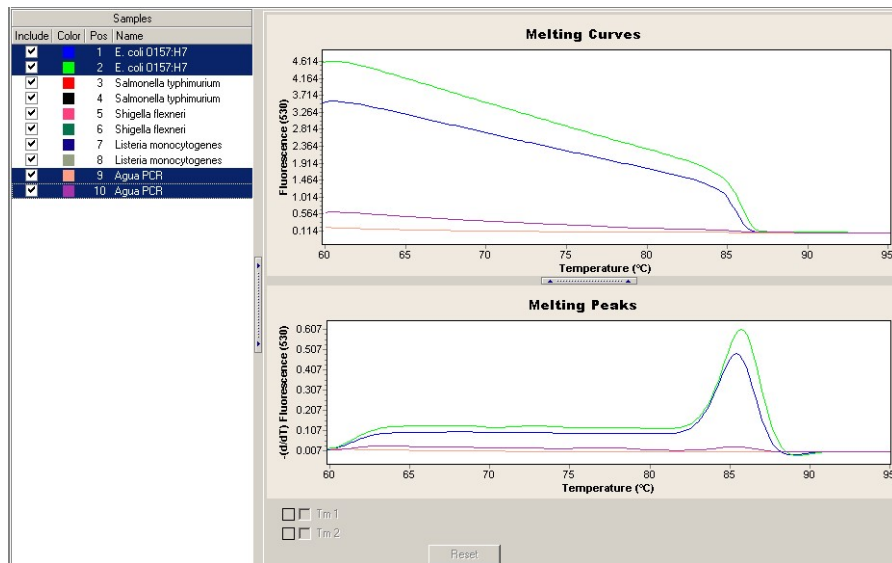


Figura 27. Reacción multiplex para la detección de cuatro patógenos. Se observa la comparación de las curvas de *Salmonella* spp y los controles negativos.

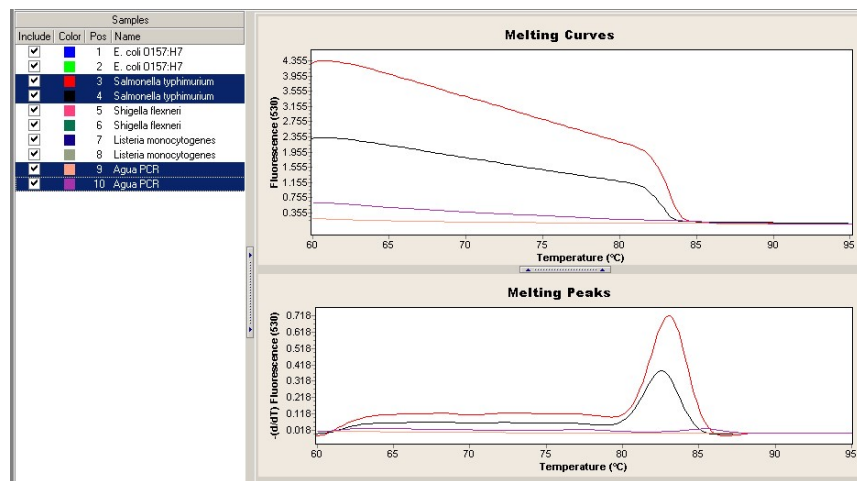


Figura 28. Reacción multiplex para la detección de cuatro patógenos. Se observa la comparación de las curvas de *Shigella* spp y los controles negativos.

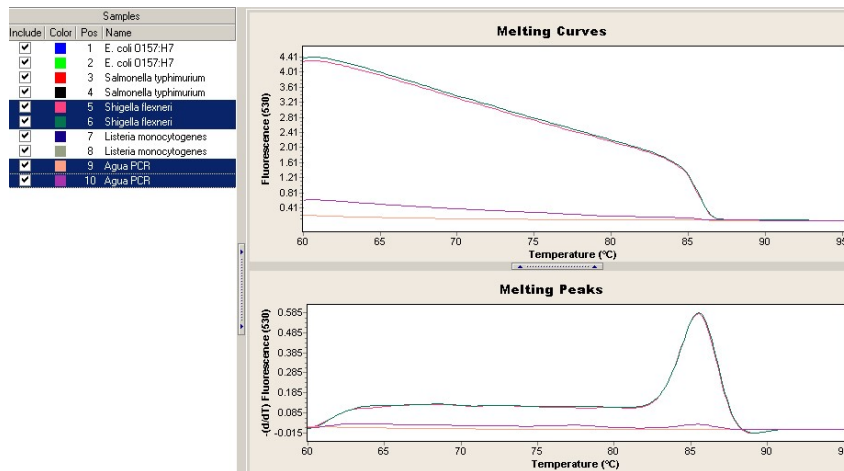


Figura 29. Reacción multiplex para la detección de cuatro patógenos. Se observa la comparación de las curvas de *Listeria monocytogenes* y los controles negativos.

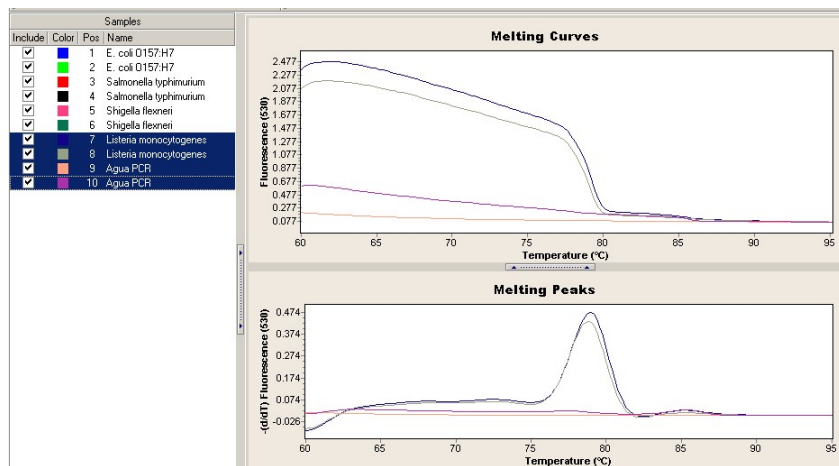


Figura 30. Se aprecian los controles utilizados de *Listeria monocytogenes*, los cuales amplificaron adecuadamente.

