



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO

Informe final de investigación previo a la obtención del título de Licenciado en Ciencias de la Salud en Laboratorio Clínico e Histopatológico

TRABAJO DE TITULACIÓN

Patrón de bandas en *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* aisladas en productos agrícolas y aguas de riego

Autores: Carla Paola Melendrez Toaza
Jhonny Estalyn Urquizo Aguiar

Tutora: Mgs. María del Carmen Cordovéz Martínez

Riobamba - Ecuador

2021

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título Patrón de bandas en *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* aisladas en productos agrícolas y aguas de riego dirigido por la Dra. María del Carmen Cordovéz Martínez, finalizada la defensa oral y verificado el informe final escrito del proyecto de investigación con la finalidad de graduación comprobado el cumplimiento de la investigación realizada, refiere lo siguiente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Mercedes Balladares Saltos
Presidente del Tribunal


.....
Firma

Mgs. Eliana Elizabeth Martínez Duran
Miembro del Tribunal


.....
Firma

Mgs. Félix Falconí Ontaneda
Miembro del Tribunal


.....
Firma

CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, María del Carmen Cordovéz Martínez, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: Patrón de bandas en *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, propuesto por el Sr. Urquiza Aguiar Jhonny Estalyn, egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 31 de mayo de 2021



.....
Dra. María del Carmen Cordovéz Martínez
Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, María del Carmen Cordovéz Martínez, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: Patrón de bandas en *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, propuesto por la Srta. Carla Paola Melendrez Toaza, egresada de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 31 de mayo de 2021



.....
Dra. María del Carmen Cordovéz Martínez
.Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Investigación, corresponde únicamente a: Carla Paola Melendrez Toaza y Jhonny Estalyn Urquizo Aguiar el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



.....
Carla Paola Melendrez Toaza
CI: 175336895-8



.....
Jhonny Estalyn Urquizo Aguiar
CI: 060486669-9

AGRADECIMIENTO

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Nacional de Chimborazo por su formación académica, a la Facultad Ciencias de la Salud y en especial a la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico por haberme permitido cumplir mis sueños. A los docentes que se han convertido en pilares fundamentales para forjarme como mejor persona profesionalmente. A mi tutora María del Carmen Cordovéz Martínez por su predisposición para poder culminar mi proyecto.

Carla Paola Melendrez Toaza

Agradezco infinitamente a mis padres por brindarme su apoyo incondicional en toda mi vida estudiantil, a la Universidad Nacional de Chimborazo por ser nuestra alma mater, la cual me abrió sus puertas para poder formarme académicamente. También agradecer a cada uno de los docentes por compartirme sus conocimientos, responsabilidad, paciencia, motivación y sobre todo el saber valorar el estudio, todos estos han sido aspectos fundamentales para mi formación como profesional fundamentado en la ética.

Jhonny Estalyn Urquizo Aguiar

DEDICATORIA

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, por brindarme salud, sabiduría para seguir adelante, a mis padres María (+) y Gerardo, por poder cumplir mis sueños, a mis hermanos Cristhian y Tania que me dieron su apoyo y confiaron en mí, los cuales me han formado con su ejemplo y enseñanza, por dedicarme el tiempo y esfuerzo y estar presente ante las adversidades, a mi abuelito por sus consejos, mis tíos y a todas las personas que me guiaron en cada paso que daba hacia la culminación de mis estudios.

Carla Paola Melendrez Toaza

La realización de este proyecto de investigación va dedicada en primer lugar a Dios, por haberme permitido cumplir uno de mis objetivos. A mis amados padres quienes siempre me brindaron lo mejor de ellos y un hogar ejemplar, gracias por su amor, cuidado para seguir con mis estudios universitarios ayudándome así a ejecutar este logro. A toda mi familia quienes me acompañaron en todo momento y quienes me dan ánimos para seguir adelante en mi vida profesional, y darme su cariño incondicional.

Jhonny Estalyn Urquizo Aguiar

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	¡Error! Marcador no definido.2
Estrategia de búsqueda	¡Error! Marcador no definido.3
Población y muestra	123
Criterios de inclusión y exclusión	124
Diagrama de flujo	¡Error! Marcador no definido.5
CAPÍTULO III. DESARROLLO	¡Error! Marcador no definido.
Patrón de bandas en <i>Aeromonas</i>	¡Error! Marcador no definido.7
Patrón de bandas en <i>Plesiomonas shigelloides</i>	24
CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	30
ANEXOS	36

RESUMEN

Esta investigación fue realizada mediante revisión bibliográfica, proponiendo como objetivo analizar el estudio del patrón de bandas genéticas obtenidas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, lo que permitió la diferenciación genotípica intraespecífica. Considerando que las infecciones gastrointestinales son enfermedades que afectan al ser humano de manera muy frecuente, siendo importante la identificación de estas bacterias por medio de cebadores que permitan la amplificación de fragmentos de genes para el reconocimiento de las mismas. Por tanto, el aporte y producción de conocimiento acerca de nuevas metodologías innovadoras es de gran relevancia ya que es un punto de partida a investigaciones futuras en microbiología y biología molecular; en lo que respecta a productos de consumo humano. El presente estudio se basó en un diseño de investigación documental de tipo retrospectivo, logrando en el proceso de revisión hallar 103 artículos científicos, por medio de los criterios de inclusión y exclusión, fueron seleccionados un total de 25 artículos, los cuales se encuentran en los idiomas español e inglés, localizados en Scopus, SciELO, Pubmed, Npunto, Unam; siendo recolectados de un periodo de 10 años de antigüedad. Concluyendo la investigación, seguido del análisis y discusión de los distintos autores sobre el tema, se logró el objetivo propuesto. Se recomienda realizar investigaciones de campo y experimentales relacionadas al tema debido a que en nuestro país existen pocas referencias bibliográficas sobre el mismo para disminuir enfermedades gastrointestinales producidas por *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides*.

Palabras claves

Aeromonas sp, *Plesiomonas shigelloides*, Amplificación aleatoria de ADN polimórfico, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Infecciones gastrointestinales.

Abstract

This research work was carried out through a bibliographic review, the objective proposed was to analyze the study of the pattern of genetic bands obtained by the Polymerase Chain Reaction in *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* isolated in agricultural products and irrigation waters, which allowed intraspecific genotypic differentiation. Considering that gastrointestinal infections are diseases that affect humans very frequently, it is important to identify these bacteria by means of primers that allow the amplification of gene fragments for their recognition. Therefore, the contribution and production of knowledge about new innovative methodologies is very relevant since it is a starting point for future research in microbiology and molecular biology; with regard to products for human consumption. This study was based on a retrospective documentary research design, 103 scientific articles were found in the review process, through the inclusion and exclusion criteria, a total of 25 articles were selected, which are in the Spanish and English languages, they were located in Scopus, SciELO, Pubmed, Npunto, Unam; they were gathered from 10 years ago. After the research was concluded, it was followed by the analysis and discussion of several authors on the subject, the proposed objective was achieved. It is recommended to carry out field and experimental research related to the subject because in our country there are few bibliographic references on it to reduce gastrointestinal diseases caused by *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides*.

Keywords: *Aeromonas* sp, *Plesiomonas shigelloides*, random amplification of polymorphic DNA, polymerase chain reaction, gastrointestinal infections.

Reviewed by:
Mgs. Geovanny Armas Pesántez
ENGLISH PROFESSOR
C.C. 0602773301

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las infecciones gastrointestinales se han vuelto muy frecuentes y son causas de visitas a los centros de salud, debido a que la población consume productos que son cosechados con aguas de riego, las mismas que contienen agentes patógenos que causan desequilibrio en la salud de las personas, afectando de gran impacto a zonas rurales debido a que sus ingresos económicos provienen de la agricultura.

No obstante, la agricultura es al mismo tiempo causa y víctima de la contaminación de las aguas de riego, debido a la descarga de contaminantes que se produce en ella, sedimentos en las aguas superficiales y subterráneas, que contaminan a su vez los cultivos y transmiten infecciones gastrointestinales a los consumidores y trabajadores agrícolas¹.

En México uno de los principales problemas de salud pública son las enfermedades gastrointestinales, transmitidas por el consumo de agua y alimentos contaminados por vía fecal-oral, donde la población infantil es considerada la más vulnerable².

Algunos microorganismos contaminan los alimentos desencadenando una serie de enfermedades intestinales en los individuos, por una mala manipulación de los productos con poca higiene a través de manos sucias, moscas, insectos, ratones, utensilios sucios. etc³.

Las bacterias se han existido en el planeta desde aproximadamente 3,500 millones de años, habitan en todos los ambientes acuáticos y terrestres las mismas se han adaptado a temperaturas muy altas al igual que a condiciones muy bajas, estas se encuentran en la piel y tracto digestivo del ser humano siendo causantes de enfermedades gastrointestinales y otras infecciones bacterianas⁴.