Se obtuvieron resultados satisfactorios, por lo que la reacción se considera viable para la detección de los cuatro patógenos, aunque hay que recordar que debe realizarse una discriminación posterior para *Escherichia coli* y *Shigella spp.*. Derivado de una búsqueda de oligonucleótidos específicos para *Shigella spp.*, se encontró un par de cebadores para llevar a cabo esa diferenciación.

8.8. Discriminación de *Shigella* spp. de *Escherichia coli*

Se realizó una búsqueda de oligonucleótidos para la discriminación de *Shigella* spp., los cebadores elegidos fueron los siguientes:

Ipa4

5'- GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT CA -3'

Ipa3

5'- GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC -3'

En esta reacción, también se utilizó un volumen final de 10 µL y en este caso se utilizaron como controles negativos DNA de *Salmonella typhimurium* y de *Escherichia coli*

Las figuras siguientes muestran los resultados obtenidos:

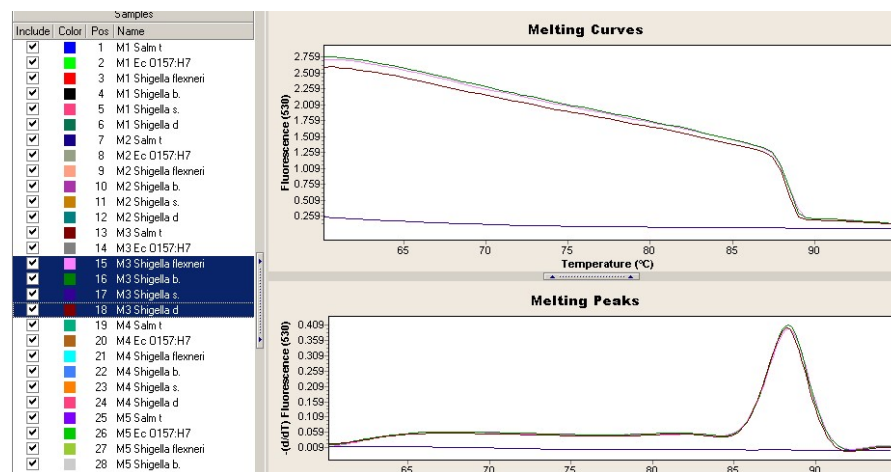


Figura 31. Detección de *Shigella* spp. utilizando los primers ipa4 e ipa3. Se observa que en los controles negativos (DNA de *Salmonella* y *Escherichia coli*) no hubo amplificación, por lo que permitiría una buena discriminación de *Shigella* spp y *Escherichia coli*.

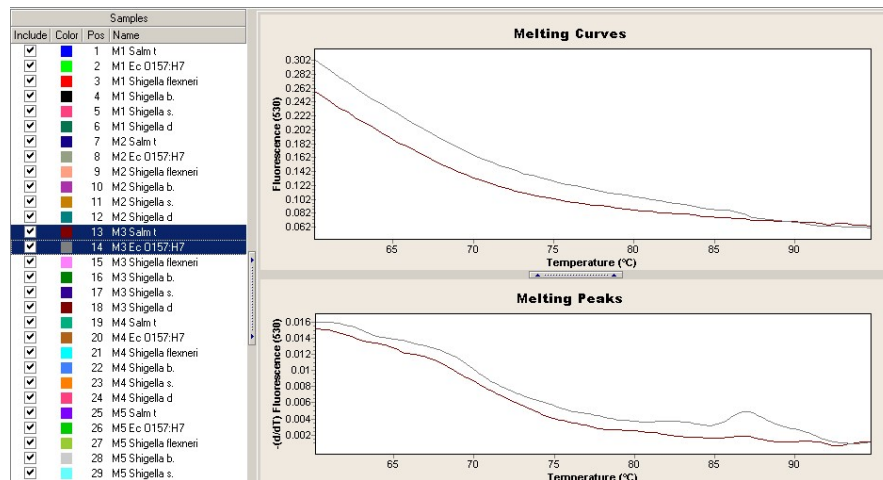


Figura 32. En los controles negativos no se aprecian picos melting ni Curvas melting.

8.9. Ajuste de reacciones de PCR en formato multiplex para la detección simultanea de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. enterica y *Listeria monocytogenes*.

Se realizó un ajuste en la concentración de oligonucleótidos, así como en el ajuste de ciclo y cambio de temperatura inicial en el paso de Curvas melting.

Dicho ajuste se realizó por datos que se obtuvieron en controles negativos, y que se consideraban interferentes en la técnica de PCR multiplex. Algunos de ellos pueden observarse en la siguientes figuras:

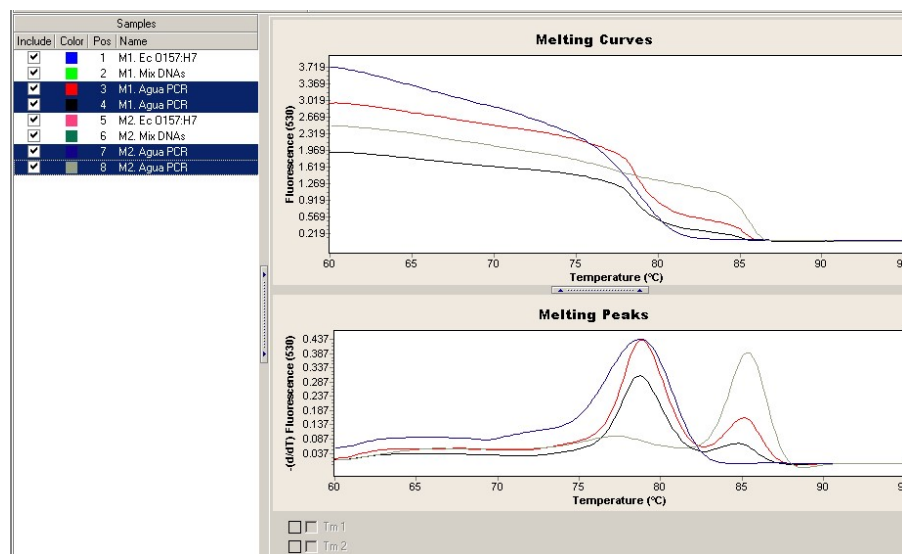


Figura 33. Se observan resultados de controles negativos, los cuales presentan Curvas melting y picos melting, que son resultado, al parecer, de la contaminación de las muestras de DNA. Sin embargo, en otras pruebas se demostró que realmente era dimerización.

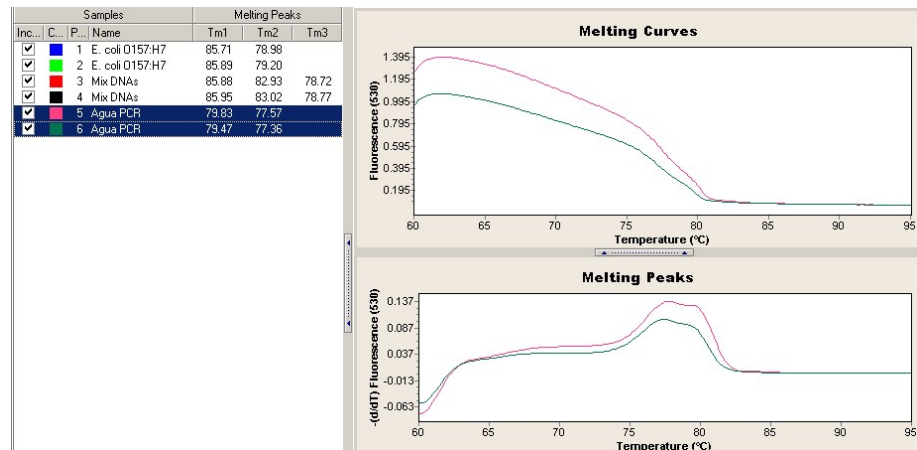


Figura 34. Reacción de PCR multiplex. Controles negativos que contenían agua grado PCR. Los controles negativos que parecen presentar una contaminación con DNA de *Listeria monocytogenes* presentan al parecer un problema de dimerización.

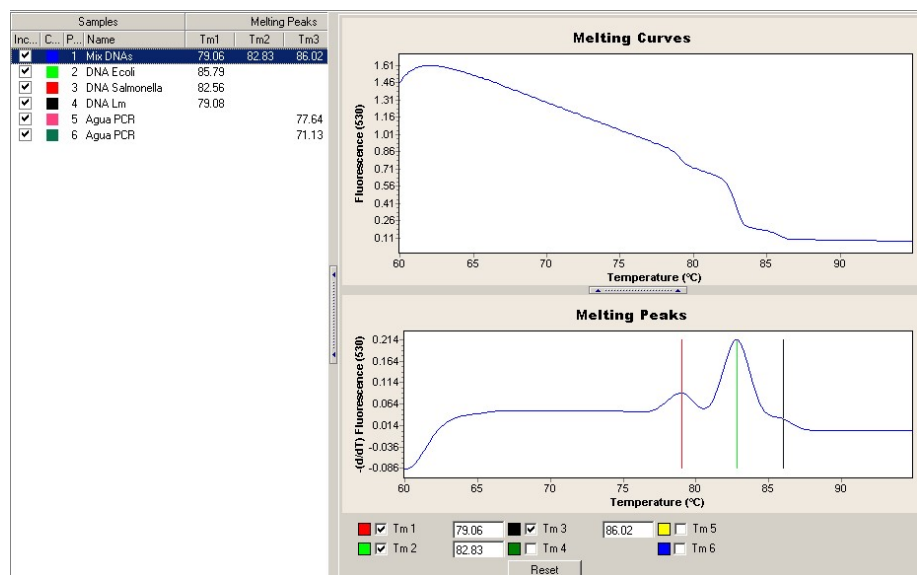


Figura 35. Se observan los resultados de una muestra que contenía DNA de *Escherichia coli*, *Salmonella thypimurium* y *Listeria monocytogenes*. La curva correspondiente a *Escherichia coli* se muestra muy tenue, lo que hace que se pierda sensibilidad en la técnica.

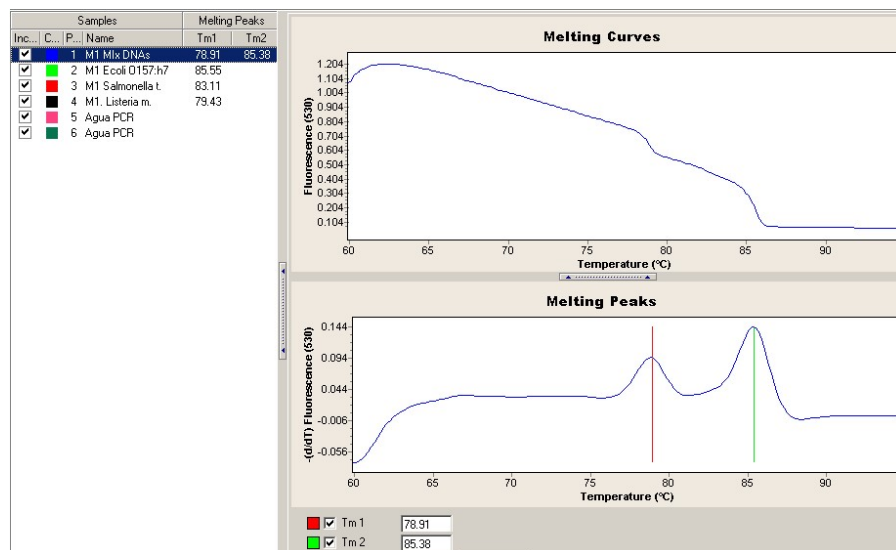


Figura 36. Resultados de una muestra que contenía DNA de *Escherichia coli*, *Salmonella thypimurium* y *Shigella spp.* No se observa amplificación para *Salmonella thypimurium*, ya que no hay cambio en las Curvas melting y no se observa pico melting.