A mediados del siglo XX cuando la tecnología y la ciencia van en crecimiento gracias a las técnicas moleculares donde se ha desarrollado la secuenciación y parte de la microbiología tuvieron un gran avance. El microbiólogo estadounidense Carl Richard Woese describe métodos que facilitan la comparación de secciones de ácidos nucleicos y además permite

escoger en particular al gen que se encarga de la codificación del ARN, la misma que forma parte del ribosoma, dando lugar el gran inicio de la clasificación de las bacterias en sus grupos y familias, facilitando el reconocimiento e identificación de la población de bacteriana que habita en los diferentes medios globales⁴.

Las bacterias han desarrollado propiedades genéticas que les permiten ingresar al ambiente adherirse o colonizar, alcanzando las fuentes de nutrientes evitando la respuesta inmune y no inmunitaria del organismo hospedador⁵.

El género *Aeromonas sp* fue descrito por Sanarelli en el año de 1891, a mediados de los años 70, se englobaban dentro de dos grupos, en base a la temperatura de crecimiento, así como también la motilidad, la producción de pigmento en TSA o la producción de indol siendo así las siguientes:

- ✓ Cepas mesófilas (crecimiento óptimo a 35-37°C) responsables de diversas infecciones en humanos bajo el nombre de *A. hydrophila*.
- ✓ Cepas psicrófilas (crecimiento óptimo a 22-28°C) principalmente patógenas de peces e identificadas como *A. salmonicida*⁶.

Las *Aeromonas* son bacilo gramnegativo anaerobio facultativo, en este género se han descrito 14 especies de *Aeromonas*, en su mayoría se asocian a enfermedades gastrointestinales en el ser humano, siendo de importancia clínica *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas veronii biovariedad sobria*⁷.

Los miembros del género *Aeromonas* se encontraba con las especies *Vibrio* y *Plesiomonas shigelloides*, en la familia *Vibrionaceae*, por pruebas genéticas moleculares realizadas se decidió separar las *Aeromonas* como familia *Aeromonadaceae*, así mismo *Plesiomonas shigelloides* pasó a la *Enterobacteriaceae*⁷.

La familia *Enterobacteriaceae* y *Aeromonadaceae* se encuentran presentes como flora intestinal del hombre, pero además pueden estar en el agua y en el suelo. Las mismas producen varias infecciones, pero la más frecuente es la gastroentérica⁵.

El género *Aeromonas* se distingue de las enterobacterias a través de la prueba de oxidasa positiva (tetrametil-p-fenilenediamina-dihidrocloruro) cambiando a un color morado, las especies mesófilicas son móviles por los flagelos polares, además utilizan glucosa de forma fermentativa, la mayoría de este grupo son indol positivas⁷.

La clasificación de esta especie ha dependido de varios factores fenotípicos y genéticos bioquímicamente, que se refieren como fenoespecies mientras que las especies genéticamente diferentes se denominan grupos de hibridación, se determinan mediante pruebas de hibridación de DNA total, el género incluye en la actualidad 14 especies: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. encheleia*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*⁸.

Plesiomonas shigelloides es un bacilo gramnegativo móvil, recto, redondeado y corto con flagelos polares se encuentra de forma frecuente en las regiones tropicales y subtropicales especialmente en medios acuáticos y terrestres⁹. La gastroenteritis en los seres humanos causada por *Plesiomonas shigelloides* suele presentar síntomas como diarrea acuosa moderada sin presencia de sangre ni moco, en pacientes inmunosuprimidos se puede observar afecciones similares al cólera, colitis grave o neoplasias gastrointestinales⁷.

Este bacilo es fermentador de la D-glucosa como fuente principal de carbono y energía, se desarrolla en agar sangre de carnero y en la mayoría de los medios entéricos, las colonias miden en promedio 1,5 mm de diámetro, son grises, brillantes, lisas y opacas, su aislamiento es en agar MacConkey, desoxicolato, Hektoen y Xilosa-Lisina-Desoxicolato^{7,10}.

La bacteria *Plesiomonas shigelloides* es causante potencial de infecciones intestinales y extraintestinales debido a que el genoma contiene muchos genes del sistema de secreción macromolecular, genes de factores de virulencia y genes de resistencia¹¹.

Desde hace muchos años para la identificación de las bacterias partiendo de cepas aisladas se han empleado técnicas de biología molecular como la AP-PCR debido a que arrojan resultados con mayor especificidad y sensibilidad, por lo que utilizan patrón de bandas para llevar a cabo dicho procedimiento¹².

En el continente asiático, en Tailandia se realizó una investigación para evaluar la enteropatogenicidad de *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* en la cual se seleccionaron individuos viajeros estadounidenses con y sin diarrea, obteniendo como resultado el aislamiento de *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomonas shigelloides*. En los últimos años muchos científicos han publicado estudios asociados a casos diarreicos agudos graves en las que por efecto se observó los mismos microorganismos¹³.

En estudio realizado en Lima, Perú, analizaron 1867 muestras de heces diarreicas en niños durante 5 años, sembrando en medios selectivos y obtuvieron un 4% de *Aeromonas sp* y *Plesiomonas shigelloides* con 1,7%, demostrando que estas bacterias son causantes de cuadros diarreicos en muchas ocasiones¹⁴. Janda y colaboradores (2016) a través de estudios realizados aseveran que las enfermedades infecciosas de las especies de *Aeromonas* son agentes causales de diarrea, aunque los datos no son universales, por otra parte, Watson y Cois plantearon que la especie de *Aeromonas* producen infecciones intestinales son similares a otros patógenos entéricos, por adherencia de las bacterias a la mucosa intestinal⁹.

Las *Aeromonas* y *Plesiomonas* se pueden identificar a través de pruebas bioquímicas, basadas en reacciones químicas, sin embargo, este método no puede detectar la presencia de genes virulentos presentes en las cepas aisladas, de ahí la importancia de la PCR que es un método que permite la determinación del potencial patógeno de los genes, al amplificar los segmentos de ADN millones de veces en pocas horas, según estudio realizado por la universidad de Airlangga, Indonesia¹⁵.

Su aislamiento tradicionalmente se basa en pruebas bioquímicas, pero estos no son métodos eficaces para ser concluyentes por lo que es necesario realizar estudios epidemiológicos y moleculares.

El género *Aeromonas* ha sido explorada por el gen ARNr 16S permitiendo diferenciar los grupos taxonómicos debido a que estos genes contienen subunidades de ARN polimerasa además este proceso permite observar las discrepancias entre *A veronii* y *A media*, así como también la semejanza fenotípica entre *A veronii* y *A hydrophila* de acuerdo al estudio realizado en Dinamarca en muestras de pacientes con diarrea¹⁶.

En un estudio realizado en Brasil, Sao Paulo, demostró a partir de cepas de *Aeromonas* aisladas de heces de pacientes con diarrea, que el método PCR tiene una alta reproducibilidad y especificidad en la identificación genotípica de este género bacteriano; por lo que recomiendan esta técnica para el estudio fenotípico, diferenciación y clasificación de bacterias¹⁷.

Plesiomonas shigelloides es un agente patógeno en humanos sus cifras han incrementado en los últimos años, pueden ser desapercibidos por la falta de análisis de rutina lo que conduce a una identificación esporádica y ocasional de esta bacteria lo ideal es emplear el método PCR (LAMP) lo que emplea de 4 a 6 cebadores especialmente diseñados para esta bacteria y una polimerasa de ADN que desplaza la hebra para amplificar hasta 10 copias de ADN en condiciones isotérmicas, convirtiendo a este procedimiento una herramienta de valoración eficaz rápida y sencilla como menciona Shuang Meng y colaboradores¹⁸.

Con el objetivo de estudiar la prevalencia y variabilidad genética de *Plesiomonas shigelloides* de aguas superficiales de clima templado en la llanura de Panonia en la parte norte de Serbia y la parte sur de Hungría Milivoje Petrušić y colaboradores estudiaron muestras de lagos y ríos debido a que esta bacteria se encuentra con mayor frecuencia en regiones tropicales y es causante de enfermedades gastrointestinales. Su estudio se realiza mediante pruebas preliminares como tinción de Gram, oxidasa, catalasa, producción de indol, citrato, fermentación de carbohidratos todos estos métodos no son lo suficiente para su identificación por lo que se debe confirmar utilizando el método PCR con cebadores que estén diseñados para amplificar una determinada región de ARN de *Plesiomonas shigelloides*¹⁹.

Además, Milivoje Petrušić y colaboradores señalan que *Plesiomonas shigelloides* presenta una relevante variabilidad genética en su misma especie mediante la utilización de la técnica de RAPD-PCR con una diferencia de 649 pb fracciones amplificadas a 150 pb¹⁹.

Para evaluar la enteropatogenicidad intraespecifica de *Plesiomonas shigelloides*, Ekundayo²⁰ empleó métodos moleculares que le permitieron una mayor especificidad en su ensayo con muestras de agua del río Tyhume y Kat, en la provincia de Eastern Cape de Sudáfrica.

Existe mayor probabilidad de contraer enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), a través del consumo de alimentos y aguas contaminados, sobre todo en países de ingresos bajos y medianos, cuando no se cumplen las normas de higiene y existen condiciones inapropiadas en la producción y acopio de los productos, además de las fuentes de agua cuando no están protegidas para evitar la contaminación²¹.

En la Universidad Nacional de Chimborazo se investigaron bacterias de interés clínico en productos agrícolas con regadío del río Chibunga, en el cual se identificaron microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales, de los cuales se encontraron varios de la familia *Enterobacteriaceae* y entre estos la *Plesiomonas shigelloides*, además de un 12,5% perteneciente a la familia *Aeromonadaceae*²².

La técnica de PCR apareció en el año 1971, Gobind Khorana describió el método de la replicación de un fragmento de ADN empleando un par de iniciadores, sin embargo, Kary Mullis y sus compañeros la llevaron a cabo por primera vez en 1983, mientras realizaban la fabricación de oligonucleótidos para la secuenciación de ADN. Emplearon dos iniciadores con el objetivo de alinear con cada una de las hebras de ADN, en la cual adicionaron ADN polimerasa I de *Echerichia coli* y nucleótidos trifosfatados de ADN obteniendo como resultado la replicación de un fragmento de ADN flanqueado por los iniciadores²³.

Existen varias técnicas de biología molecular que permiten amplificar, detectar y secuenciar los ácidos nucleicos, la técnica más utilizada es la reacción en cadena de polimerasa (PCR), a través de la misma se ha logrado desarrollar diferentes modificaciones para mejorar el proceso de diagnóstico e interpretación. Dentro de estas se encuentra la PCR en tiempo real o cuantitativa, la RT-PCR, los microarrays y la secuenciación¹².

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica sensible y muy útil para lograr obtener in vitro millones de copias de una fracción de ácido desoxirribonucleico de secuencias específicas de ADN de una muestra compleja de ADN con un gran número diferencial de secuencias, a esta etapa se le denomina amplificación del ADN, para llevar a cabo este proceso, se requiere de la utilización de una enzima llamada Taq Polimerasa para garantizar una PCR exitosa^{23,24}.

La PCR es una técnica utilizada principalmente en el campo de la genética y la microbiología, entre otras, para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Los cebadores empleados en esta metodología son fragmentos cortos de ADN de cadena sencillas y en cada proceso se aplican dos, los mismos que sirven para flanquear la región blanca donde provoca la unión de las secuencias opuestas del molde de ADN en los extremos de la región a copiar, finalmente los cebadores se unen al molde mediante complementariedad de bases ^{25,26}.

Esta técnica comienza con la extracción del ADN, seguido de la preparación de la muestra, empleando el ADN molde, iniciadores, nucleótidos o dNTPs, solución amortiguadora, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), agua y ADN polimerasa. Para la amplificación las muestras son llevadas al termociclador, el mismo que está programado para llevar a cabo este proceso donde se realizan los siguientes pasos:

➤ Desnaturalización inicial, este paso se utiliza para separar la doble hélice debido a que los puentes de hidrógeno no se rompen fácilmente, la temperatura y el tiempo va de acuerdo a la característica del ADN y ADN polimerasa por lo general va entre 94 y 96°C entre 5-10 minutos quedando como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN²⁵

Los ciclos de la PCR son continuos para la desnaturalización, alineamiento y extensión estas secuencias son repetidas entre 25 y 35 series:

➤ La etapa de desnaturalización es fundamental para que el ADN molde complete su desnaturalización debe ser llevada a temperatura de 94°C durante 30 segundos a 1 minuto, si en el ADN existe un elevado contenido de guanina y citosina es recomendable elevar su periodo de tiempo o la temperatura.

➤ En el alineamiento al momento de bajar la temperatura de incubación los iniciadores se unen al ADN molde de manera específica a la parte que se requiera amplificar, la temperatura oscila entre 45 y 65 °C durante 30 segundos a 1 minuto, el aumento de temperatura o tiempo ayuda las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde.

➤ La extensión o elongación consiste en la formación de la nueva cadena de ADN partiendo del extremo 3' del iniciador por efecto del ADN polimerasa en la cual emplea como sustrato los cuatro dNTPs esta etapa se realiza a 72°C debido a que en esta temperatura la

taq polimerasa logra su máxima actividad, la taq polimerasa incluye de 500 a 1000 nucleótidos en el lapso de 1 minuto²⁵.

La extensión final dura un lapso de 5 minutos a 72°C para que la taq polimerasa termine de sintetizar completamente los fragmentos que pueden haber quedado incompletos²⁵.

El método más utilizado para evaluar si se consiguió una amplificación exitosa es mediante la visualización de la parte amplificada a través de electroforesis en geles de agarosa o acrilamida, si no se observa producto amplificado es recomendable cambiar la temperatura y concentraciones de los reactivos, además revisar el adecuado rendimiento del termociclador²⁵.

La técnica de microarrays está fundamentada en la hibridación de sondas que se unen a cadenas cortas de regiones precisas del ADN de las muestras analizadas, estas sondas emanan fluorescencia lo que se marcará en el analizador. Este método permite analizar en un mismo tiempo un gran número de secuencias de ácidos nucleicos que presenten patologías, este procedimiento es usado en la detección de bacterias patógenas transmitidas por alimentos²⁷.

La RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) se fundamenta en la amplificación aleatoria de ADN polimórfico, emplea marcadores moleculares para amplificar por PCR secuencias cortas de ADN polimórfico, en la que utiliza un cebador de secuencia corta (10-12 pares de bases). Consiste en obtener especies bacterianas partiendo de enzimas de restricción de secuencias cortas y concretas de ADN, gracias a variaciones en el RNA ribosomal 16S. Emplea bajas temperaturas de alineamiento (36°C) para asegurar la unión de secuencias en el genoma para lograr la amplificación de varios fragmentos de ADN. En microbiología se utiliza para establecer relación entre diferentes especies de bacterias²⁸.

La PCR con oligonucleótidos arbitrarios (AP-PCR) es una técnica de screening basada en la huella genética obtenida de la misma PCR para diferentes ADN, procedentes de distintas muestras, que pueden estar o no relacionadas, para esta variante se usa un primers el cual es desarrollado en bajas condiciones que beneficia a la amplificación de bandas inespecíficas, cuyas secuencias guarden cierta homología con el primer utilizado, el cual genera varios

fragmentos de DNA, que luego son selectivamente amplificados cuando se incrementa la temperatura²⁹.

Las muestras de PCR son colocadas en geles desnaturalizantes de acrilamida, seguidamente son secados y enviados para autorradiografía, se utilizan primers diferentes para obtener varias reacciones de AP-PCR, de tal manera se obtiene varia información cuanto mayor sea el número de bandas analizadas²⁹.

Los oligonucleótidos son largos su técnica consta de dos ciclos con baja astringencia (poco específicos) permitiendo la polimerización de fragmentos característicos de cada variedad, esta fase va seguida de ciclos de alta astringencia para amplificar (visualizar) específicamente las bandas anteriores, estos fragmentos amplificados se pueden migrar en un gel de agarosa para observar las diferencias entre especies³⁰.

La técnica RFLP se basa en la detección de fragmentos de DNA de diferente peso molecular (por digestión con la misma enzima de restricción) en diferentes organismos. Los fragmentos más fáciles de analizar son los pequeños derivados de la digestión del genoma de las mitocondrias o los cloroplastos, puesto que deleciones, mutaciones pueden variar significativamente el patrón de bandas provocando no ser identificados por electroforesis en geles de agarosa, donde migran de acuerdo con su peso molecular. En el estudio de moléculas de DNA de gran tamaño, como el DNA cromosómico, su patrón de bandas es más complejo por lo que es necesario utilizar sondas específicas para observar sólo algunos fragmentos³⁰.

Este método inicia con la extracción del ADN para posteriormente ser purificado, luego se trata con enzimas de restricción específicas para amplificar fragmentos de ADN de diferentes tamaños³⁰.

Los fragmentos de restricción son separados a través de electroforesis en geles de agarosa mediante el cual son distribuidos debido a un campo eléctrico y su disociación obedece a la masa o a la carga eléctrica de las muestras según la técnica utilizada. Posteriormente proporciona un patrón de bandas que es único para un ADN en particular debido a la diferencia en las secuencias del ADN³⁰.