En el ajuste de concentraciones de oligonucleótidos se obtuvieron datos variados. Del análisis de estos resultados y revisando las deducciones obtenidas en el análisis bioinformático, se encontró que las curvas obtenidas en los controles negativos correspondían a la formación de dímeros, derivado de esto también se decidió modificar el programa de reacción. El programa utilizado para la validación fue el siguiente:

Tabla 41. Programa de PCR utilizado en la reacción de PCR

Modo Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo de incubación	Modo Adquisición
Pre incubación					
Ninguno	1		95°C	5 min	Ninguno
Amplificación					
Cuantificación	34	Desnaturalización	95°C	10 s	Ninguno
		Alineamiento	60°C	10 s	Ninguno
		Extensión (*)	72°C	10 s	Solo
Melting Curve					
Melting Curve	1	Desnaturalización	95°C	0 s	Ninguno
		Alineamiento	70°C	10 s	Ninguno

		Melting	95°C Rango de rampeo= 0.1°C/sec	0 s	Continuo
Enfriamiento					
Ninguno	1		40°C	30 s	Ninguno

8.10. Validación de la técnica

Se determinaron los parámetros por patógeno, por lo que se obtuvieron resultados de cada uno. Se utilizó la tabla de contingencia descrita en la metodología. Dicha tabla fue la siguiente:

Tabla 42. Tabla de contingencia de los resultados obtenidos

Resultado de la prueba	Valor de la característica - <i>Escherichia coli</i>		
	Presente	Ausente	
Positivo	VP	FN	C= VP+FN
Negativo	FP	VN	D= FP+VN
TOTAL	A= VP+FP	B= FN+VN	E= VP+FN+FP+VN

Tabla 43. Tabla de contingencia de los resultados obtenidos de *Escherichia coli*.

Resultado de la prueba	Presente	Ausente	
Positivo	32	0	32
Negativo	0	27	27
TOTAL	32	27	59

Tabla 44. Tabla de contingencia de los resultados obtenidos de *Salmonella thypimurium*.

Resultado de la prueba	Presente	Ausente	
Positivo	32	0	32
Negativo	1	26	27
TOTAL	33	26	59

Tabla 45. Tabla de contingencia de los resultados obtenidos de *Listeria monocytogenes*.

Resultado de la prueba	Presente	Ausente	
Positivo	32	0	32
Negativo	0	27	27
TOTAL	32	28	59

Los parámetros obtenidos de los patógenos se muestran en las tablas siguientes:

Tabla 46. Sensibilidad. Se muestra la formula y el resultado de sensibilidad.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Sensibilidad	100%	100%	100%

Tabla 47. Especificidad. Se muestra la formula y el resultado de la especificidad.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Especificidad	100%	96.3%	100%

Tabla 48. Repetitividad. Se muestra la formula y los resultados de repetitividad

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Repetitividad	100%	98.3%	100%

Tabla 49. Reproducibilidad. Se muestran los datos de repetitividad de cada analista y el resultado de reproducibilidad del método.

Analista 1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Repetitividad	100%	100%	100%
Analista 2	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Repetitividad	100%	96.3%	100%

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Reproducibilidad	100%	96.3%	100%

Tabla 50. Límite de detección. El límite de detección se determinó mediante una serie de diluciones de muestra, calculando el mínimo alrededor de 1 ng/μL en la muestra. Se obtuvieron curvas y picos de melting adecuados en la dilución con 0.83 ng/μL

Límite de detección ng/μL en la reacción	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
	0.083	0.083	0.083

Tabla 51. Probabilidad de verdaderos positivos (PVP). Se observa el resultado de probabilidad de verdaderos positivos.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
PVP	100%	96.96%	100%

Tabla 52. Probabilidad de verdaderos negativos (PVN). Se observa el resultado de probabilidad de verdaderos negativos.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
PVN	100%	100%	100%

Tabla 53. Tasa de falsos positivos (TFP) Se observa el resultado de Tasa de Falsos positivos.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
TFP	0%	3%	0%

Tabla 54. Tasa de falsos negativos (TFN). Se observa el resultado de probabilidad de verdaderos positivos.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
TFN	0%	0%	0%

Tabla 55. Eficiencia del método. Se observa el resultado de eficiencia del método.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella thypimurium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Eficiencia del método	100%	98.3%	100%

En cuanto a la selectividad del método, se utilizaron 25 cepas, cabe mencionar que contar con una más amplia gama de cepas podría mejorar la medición de este parámetro, ya que se lograría cubrir tanto selectividad como exclusividad del método. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas y figuras.

Tabla 56. Tabla de contingencias de la medición de la selectividad.

Resultado de la prueba	Presente	Ausente	
Positivo	18	1	19
Negativo	0	7	7
TOTAL	18	8	26

Tabla 57. Selectividad. La selectividad del método es mostrada en la siguiente tabla

	General
Selectividad	100%

Las curvas y picos melting obtenidos en la determinación de este parámetro fueron las siguientes:

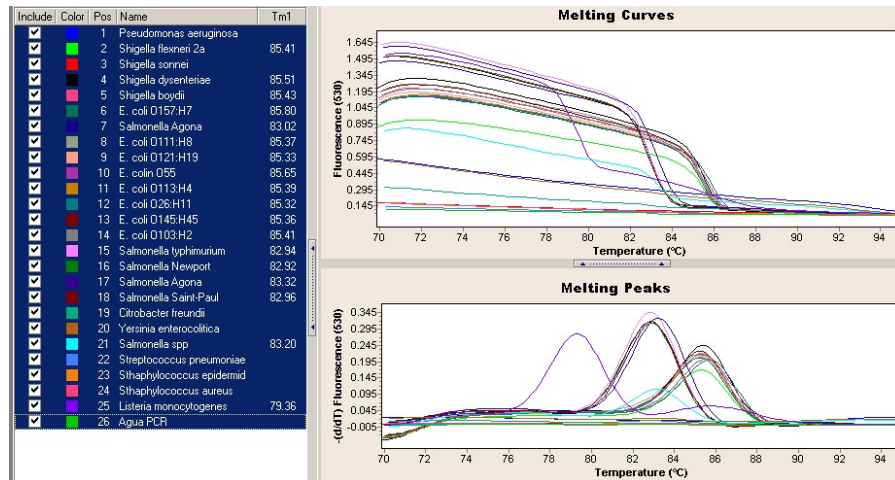


Figura 37. Resultados obtenidos en la medición de la prueba de selectividad. Se aprecian las curvas y picos melting del total de las reacciones realizadas.

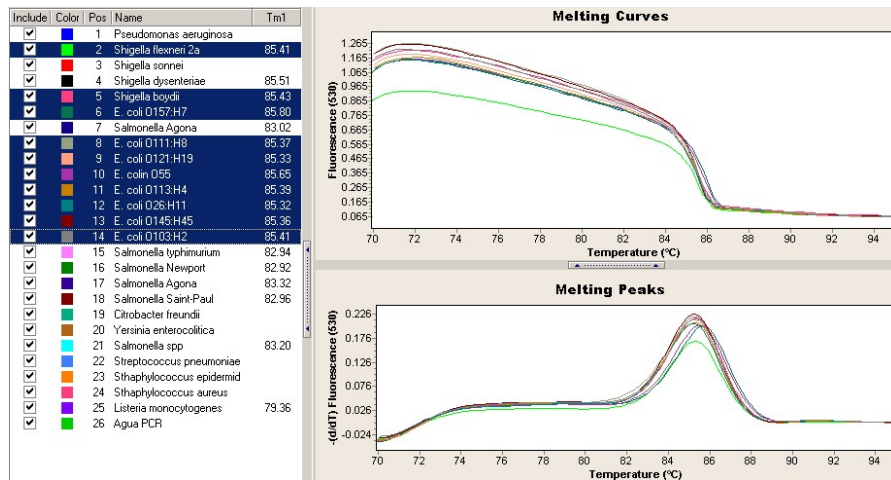


Figura 38. Resultados obtenidos de *Escherichia coli-Shigella spp.* Se observan las curvas y los picos melting de muestras de *Escherichia coli* y *Shigella pp*, las cuales resultaron ser positivas.

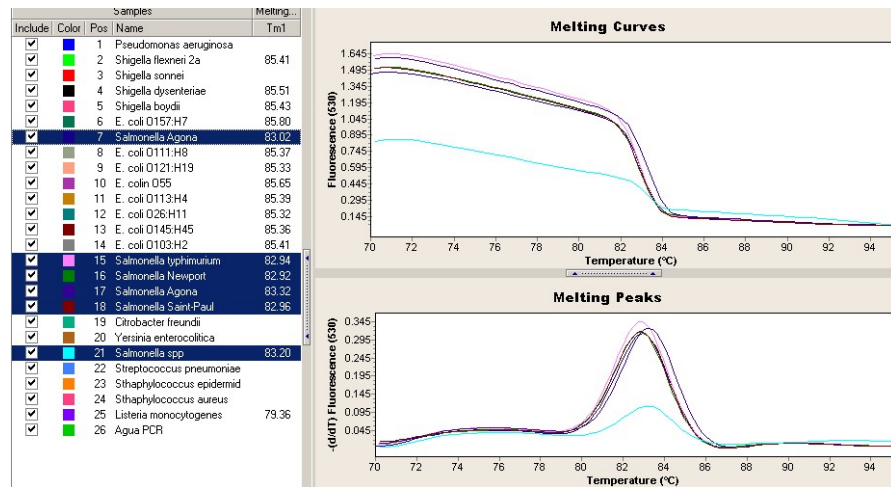


Figura 39. Resultados de muestras de *Salmonella*. Se aprecian las curvas y los picos melting de las muestras referentes a *Salmonella*.

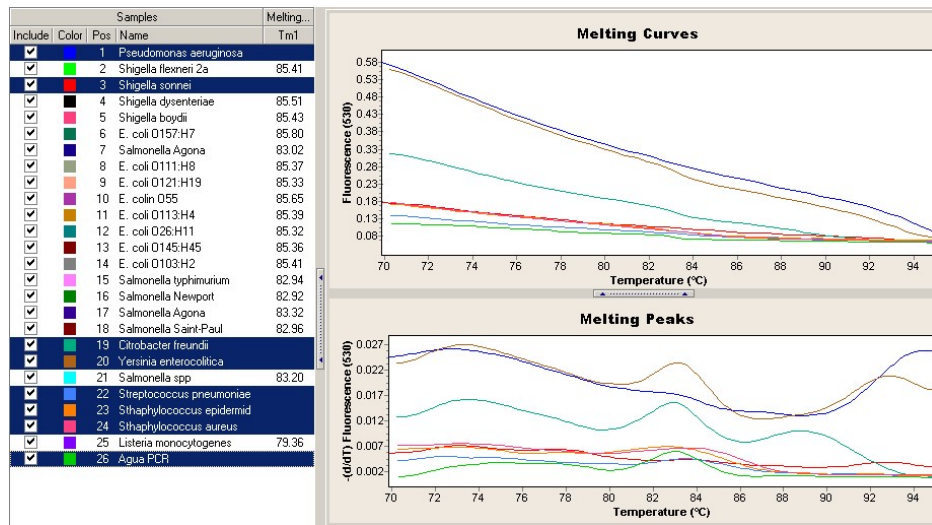


Figura 40. Resultados de muestras no diana. En la presente imagen se aprecian los picos y curvas melting de las muestras no diana.

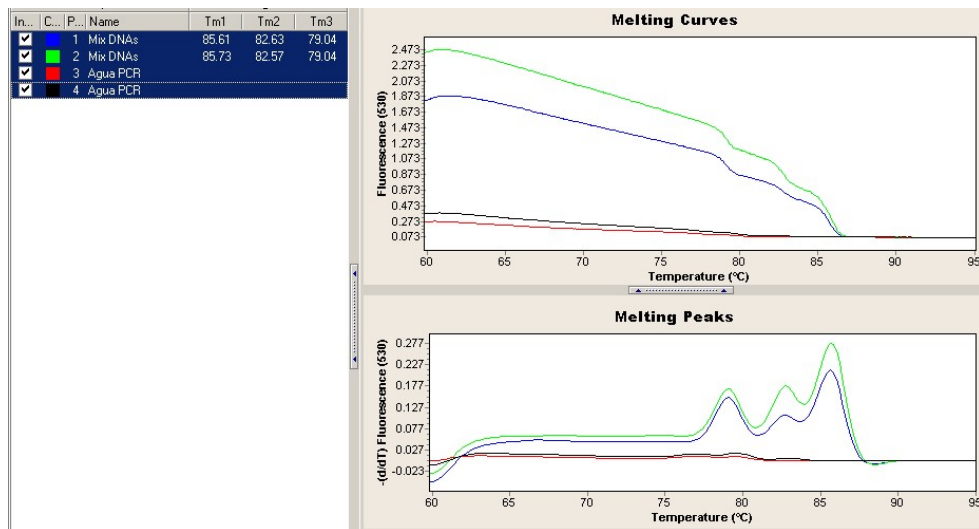


Figura 41. Resultados de una reacción de PCR multiplex. Se muestran las curvas definidas de cada patógeno.