La técnica LAMP (por sus siglas en inglés loop mediated isothermal amplification) es un método de amplificación de ácido nucleico isotérmico, que muestra una mayor sensibilidad y especificidad debido a una característica de amplificación exponencial, reconocida simultáneamente por distintos cebadores en la misma reacción, este ensayo utiliza un total de seis cebadores identificando sitios distintos de la secuencia. Para iniciar este procedimiento se emplea una polimerasa de ADN que desplaza las cadenas, mientras que dos cebadores forman estructuras de bucle que facilitan y aceleran las rondas de amplificación posteriores. Este método permite la detección de fragmentos de ADN y ARN en aproximadamente 1 hora, la reacción ocurre a una misma temperatura 60°C en forma continua³¹.

Los cebadores aleatorios son oligodesoxirribonucleótidos que se emplean para la preparación de sondas de ADN marcadas a partir de plantillas para hibridación por filtro o hibridación *in situ*, estos cebadores son aleatorios y precisos para la síntesis de ADN. Para evitar interferencia son conservados en un búfer de baja concentración de sal³².

Existen cebadores hexámeros aleatorios, estos se usan para cebar ADN o ARN monocatenario para la extensión por ADN polimerasas o transcriptasas inversas, en este proceso la generación de ADNc, el cebado brinda cobertura aleatoria a todas las regiones del ARN para preparar un conjunto de ADNc, esta contiene varias longitudes de ADNc. El cebado aleatorio es incapaz de distinguir entre ARNm y otras especies de ARN presentes en la reacción³³.

Los cebadores constan de 3 aspectos:

- 1) la sección 5' ADN equivalente en longitud y temperatura de fusión a un cebador PCR estándar, se extiende después de la división por la enzima RNasa.
- 2) una sola base RNA proporciona el sitio de separación para la RNAsa.
- 3) una extensión corta de 3' de cuatro o cinco bases seguida de un bloqueador evita la extensión por una polimerasa DNA hasta su eliminación³⁴.

Diversos estudios a nivel mundial basados en la técnica de PCR han reportado resultados exitosos en el aislamiento *Aeromonas sp* y *Plesiomonas shigelloides* de productos agrícolas y aguas de riego que están asociadas a enfermedades gastrointestinales.

En el país existen pocas referencias bibliográficas enfocadas a estudios moleculares de bacterias de importancia clínica, por esta razón se propone como problema investigar sobre el patrón de bandas en *Aeromonas sp* y *Plesiomonas shigelloides* aislados en productos agrícolas y aguas de riego. Esto permite brindar datos actualizados sobre el tema para así conocer y poder prevenir infecciones gastrointestinales provocadas por dichas bacterias.

De esta manera se profundiza en su conocimiento y se alerta a las poblaciones sobre el cuidado de los cultivos y como evitar la contaminación de las aguas de los ríos; dando cumplimiento al objetivo 6 del Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021: “Desarrollar las capacidades productivas y del entorno para lograr la soberanía alimentaria y el Buen Vivir rural”³⁵.

La finalidad del presente estudio es brindar información que pueda ser útil a la sociedad como al personal de la salud. Dicha investigación es posible de realizar porque se cuenta con recursos tecnológicos y humanos, además de bibliográficos; los que facilitarán los investigadores para la realización del mismo.

Siendo el objetivo del trabajo realizar una revisión bibliográfica sobre patrón de bandas genéticas de *Aeromonas sp* y *Plesiomonas shigelloides* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permita la diferenciación genotípica intraespecífica.

Por último, este trabajo se clasificará en secciones denominadas como capítulos en el cual en el capítulo I se encuentra una breve introducción, información relacionada a la temática. Seguidamente en el capítulo II se describe la metodología utilizada, en la que incluye tipo de estudio, técnica e instrumentos, estrategias de búsqueda, población, muestra, criterios de inclusión y exclusión. Finalmente, en el capítulo III se menciona el desarrollo y las respectivas conclusiones.

CAPÍTULO II.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio

El presente trabajo es una investigación de tipo documental, la cual se realizó mediante revisión bibliográfica empleando técnicas de búsqueda de información que implica observar y describir, a través de artículos científicos, bases de datos en los cuales se explica estrategias de estudio acorde a la temática mediante la indagación de investigaciones ya ocurridos las cuales son recopiladas para el desarrollo de la misma.

Para la redacción de este proyecto se utilizó un enfoque metodológico de carácter inductivo-deductivo, cualitativo, teórico-bibliográfico sobre Patrón de bandas en *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* aisladas en productos agrícolas y aguas de riego, la cual permite crear una base de conocimientos, metodologías científicas que implica la temática.

La técnica utilizada para la recolección de información fue la observación indirecta, debido a que se recolectó información de investigaciones y datos de diferentes autores que realizaron sus estudios en el pasado y plasmaron sus resultados en forma de artículos, entre otros.

Con respecto a las consideraciones éticas, se trabajó con todas las conductas y normas morales de la investigación bibliográfica, además se establece que no existe ningún tipo de conflicto bioético, debido a que no se utilizó ningún tipo de muestra para la realización del presente trabajo de investigación.

Esta investigación es descriptiva debido a los resultados obtenidos mediante el análisis de la información las cuales son sujetas a recopilación de datos estadísticos, explicativos de distintas fuentes bibliográficas (Scopus, SciELO, Npunto, Pubmed, Unam).

Estrategia de búsqueda

El presente trabajo es de metodología científica el cual implica criterios de búsqueda de información como lo fue en revistas, artículos científicos, base de datos (Scopus, SciELO, Unam, Pubmed, Npunto), los mismos se encuentran en diferentes idiomas (español, inglés) y cumplen con los criterios de inclusión y exclusión; lo cual permitió obtener resultados teóricos para el tema nombrado.

Para la búsqueda de información en todas las plataformas se usaron las palabras claves: “*Aeromonas sp*”, “*Plesiomonas shigelloides*”, “aguas de riego”, “enfermedades gastrointestinales”, “patrón de bandas genéticas”, “PCR”, “cebadores”, “primers”.

Conforme a la investigación y su recopilación de material bibliográfico se realizó un diagrama de flujo con la finalidad de categorizar, seleccionando todos los artículos científicos, revistas donde se explica de su inclusión o exclusión de la temática siendo parte primordial de la búsqueda los que fueron seleccionados como aporte para el desarrollo de esta investigación.

Población y muestra

La población estuvo conformada por 103 artículos científicos, los cuales hacían referencia al patrón de bandas en *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* aisladas en productos agrícolas y aguas de riego, publicados en revistas indexadas en bases de datos regionales y de impacto mundial entre las que se ubican SciELO, Npunto, Pubmed, Scopus y Unam; encontrados durante el periodo de búsquedas bibliográficas de entre los últimos diez años, para la realización del presente trabajo de investigación.