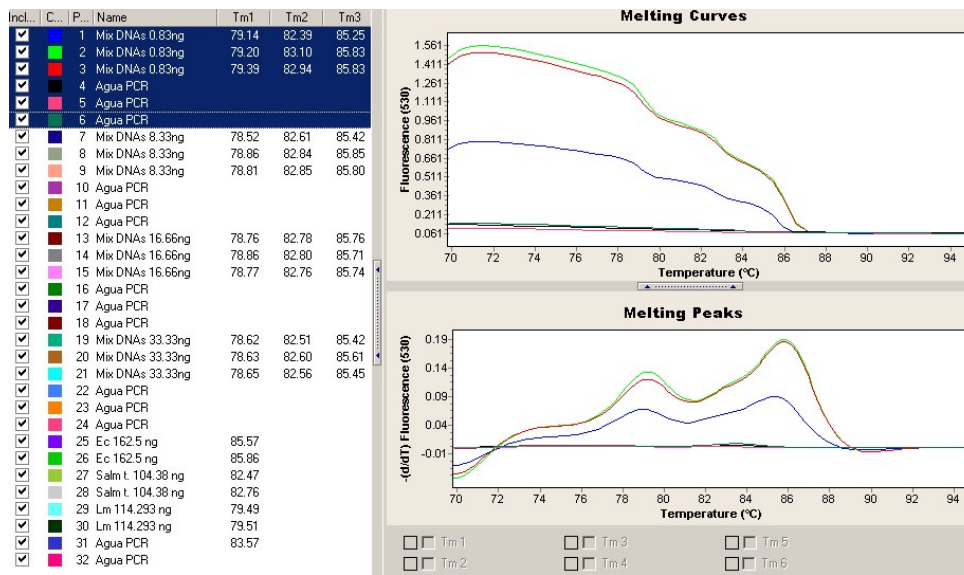


Figura 42. Reacciones de PCR multiplex de la mezcla de DNA's que contenían por patógeno una concentración de DNA de 0.83 ng/μL en la muestra. A pesar de que los picos melting no se encuentran tan definidos, observando las curvas melting se aprecia una línea descendiente en forma escalonada.

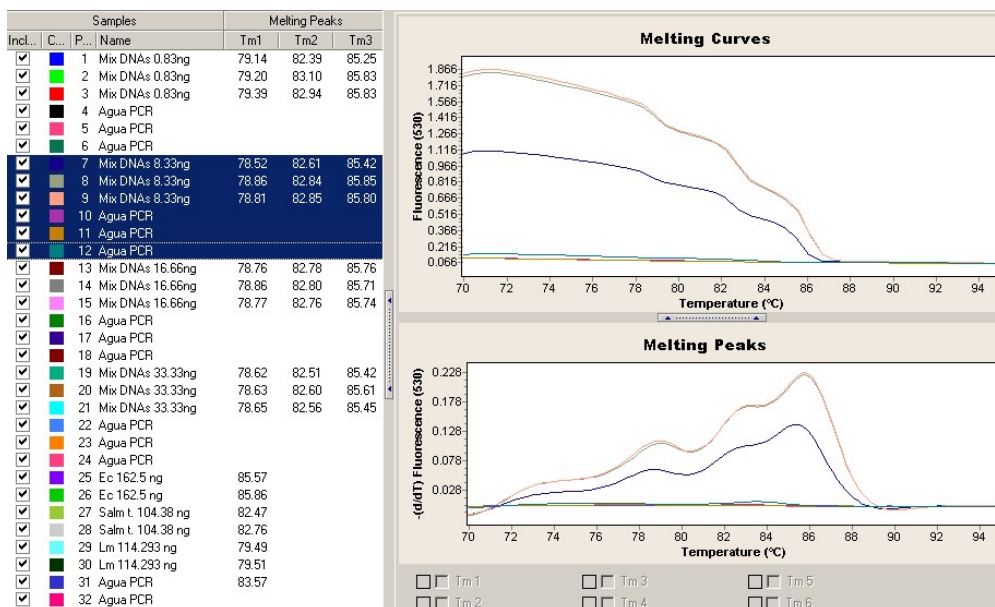


Figura 43. Reacciones de PCR multiplex de la mezcla de DNA's que contenían por patógeno una concentración de DNA de 8.33 ng/μL en la muestra. En la figura se muestra definidos los picos melting y las curvas melting

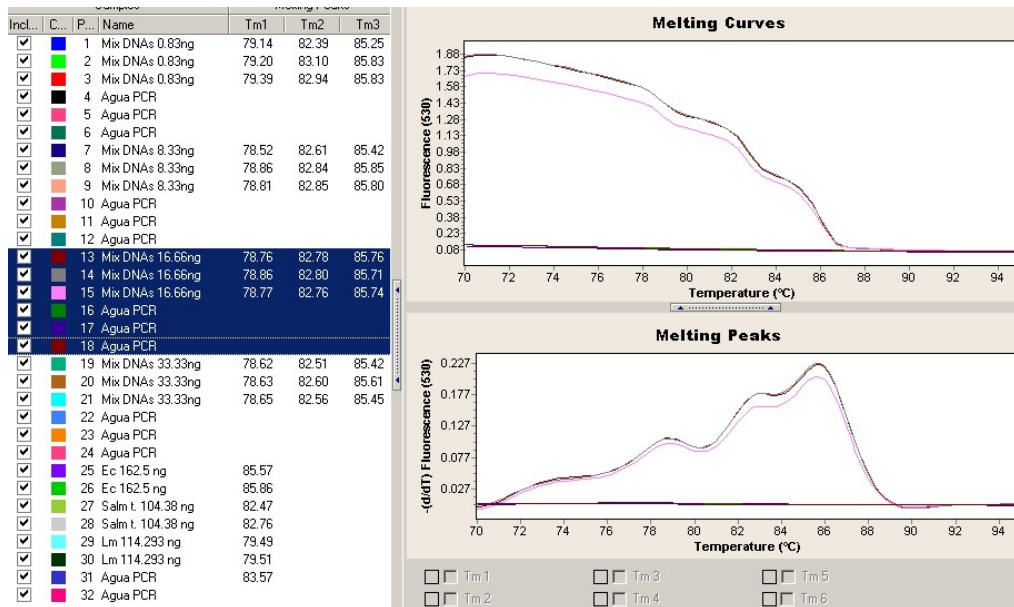


Figura 44. Reacciones de PCR multiplex de la mezcla de DNA's que contenían para cada patógeno, una concentración de DNA de 16.66 ng/μL en la muestra. En la figura se muestra definidos los picos melting y las curvas melting

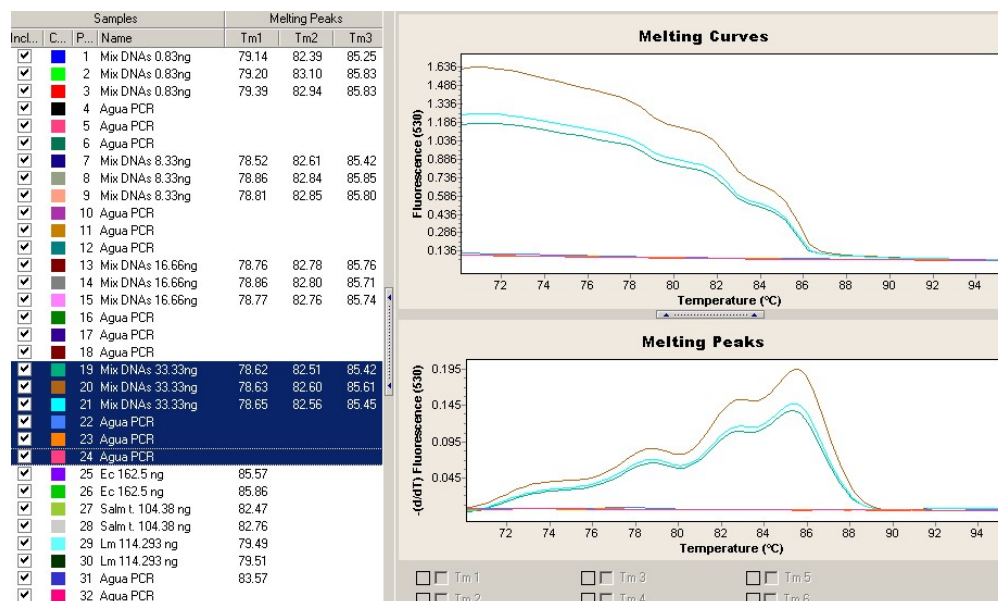


Figura 45. Reacciones de PCR multiplex de la mezcla de DNA's que contenían por patógeno una concentración de DNA de 33.33 ng/μL en la muestra. En la figura se muestra definidos los picos melting y las curvas melting

9. DISCUSIÓN

Al iniciar con el proceso de estandarización y validación, como primera medida se determinó si las temperaturas de los picos y curvas melting variaban al menos 3°C. Los resultados fueron satisfactorios, ya que sí presentaban una variación en la temperatura y era fácilmente distinguir un resultado positivo para estos patógenos. En cuanto a los oligonucleótidos utilizados, un par de ellos detectan a *Escherichia coli* genérica y a *Shigella* spp, por lo que se buscaron más oligonucleótidos para la discriminación entre *Escherichia coli* patogénica y *Escherichia coli* no patogénica y la discriminación de *Shigella* spp y *Escherichia coli*.

La técnica de detección de PCR fue estandarizada y validada, cabe mencionar que durante este proceso se presentaron problemas como la formación de dímeros entre los oligonucleótidos, los cuales interferían en los controles negativos y originaban falsos positivos. Para la eliminación de estos dímeros se realizaron modificaciones en la concentración de oligonucleótidos y una modificación en el programa de PCR (concretamente en el número de ciclos y la temperatura inicial del análisis melting).

Una vez estandarizada la técnica, se procedió con la validación, que permitió determinar que la técnica de PCR es adecuada para el uso previsto. Cabe mencionar que para el parámetro de "Selectividad" faltó poder contar con al menos unas 30 cepas más, sin embargo, la selectividad teórica demostró que el método es selectivo salvo para *Listeria monocytogenes*, por lo que se recomienda que para casos positivos de *Listeria monocytogenes* debe realizarse una confirmación mediante una genotipificación o pruebas bioquímicas.

10. CONCLUSIONES

Se implementó y validó el método para la detección simultánea de *Escherichia coli-Shigella* spp, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. En cuanto a la diferenciación de *Shigella* spp y *Escherichia coli*, se implementó solamente el método para diferenciación de *Shigella* spp y el método para la detección de *Escherichia coli* productora de las toxinas shiga. Durante este proceso, se determinó la influencia de la concentración de magnesio en la reacción, la cual es de vital importancia por lo que se concluye que para llevar a cabo las reacciones de PCR multiplex en esta técnica, la concentración óptima es de 2.5 mM. En la estandarización se logró reducir el volumen de reacción de PCR. El Kit de LightCycler Fast Start DNA master

mix recomienda realizar una reacción de 20 µL, para este proyecto se realizaron reacciones de PCR de 10 µL, obteniendo resultados satisfactorios.