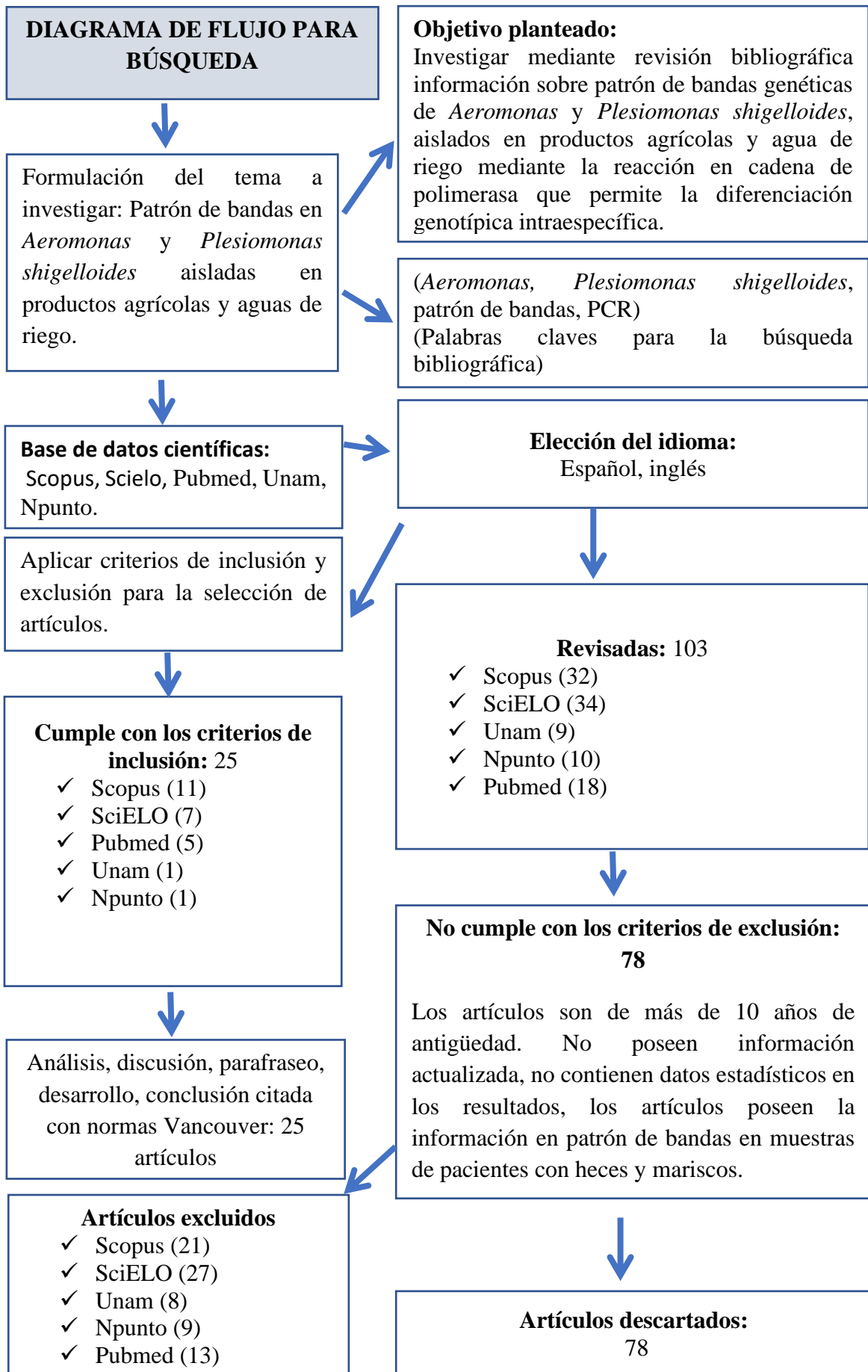
Mediante la aplicación de criterios de inclusión y exclusión, se seleccionó la bibliografía pertinente para la presente y quedó constituida la muestra, con 25 publicaciones, distribuidas de la siguiente manera: SciELO (7), Scopus (11), Pubmed (5), Unam (1), Npunto (1). Debido a la poca información del patrón de bandas en *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* en productos agrícolas y agua de riego se incluyeron artículos con temática relacionada al patrón de bandas en otras muestras o procedencias, tales como investigaciones realizadas en materia fecal de pacientes y alimentos provenientes del mar.

Criterios de inclusión

- Revistas, artículos científicos que se encuentren relacionados al tema de investigación las cuales estén redactados de manera concreta y específica.
- Toda información que considere relevante o nuevo para la temática.
- Revistas, artículos científicos que expongan el área de microbiología y técnicas moleculares como la PCR entre otras.
- Artículos científicos vinculados con enfermedades gastrointestinales asociadas a *Plesiomonas shigelloides* y *Aeromonas sp.*
- Investigaciones, ensayos clínicos que se encuentren relacionadas con enfermedades patógenas en humanos.
- Artículos científicos, revistas publicadas que se hallen dentro de los años permitidos a investigar, deben encontrarse dentro de un periodo de 10 años.
- La información obtenida se encuentra en idiomas como: español e inglés.
- Artículos científicos de las bases de datos SciELO, Scopus, Pubmed, Npunto, Unam, entre otros.
- Información verídica.
- Toda información que contenga resultados, discusión, metodología, resumen.

Criterios de exclusión

- Artículos, revistas científicas que no contengan información nueva o relevante para la investigación y que no estén relacionados a *Plesiomonas shigelloides* y *Aeromonas sp.*
- Artículos científicos anteriores al año 2011.
- Revistas, artículos a los cuales no se logra comprender de forma directa su temática.
- Artículos científicos que no se encuentran completas sus investigaciones.
- Investigaciones no relacionadas con enfermedades gastrointestinales en humanos.



CAPÍTULO III.

DESARROLLO

Los artículos científicos de mayor relevancia seleccionados para esta investigación fueron 103 los mismo que fueron clasificados por criterios de inclusión de los cuales 25 cumplieron con las expectativas del estudio, pertenecientes a Scopus (11), SciELO (7), Pubmed (5), Unam (1), Npunto (1), todos ellos se encuentran a partir del año 2011 en adelante. Se tomaron en cuenta un porcentaje mínimo de artículos con información de patrón de bandas en *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* aislados de muestras de pacientes y productos del mar debido a que existe poca referencia bibliográfica relacionado al tema de investigación.

Una vez analizados los artículos seleccionados los mismos que contienen información que cumple con los objetivos propuestos se procedió a realizar las siguientes tablas las cuales fueron divididas en 2 grupos

- Patrón de bandas de *Aeromonas sp*
- Patrón de bandas de *Plesiomonas shigelloides*

Patrón de bandas de <i>Aeromonas sp</i>				
Título	Autor	Técnica	Resultados	
			Número de bandas	Peso Molecular
<i>Aeromonas</i> aislados de heces de personas con o sin diarrea en el sur de Taiwán: predominio de <i>Aeromonas veronii</i>	(Chen P, Tsai P, Chen C, Lu Y, Chen H, Lee N, Lee Ch, Li Ch, Li M, Wu Ch, Ko W. 2015)	AP-PCR	1	956 pb
Uso del nuevo marcador filogenético ADN e hibridación ADN-ADN para aclarar las interrelaciones dentro del género <i>Aeromonas</i>	Nhung PH, Hata H, Ohkusu K, Noda M, Shah MM, Goto K	AP-PCR	2	934pb 891pb
Aislamientos humanos de <i>Aeromonas</i> poseen genes de la toxina Shiga (stx 1 y stx 2) muy similar a las variantes genéticas más virulentas de <i>Escherichia coli</i>	Alperi A, Figueras M.	AP-PCR	2	350pb 406pb
Un estudio sobre la prevalencia de <i>Aeromonas spp.</i> y sus genes	(Didugu H, Thirtham M, Nelapati K, Reddy K,	AP-PCR	3	599 pb

de enterotoxina en muestras de agua de pozo, agua del grifo y agua embotellada	Kumbhar B, Poluru A, Pothanaboyina G.2015)			331 pb 252 pb
Método de PCR multiplex para la detección de tres <i>Aeromonas</i> Genes de enterotoxina	(Kingombe C, DÄoust J, Huys G, Hofmann L, Rao M, Kwan J , 2011)	AP-PCR	3	536 pb 361 pb 232 pb
Taxonomía, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana de <i>Aeromonas</i> aisladas de infecciones intestinales y extra-intestinales	(Zhou Y, Yu L, Nan Z, Kan B, Yan D, Su J 2019)	AP-PCR	3	490 pb 580 pb 5780 pb
Desarrollo de PCR dúplex para identificación. de <i>Aeromonas sp.</i>	(Mendes C, Hofer E, Leal N , 2013)	AP-PCR	3	100pb 237pb 600pb
Método de pñlets para la detección de <i>Aeromonas</i>	Virgili M 2016	AP-PCR	4	600 pb 300 pb 237 pb 200 pb
Identificación de especies clínicas de <i>Aeromonas</i> por secuenciación rpoB y gyrB y	(Persson S, Shuweli S, Yapici S, Jensen J, Olsen K. 2015)	AP-PCR	5	70pb 99pb 144pb

desarrollo de un método PCR Multiplex para la detección de <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. veronii</i> , y <i>A. media</i>				224pb 461pb
Distribución de 13 genes de virulencia entre aislados clínicos y ambientales de <i>Aeromonas spp</i> en Australia Occidental. Europa	Aravena-Román M, Inglis T, Riley T , Chang B	AP-PCR	12	431pb 535pb 320pb 710pb 350pb 504pb 251pb 233pb 608pb 737pb 180pb 255pb
Caracterización de <i>Aeromonas hydrophila</i> mediante análisis RAPD-PCR y SDS-PAGE	(Sarkar A, Saha M, Patra A, Roy P 2012)	RAPD-PCR	1	100 pb
El análisis comparativo de las propiedades fenotípicas y	(Ciftci A, Onuk E, Ciftci G, Findik A, Sogut M,	RAPD-PCR	1	249 pb.

genotípicas de <i>Aeromonas sobria</i> Cepas aisladas de arco iris Trucha	Gulhan T 2015)			
Incidencia de <i>Aeromonas</i> , especies aisladas de pacientes con diarrea y aguas de distritos costeros de Odisha, India	Mohamed E, Ahmed H, Rezk M, Gharied R, Maksoud A , 2019)	RAPD-PCR	2	181 pb 2111 pb
<i>Aeromonas hydrophila</i> de peces y humanos: formación de biopelículas y relación genética	(Pal B, Pattnaik S, Mohanty A, Samal S, Khuntia H, Nayak S (2016)	RAPD-PCR	7	183 pb 398 pb 532 pb 924 pb 1200 pb 2130 pb 2930 pb.
Tipificación molecular, antibiograma y detección basada en PCR-RFLP de <i>Aeromonas hydrophila</i> Complejo aislado de <i>Oreochromis niloticus</i>	(Algammal A, Mohamed F, Basma T, Wael N, Waleed M ,2020)	RFLP-PCR	4	1100 pb 301 pb 442 pb 911 pb
Reclasificación de <i>Aeromonas</i>	Beaz-Hidalgo R,	LAMP	5	1544pb

<p><i>hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> Huys et al. 2002 y <i>Aeromonas</i> <i>aquariorum</i> Martínez-Murcia et al. 2008 como <i>Aeromonas</i> <i>dhakensis</i> sp. nov. comb. nov. y emendación de la especie <i>Aeromonas hidrophila</i> .</p>	<p>Martínez-Murcia A, Figueras MJ</p>			<p>1480pb 1233pb 667pb 3708pb</p>
--	---	--	--	---

Los cebadores han sido utilizados desde hace años atrás ya que han permitido amplificaciones aleatorias de fragmentos de ADN empleándolas para la identificación de bacterias. Cuando existe variación de este patrón de bandas en una misma especie de bacterias señala una nueva variación genética en las mismas.