Se validó un método para el fin previsto, capaz de detectar *Escherichia coli-Shigella spp*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, se realizó la confirmación de resultados positivos para *Escherichia coli-Shigella spp*, diferenciándose *Escherichia coli* patógena con la detección de las toxinas Shiga y se discriminó *Shigella spp* de *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos en la validación del método fueron los siguientes:

- **Sensibilidad:** 100% para *E. coli-Shigella*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*.
- **Especificidad:** 100% *E. coli-Shigella* y *Listeria monocytogenes*, para *Salmonella spp* fue de 96.3%
- **Repetitividad:** 100% *E. coli-Shigella* y *Listeria monocytogenes*, para *Salmonella spp* fue de 98.3%
- **Reproducibilidad:** Para el caso de *E. coli-Shigella* y *Listeria monocytogenes*, no existe diferencia alguna, por lo que se consideró un método reproducible. En el caso de *Salmonella spp*, existió una diferencia entre repetitividad del 3.7%; a pesar de esta diferencia se considera el método como “Reproducible”
- **Límite de detección:** El límite de detección fue de 0.83 ng/µL por muestra
- **Probabilidad de Verdaderos Positivos:** 100% *E. coli-Shigella* y *Listeria monocytogenes*, para *Salmonella spp* fue de 96.96%.
- **Probabilidad de Verdaderos Negativos:** 100% *E. coli-Shigella*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp*.
- **Tasas de falsos positivos:** 0% *E. coli-Shigella* y *Listeria monocytogenes*, para *Salmonella spp* fue de 3.7%.
- **Tasa de falsos negativos:** 0%
- **Eficiencia del método:** 100% *E. coli-Shigella* y *Listeria monocytogenes*, para *Salmonella spp* fue de 98.3%
- **Selectividad:** Para la medición de este parámetro se utilizaron 26 cepas, cabe mencionar que hicieron falta más cepas: al menos 20 más para el estudio de inclusividad y 30 más para el de exclusividad. De las cepas utilizadas, ninguna presentó reacción cruzada, por lo que fue selectivo al 100%. Se realizará la gestión de una gama más grande de cepas para determinar una mejor selectividad.

Para considerar un resultado verdaderamente positivo, las curvas melting deben observarse en el caso de *E. coli-Shigella* en $85^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para el caso de *Salmonella* spp. en $83^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y para el caso de *Listeria monocytogenes* en $79^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Se concluye que el método puede ser utilizado para la detección de *E. coli-Shigella*, *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*. En caso de resultados positivos de *E. coli-Shigella* se deberá realizar una confirmación con los métodos propuestos en el presente trabajo, donde uno realiza la discriminación de *Shigella* de *E. coli* y el otro método realiza la detección de *E. coli* productora de las toxinas Shiga. Se recomienda de forma adicional que para el caso de *Listeria monocytogenes* se realicen pruebas bioquímicas o una genotipificación con pruebas de PCR, buscando una gran gama de genes de virulencia relacionados con *Listeria monocytogenes*.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Asociación española de Normalización y Certificación (AENOR). 2003. Protocolo para la validación de métodos alternativos. Norma española EN-ISO-16140:2003; Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. 74: 14-177
- Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J. y Roosens, N.H.. 2013. Development and validation of qualitative SYBR®Green Real-Time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 4021-4037
- Blanco, M., E. Blanco, J., Mora, A., Rey, J., M. Alonso, J., Hermoso, M., Hermoso, J., P. Alonso, M., Dahbi, G., A. Gonzales, E., I. Bernárdez, M. y Blanco J. 2003. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolate from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(4): 1351-1356.
- Camaró, M., Catalá, V., Gimeno, C., Martínez, R. y Olmos, P. 2013. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 48, pp. 27-30.
- Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia. 2009 Enfermedades diarreicas agudas – prevención, control y tratamiento, pp 12-16.
- Clark, M.F. y Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-

linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.

- FDA (US Food and Drug Administration), 2011. Bacteriological analytical manual. Washington (DC). <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114664.htm>.
- Feng, P., Weagan, S.D. y Jinneman, K. 2011. Diarrheogenic *Escherichia coli*. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>
- González-Escalona, N., Hammack, T.S., Russell, M., Jacobson, A.P., De Jesús, A.J., Brown, E.B. y Lampel, K.A.. 2009. Detection of live *Salmonella* sp. cells in produce by a TaqMan-bases quantitative reverse transcriptase Real-Time PCR targeting *invA* mRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 3714-3720.
- Levesque, C.A. 1997. Molecular detection tools in integrated disease management: overcoming current limitations. *Phytoparasitica* .25: 3-7.
- Lizcano, L.F. 2005. Análisis de ácidos nucleicos con amplificación. En: *Fundamentos moleculares en medicina*. Universidad de la Sabana. Manual Moderno. Colombia. 309 p.
- Miller, S.A. y Martin, R.R. 1988. Molecular diagnostic of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*. 26: 409-432.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., Magnani, M. 2009. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Food Microbiology*, 26: 615-622.
- Peña, I., López, D., Batista, L., Torres, M.C. y León, Y. 2006. Validación de la técnica de inmunoimpresión ELISA indirecta para el diagnóstico del virus de la tristeza de los cítricos. *CitriFrut*, 23 (2): 25-31
- Phantouamath, B., Sithivong, N., Insisiengmay, S., Ichinose, Y., Higa, N., Song, T. e Iwanaga, M. 2005. Pathogenicity of *Shigella* in healthy carriers: a study in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 58: 232-234.
- Rosales V.I.M. 2002. Diagnóstico de enfermedades en plantas: Uso de herramientas moleculares. *Actualización técnica y generación de redes de colaboración para el*

desarrollo de proyectos comunes en fitopatología. 14 p.

<http://es.scribd.com/doc/112435547/Biotecnologia-en-Diagnostico-Enfermedades>

- *Sánchez, Del Ángel, Luz, S., Gálvez, González, Cesar, O.* 2011. Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Comisión Federal para la Protección Contra Riesgo Sanitario (COFEPRIS). 23: 3-14.
- *Terragno, R., Caffer, M.I. y Binsztein, N.* 2007. Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Shigella* sp. Centro Regional de Referencia del WHO Global SalmSurv para América del Sur 1 y 2: 5-12.
- *Vencia, W., Nogarol, C., Bianchi, D., Gallina, S., Zuccon, F., Adriano, D., Gramaglia, M & Decastelli, L.* (2014). Validation according to ISO 16140:2003 of a commercial real-time PCR-based method for detecting *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 177, pp.78-80.