Chen P³⁶ y colaboradores estudiaron el patrón de bandas en muestras de pacientes con diarrea, obtuvieron como resultado una banda por el método AP-PCR y su peso molecular vario de 956 pb. Productos similares lograron Nhung PH³⁷, Alperi A³⁸ por el mismo método en cepas de *Aeromonas* aisladas su diferencia fue el peso molecular que oscilo de 350 – 934 pb respectivamente.

Por otra parte, investigaciones realizadas por Didugu H³⁹, Kingombe C⁴⁰, Zhou Y⁴¹, Mendes C¹⁷ y colaboradores analizaron cepas aisladas de agua de pozo, agua del grifo, agua embotellada, origen alimentario y heces de pacientes con diarrea alcanzaron la replicación de 3 bandas por la técnica AP-PCR y su peso molecular fue de 100pb a 5780 pb. Virgilli M⁴², utilizó el mismo procedimiento para observar las variaciones genéticas de esta bacteria en muestras recolectadas de río, pero ella logro una amplificación de 4 bandas con un peso molecular entre 200 - 600 pb.

Persson S¹⁶ indagó 51 cepas de *Aeromonas* recolectadas de pacientes con diarrea, su objetivo fue mirar la replicación a través de la AP-PCR produciendo un amplicón de 5 bandas con peso moleculares de 70 pb a 461pb, de todos los proyectos mencionados anteriormente que utilizaron la técnica de AP-PCR Aravena M⁴³ y colaboradores obtuvieron una mayor replicación de bandas con 12, el peso molecular de las mismas variaron de 180 – 737 pb.

Por la técnica RAPD-PCR Sarkar A⁴⁴, Ciftci A⁴⁵ estudiaron el patrón de bandas en muestras de agua de estanque, agua de río, carne cruda y trucha arco iris produciendo 1 banda amplificada con 100 pb y 249 pb, con el mismo método Pal B, Pattnaik S⁴⁶ identificaron 2 bandas las mismas que fueron obtenidas en muestras de hisopado rectal con distinto peso molecular que fue de 181 pb a 2111 pb, pero Mohamed E, Ahmed H⁴⁷ tuvo un producto mayor de 7 bandas replicadas en muestras de heces de humanos y tilapia, el peso molecular fue entre 183 pb a 2930pb.

Existe otra técnica como la RFLP-PCR destinada para la investigación del patrón de bandas en bacterias como lo demuestra Algammal A, Mohamed F⁴⁸ en su estudio donde analizaron muestras de tilapia *Oreochromis niloticus* obteniendo 4 bandas amplificadas de 301pb a 1100 pb.AP

En las últimas décadas se ha empleado el método LAMP con la finalidad para determinar el patrón de bandas tomando como ejemplo el proyecto de Beaz-Hidalgo R⁴⁹ que obtuvo 5 bandas a través de la misma y sus pesos moleculares variaron de 667 – 1544 pb.

Finalmente, de la bibliografía analizada se pudo evidenciar que la mayoría de los autores utilizó la técnica PCR para el estudio del patrón de bandas en bacterias, convirtiéndose en uno de los métodos más aplicados, reconocido por su mayor sensibilidad y especificidad en el procesamiento de mismas.

Patrón de bandas en <i>Plesiomonas shigelloides</i>				
Título	Autor	Técnica	Resultados	
			Número de bandas	Peso molecular
Aislamiento, identificación y análisis genómico de <i>Plesiomonas shigelloides</i> aislados de <i>Percocypris pingi</i> enfermo.	(Pan L, Liu S, Cheng X, Tao Y, Yang T, Li P, Wang Z, Shao D, Zhang D. 2017)	AP-PCR	2	100pb 101pb
Incidencia de <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Plesiomonas shigelloides</i> en Mariscos	(Kahraman B, Dumen E, Issa G , Kahraman T, Ikiz S 2017)	AP-PCR	2	750 pb 1200 pb
Detección específica de <i>Plesiomonas shigelloides</i> aisladas de ambientes acuáticos, animales y casos de diarrea humana mediante PCR ARNr 23S	Salerno A, Čižnár I, Krovacek K, Conte M, Dumontet S, González-Rey C	AP-PCR	3	100pb 284pb 100pb

<p>Prevalencia y variabilidad genética de <i>Plesiomonas shigelloides</i> en aguas superficiales de clima templado de la llanura de Panonia</p>	<p>(Petrušić M, Obreht D, Lazić S, Radnović D, Knežević P, 2018)</p>	<p>AP-PCR</p>	<p>10</p>	<p>100pb 200pb 300pb 400pb 500pb 250pb 750pb 1000pb 1500pb 2000pb</p>
<p>Detección de <i>Plesiomonas shigelloides</i> mediante la pcr en tilapias silvestres (<i>oreochromis mossambicus</i>) y cultivadas (<i>tetra híbrido o. mossambicus o. urolepis hornorum o. niloticus o. aureus</i>) en Venezuela</p>	<p>(Moreno M, Medina I, Álvarez J, Obregón J 2016)</p>	<p>AP-PCR</p>	<p>10</p>	<p>200pb 300pb 400pb 500pb 600pb 700pb 800pb 900pb 1000pb 1500pb</p>

Caracterización molecular, diversidad intraespecie y abundancia de <i>Plesiomonas shigelloides</i> aislada de agua dulce	Ekundayo T, Okoh A 2020	RAPD-PCR	3	100pb 284pb 500pb
Evidencia molecular de <i>Plesiomonas shigelloides</i> como posible agente zoonótico	(González R, Siitonen A, Pavlova A, Ciznar I 2011)	RAPD-PCR	12	100pb 200pb 300pb 400pb 500pb 600pb 700pb 800pb 900pb 1000pb 2000pb 3000pb
Detección rápida y sensible de <i>Plesiomonas shigelloides</i> por amplificación isotérmica mediada por bucle de la hoga	(Shuang M, Xu J, Xiong Y, Ye Ch 2012)	LAMP	4	100pb 250pb 500pb 2000pb

Gene				
Detección rápida y sensible de <i>Plesiomonas shigelloides</i> mediante amplificación de cebador cruzado del gen hugA.	(Wang Y, Shuang M, Ye Ch 2016)	LAMP	6	100pb 250pb 500pb 750pb 1000pb 2000pb

Pan L⁵⁰, Kahraman B⁵¹ y colaboradores se propusieron analizar el patrón de bandas en *Plesiomonas shigelloides* aisladas de mariscos donde obtuvieron la replicación de dos bandas a través de la técnica AP-PCR siendo su peso molecular de entre 100 - 1200pb un resultado similar produjeron Salerno A y Čižnár I⁵² con muestras de diferentes puntos acuáticos reproduciendo 3 bandas empleando el mismo método su diferencia fue en el peso molecular del cual varió de 100 a 248pb.

Mediante la AP-PCR Petrušić M¹⁹, Moreno M⁵³ y colaboradores realizaron una investigación en muestras de lagos y ríos observando la replicación de 10 bandas en sus estudios y los pesos moleculares también fueron similares en promedios de 100 - 2000pb respectivamente.

Utilizando el método de RAPD PCR Ekundayo T, Okoh A²⁰ investigaron muestras de agua de río, encontrando un total de 3 bandas en la amplificación y su peso molecular de 100pb, 284pb y 500pb, por otra parte con la misma metodología González R, Siitonen A, Pavlova A, Ciznar I⁵⁴ estudiaron en muestras de heces de pacientes pero ellos lograron observar 10 bandas en su análisis con los pesos moleculares que fueron entre 100 a 3000 pb.

Por la técnica LAMP Shuang M,⁵⁵ Wang Y⁵⁶ y colaboradores realizaron su estudio en diferentes muestras obtenidas en heces de pacientes y agua ambiental resultando como producto una amplificación de 4 y 6 bandas con una variación de pesos moleculares de 100 a 2000pb.

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo de revisión bibliográfica se reafirma que *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* son bacterias causantes de infecciones gastrointestinales y que son transmitidas a través de agua y alimentos contaminados.

Aeromonas spp y *Plesiomonas shigelloides* se encuentran a nivel global distribuidas en ambientes acuáticos por lo que fue importante realizar revisiones bibliográficas para ampliar información sobre el patrón de bandas, para su aislamiento e identificación de las mismas, así como también describir las bacterias de relevancia clínica que se encuentra en infecciones gastrointestinales.

Esta investigación se basó en búsqueda de información relacionada a nuestro tema según los criterios de inclusión y exclusión. La mayoría de los artículos seleccionados contienen información acerca del aislamiento de *Aeromonas sp* y *Plesiomonas shigelloides* a través de métodos de microbiología y biología molecular en la cual se encuentra el método PCR el mismo que utiliza cebadores para amplificar las bandas de las bacterias a estudiar.

Se ha observado que en la gran mayoría de las fuentes bibliográficas mencionan a *A hydrophila*, *A caviae*, *A veronii* y *Plesiomonas shigelloides* como las bacterias más frecuentes en infecciones gastrointestinales, las mismas que se encuentran en productos agrícolas y aguas de riego, así como también en la mayoría de los mariscos ya que presentan genes virulentos investigados a través del método PCR.

Por último, con toda la información recolectada en esta investigación se llegó a la determinación que los métodos moleculares son los más apropiados para la identificación genotípica y fenotípica de estas bacterias, debido a su especificidad y sensibilidad con respecto a las técnicas microbiológicas tradicionales, pues las primeras permiten su replicación conteniendo varios pares de bases moleculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fao. Contaminación agrícola de los recursos hídricos. [Online] Acceso 01 de 12 de 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/3/W2598S/w2598s03.htm>.
2. Hernández C GAGC. Enfermedades Infecciosas y microbiología. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. 2011 Oct; 31(4).
3. OPS. Inocuidad de Alimentos Control Sanitario HACCP. [Online]; 2015. Acceso 01 de 12 de 2019. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es.
4. Castillo Irma. Ciencias en Biotecnología Genómica. Las bacterias, estudios y cambios a lo largo de la historia. 2016 May; 17(5).
5. Altwegg M. *Aeromonas* and *Plesiomonas*, in: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM press. 1999; 5(16)
6. Fadua L. Universidad Rovira Virgili. *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal. 2016;(73).
7. Koneman Elmer WW. Bacilos gramnegativos curvos y fermentadores oxidasa positivos: campilobacterias y vibriones. In Octavio G, editor. Koneman Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color. Argentina Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
8. Jawetz MA. Microbiología Médica. In Jawetz. *Vibrios, Campylobacter, Helicobacter* y bacterias, relacionadas. México: McGraw-Hill interamericana; 2011
9. Janda M, Abbott S, McIver Ch, Clin Microbiol. *Plesiomonas shigelloides* revisado. 2016; 29(2)
10. Gámez Erenia SA. Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Aislamiento de *Plesiomonas shigelloides* en pacientes con enfermedad diarreica aguda. 2015 Jun; 9(3).
11. Yin Z, Zhang B, Wei B, Meng B, Yang S, Wang J, Yuan Ch, Jiang L, Du Y. Ciencia ecológica y evolutiva. La transferencia horizontal de genes aclara la confusión taxonómica y promueve la diversidad genética y la patogenicidad de *Plesiomonas shigelloides*. 2020 Oct; 5(5).
12. Mellado D. Npunto. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. 2020 Sep; 3(30).

13. Chittima Pitarangsi pe. Infection and Immunity. Enteropatogenicidad de *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomonas shigelloides*: prevalencia entre individuos con y sin diarrea en Tailandia. 2018 Octu.
14. Edgar G. Anales de la Facultad de Medicina. Coinfecciones bacterianas causantes de enfermedad diarreica aguda, en el Instituto Nacional de Salud del Niño. 2015 Dec; 76(4)
15. Guerrero Christy DH. Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente. Determinación de la aerolisina gen en *Aeromonas hydrophila* utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (pcr). 2021; 1(236).
16. Persson S, Shuweli S, Yapici S, Jensen J, Olsen K. Departamento de Microbiología y Control de Infecciones. Identificación de clínica *Aeromonas* Especies por rpoB y gyrB Secuenciación y desarrollo de un método de PCR multiplex para la detección de *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, y *A. medios*. 2015 Feb; 53(2).
17. Mendes C, Hofer E, Leal N. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Desarrollo de dúplex-PCR para identificación de *Aeromonas* especies. 2013 Jun; 46(3).
18. Shuang M, Xu J, Xiong Y, Ye Ch. Plosone. Detección rápida y sensible de *Plesiomonas shigelloides* mediante amplificación de cebador cruzado del gen hugA. 2012 Oct; 7(10).
19. Petrušić M, Obreht D Lazić S, Radnović D, Knežević P. Departamento de Biología y Ecología. Prevalencia y variabilidad genética de *Plesiomonas shigelloides* en aguas superficiales de clima templado de la llanura de Panonia. 2017 Aug; 70(1).
20. Ekundayo T, Okoh A. Centro de Monitoreo de la Calidad del Agua Microbiana. Caracterización molecular, diversidad intraespecie y abundancia de *Plesiomonas shigelloides* aislada de agua dulce. 2020 Jul; 8(1081).
21. Lawe O. Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. [Online]; 2015. Acceso 28 de 11de 2019 Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/detail/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
22. Chicaiza E. Determinación de bacterias de interés clínico en productos agrícolas con riego del río Chibunga. [Online]; 2019. Acceso 26de 12de 2020. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/6226/1/Determinaci%20de%20bacterias%20de%20inter%20a9s%20cl%20adnico%20en%20productos%20agr%20adcolas%20con%20riego%20del%20r%20ado%20Chibunga.pdf>

23. Rojas A. Método: PCR. [Online]; 2018. Acceso 04 de 12de 2019. Disponible en: <http://conogasi.org/articulos/metodo-pcr/>.
24. Alejandra Serrato JA. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
25. Hanliang Zhu HZ. Biotecnología. PCR pasado, presente y futuro. 2020 Aug; 10(2144).
26. Constantino R. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [Online]. 04de 12 de 2019. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
27. Huertas C, Urbano E, Torres M. Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. Rev haban cienc méd. 2019;18(3):513–28.
28. Angarita M, Torres M, Díaz A. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Rev Habanera Ciencias Médicas. 2017;16(5):796–807.
29. Welhs J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Res, 1990; 18(7)
30. Díaz G. Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen. [Online]. Acceso 31 de 05 de 2021. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html#:~:text=La%20reacci%C3%B3n%20de%20la,DNA%20entre%20los%20oligonucle%C3%B3tidos>.
31. Kashir J. LAMP la nueva técnica que promete cambiar el rumbo de la pandemia. [Online].; 2020. Acceso 31 de 05 de 2021 . Disponible en: [https://megalabs.global/lamp-la-nueva-tecnica-que-promete-cambiar-el-rumbo-de-la-pandemia/#:~:text=El%20m%C3%A9todo%20LAMP%20\(por%20sus,6%20secuencias%20objetivo%20diferentes%20identificadas](https://megalabs.global/lamp-la-nueva-tecnica-que-promete-cambiar-el-rumbo-de-la-pandemia/#:~:text=El%20m%C3%A9todo%20LAMP%20(por%20sus,6%20secuencias%20objetivo%20diferentes%20identificadas).
32. Thermofisher. Cebadores aleatorios. [Online] Acceso 27 de 10de 2020. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/48190011#/48190011>.
33. Bionline. Random Hexamer Primers. [Online] Acceso 03 de 12de 2019. Disponible en: <https://www.bionline.com/us/random-hexamer-primers.html>.
34. Mendel Y. Herramientas de biología molecular VI. [Online]. Acceso 27 de 02de 2020. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=QqX5DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT3&dq=biologia+molecular++cebadores+aleatorios&ots=aCFfvrnx78&sig=hs9c8wNviUn2FaLIP>

x62qh97iu8#v=onepage&q=biologia%20molecular%20%20cebadores%20aleatorios&f=false

35. Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021 [Internet] Ecuador. Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo; 2015 [consulta el 12 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://planparatodoscloud.senplades.gob.ec/objetivo6>
36. Chen P, Tsai P, Chen C, Lu Y, Chen H, Lee N, Lee Ch, Li Ch, Li M, Wu Ch, Ko W. Revista de microbiología, inmunología e infección. *Aeromonas* aislados de heces de personas con o sin diarrea en el sur de Taiwán: predominio de *Aeromonas veronii*. 2015; 138
37. Nhung PH, Hata H, Ohkusu K, Noda M, Shah MM, Goto K, Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva. Uso del nuevo marcador filogenético adn e hibridación ADN-ADN para aclarar las interrelaciones dentro del género *Aeromonas*. 2007; 57(1232).
38. Alperi A, Figueras MJ. Microbiología clínica e infección. Aislamientos humanos de *Aeromonas* poseen genes de la toxina Shiga (stx 1 y stx 2) muy similar a las variantes genéticas más virulentas de *Escherichia coli*. 2010 Oct; 16(10).
39. Didugu H, Thirtham M, Nelapati K, Reddy K, Kumbhar B, Poluru A, Pothanaboyina G. Laboratorio de diagnóstico de enfermedades. Un estudio sobre la prevalencia de *Aeromonas spp.* y sus genes de enterotoxina en muestras de agua de pozo, agua del grifo y agua embotellada. 2015; 8
40. Kingombe C, D'Áoust J, Huys G, Hofmann L, Rao M, Kwan J. Método de PCR multiplex para la detección de tres *Aeromonas*. Sociedad Estadounidense de Microbiología. 2011; 76(2).
41. Zhou Y, Yu L, Nan Z, Kan B, Yan D, Su J. Enfermedades Infecciosas de BMC. Taxonomía, genes de virulencia y resistencia antimicrobiana de *Aeromonas* aislado de infecciones intestinales y extra-intestinales. 2019; 19(158).
42. Virgili M. Revista Italiana de Seguridad Alimentaria. Método de primers para la detección de *Aeromonas*. 2016; 5(5489).
43. Aravena-Román M, Inglis TJJ, Riley T V., Chang BJ. Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Distribución de 13 genes de virulencia entre clínicos y ambientales. *Aeromonas spp.* en Australia Occidental. 2014 May
44. Sarkar A, Saha M, Patra A, Roy P. Departamento de Biotecnología. Caracterización de *Aeromonas hydrophila* mediante Análisis RAPD-PCR y SDS-PAGE. 2012; 2(37).

45. Ciftci A, Onuk E, Ciftci G, Findik A, Sogut M, Gulhan T. Departamentos de Microbiología. El análisis comparativo de las propiedades fenotípicas y genotípicas de *Aeromonas sobria* Cepas aisladas de arco iris Trucha. 2015; 21(4).
46. Pal B, Pattnaik S, Mohanty A, Samal S, Khuntia H, Nayak. Revista Internacional de Microbiología Actual y Ciencias Aplicadas. Incidencia de *Aeromonas* especies aisladas de pacientes con diarrea y agua de distritos costeros de Odisha, India 2016; 5(7).
47. Mohamed E, Ahmed H, Rezk M, Gharied R, Maksoud A. Departamento de Zoonosis. *Aeromonas hydrophila* de peces y humanos: formación de biopelículas y relación genética. 2019; 47(4).
48. Algammal A, Mohamed F, Basma T, Wael N, Waleed M. Departamento de Bacteriología, Inmunología y Micología. Tipificación molecular, antibiograma y detección basada en PCR-RFLP de *Aeromonas hydrophila* Complejo aislado de *Oreochromis niloticus*. 2020; 9(238).
49. Beaz-Hidalgo R, Martínez-Murcia A, Figueras MJ. Microbiología sistemática y aplicada. Reclasificación de *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys y col. 2002 y nov. *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 como *Aeromonas dhakensis* sp. *peine* nov. y enmienda de la especie *Aeromonas hydrophila*. 2013 Dec; 12(07).
50. Pan L, Liu S, Cheng X, Tao Y, Yang T, Li P, Wang Z, Shao D, Zhang D. Revista estadounidense de bioquímica y biotecnología. Aislamiento, identificación y análisis genómico de *Plesiomonas shigelloides* Aislado de enfermo *Percocypris pingi*. 2017; 13(4).
51. Kahraman B, Dumen E, Issa G, Kahraman T, Ikiz S. Departamento de Microbiología. Incidencia de *Aeromonas hydrophila* y *Plesiomonas shigelloides* en Mariscos. 2017; 6(24).
52. Salerno A, Čižnár I, Krovacek K, Conte M, Dumontet S, González-Rey C, Microbiología médica. Detección específica de *Plesiomonas shigelloides* aislado de ambientes acuáticos, animales y casos de diarrea humana mediante PCR basado en el gen de ARNr 23S. 2000 Jun.
53. Moreno M, Medina I, Álvarez J, Obregón J. Revista Científica. Detección de *Plesiomonas shigelloides* mediante la pcren tilapias silvestres (*Oreochromis mossambicus*) y cultivadas (*tetrahíbrido*. *Mossambicus O. urolepishornorum O. niloticus O. aureus*) en Venezuela. 2016; 5(459).
54. Gonzalez R, Siitonen A, Pavlova A, Ciznar I. Bacteriología. Evidencia molecular de *Plesiomonas shigelloides* como posible. 2011; 56(178).

55. Shuang M, Ye Ch . Detección rápida y sensible de *Plesiomonas shigelloides* mediante amplificación amplificacion isotérmica media por bucle de la gen hugA Gene. 2012.
56. Wang Y, Shuang M, Ye Ch . Informes de medicina molecular. Detección rápida y sensible de *Plesiomonas shigelloides* por amplificación de cebado cruzado de la hugA gene. 2016.

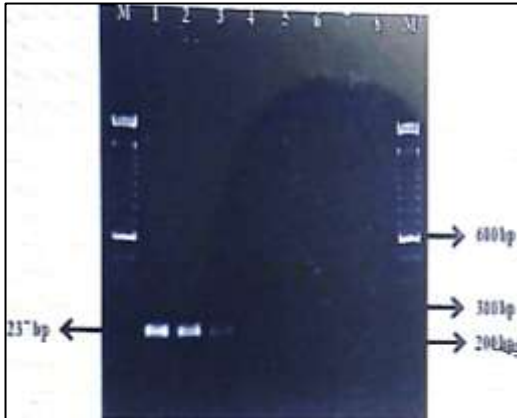
ANEXOS

Anexo N° 1 Cebadores específicos empleados en *Aeromonas*

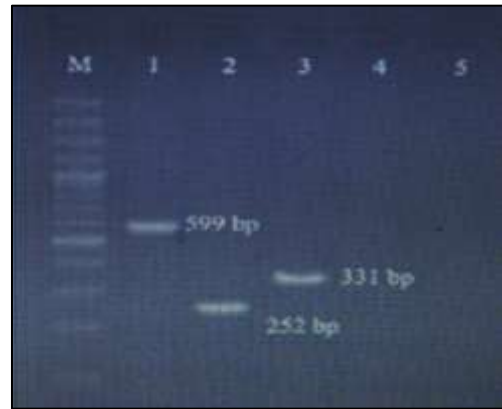
Cebador	Secuenciación
<ul style="list-style-type: none">• AERO-ADN-JF• AERO-ADN-JR3• GCAT• GCATR	<ul style="list-style-type: none">• CGAGATCAAGAAGGCGTACAAG• CACCACCTTGACATCAGATC• CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG• GCAGGTTGAACAGCAGTATCT

Anexo N° 2 Cebadores específicos empleados en *Plesiomonas shigelloides*

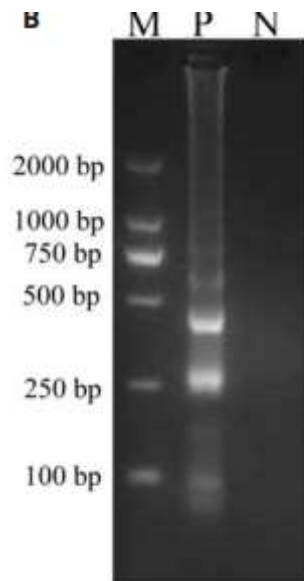
Cebador	Secuenciación
<ul style="list-style-type: none">• HUGAR• PS23FW3• PS23RV3	<ul style="list-style-type: none">• GTTACCGGGTCTGCGTTATG• CTC CGA ATA CCG TAG AGT GCT ATC C• CTCCCCTAGCCCAATAACACCTAAA



Anexo N° 3. Patrón de bandas en *Aeromonas*: amplificación de 4 bandas con diferentes pares 1 237 pb, muestra 2 existe una amplificación de 600 pb, 300 pb y 200 pb.



Anexo N° 4. Patrón de bandas en *Aeromonas*: amplificación de 3 diferentes bandas con distintos pares de bases 599 pb, 331 pb y 252 pb.



Anexo N° 6. Patrón de bandas en *Plesiomonas shigelloides*: amplificación de 6 bandas con diferentes pares de bases 2000 pb, 1000 pb, 750 pb, 500 pb, 250 pb y 100 pb.