

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PCR PARA LA DETECCIÓN DEL GEN
*bla*TEM-1 DE *Escherichia coli* NCTC 13846

TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR
CARLOS LEVI ORTIZ HENRÍQUEZ
DANIEL ALEJANDRO VÁSQUEZ ZELAYA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA Y FARMACIA

MARZO 2026

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL

LICENCIADA ANA LUISA CRUZ DE ALEGRIA.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN SALUD

ASESOR EXTERNO

LICENCIADO CARLOS ALBERTO BUENDÍA RIVAS

TRIBUNAL EVALUADOR

DOCTORA TANIA ETHEL CUADRA ZELAYA

LICENCIADO JUAN AGUSTÍN CUADRA

DOCENTE ASESOR

MAESTRO GUILLERMO EMILIO ALVARENGA MARROQUÍN

AGRADECIMIENTOS.

Primeramente, expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a los docentes asesores: Lic. Carlos Alberto Buendía Rivas, Maestro Guillermo Emilio Alvarenga Marroquín, asimismo a los docentes del tribunal evaluador. Licenciado Juan Agustín Cuadra y Dra. Tania Ethel Cuadra quien ha dirigido el presente trabajo de investigación, por sus consejos, sugerencias y donaciones de Kit para la realización de dicha investigación, estamos gratamente agradecidos con cada uno por sus valiosas aportaciones. Expresamos nuestra Gratitud a nuestro asesor externo en función como Director del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), por permitir hacer uso de las instalaciones y equipos de laboratorios donde se llevó a cabo toda la parte experimental de la investigación. Agradecemos al personal de CENSALUD por su apoyo con el uso del laboratorio de microbiología y el laboratorio de biología molecular de CENSALUD, quienes de igual manera aportaron con consejos y conocimientos para el desarrollo de dicha investigación. A todas gracias y que Dios les bendiga, deseándoles muchos éxitos en sus labores.

Carlos Ortiz y Daniel Vásquez

DEDICATORIA.

Agradezco de manera especial a Tomás Ortiz (QEPD), quien desde el inicio brindó un apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo de graduación. Su compromiso y acompañamiento fueron fundamentales durante este proceso, por lo que le dedico con profundo respeto la culminación de esta investigación.

Expreso mi sincero agradecimiento al Licenciado Francisco Perla, por su amistad, orientación y apoyo constante a lo largo de mi formación académica, así como por sus valiosos consejos, los cuales contribuyeron significativamente a mi crecimiento personal y profesional.

A mi familia, por el respaldo y motivación brindados durante la realización de este trabajo, especialmente a mis padres, quienes compartieron conmigo cada esfuerzo y sacrificio realizado para alcanzar este logro académico.

Agradezco a Daniel Alejandro Vásquez Zelaya, amigo y compañero de grado, por su colaboración, paciencia y perseverancia, así como por compartir experiencias académicas desde el año 2017, las cuales fueron determinantes para la finalización de este trabajo.

Asimismo, agradezco a Adriana Sofía, por su apoyo constante, confianza y motivación durante esta etapa académica, incluso en los momentos de mayor dificultad.

Finalmente, extendo mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de alguna manera, contribuyeron al desarrollo y culminación de este trabajo de graduación.

Finalmente, gracias a Dios, quien siempre estuvo apoyándome en cada paso de esta gran etapa de la vida.

“Si alguien puede refutarme, demostrarme que estoy cometiendo un error o que veo las cosas desde una perspectiva equivocada, con gusto cambiaré. Busco la verdad, y la verdad nunca ha hecho daño a nadie.”

-Marco Aurelio.

Carlos Levi Ortiz Henríquez

Agradezco a Jorge Vásquez y Susana Zelaya, ya que han sido la base fundamental para mi formación académica y el desarrollo de este trabajo de investigación. A ellos dedico mi mayor gratitud y cariño por su apoyo incondicional, su sacrificio, dedicación y motivación aún en momentos de dificultad.

De manera especial agradezco a Dora Bolaños (QEPD) y Eusebio Vásquez (QEPD), que fueron guía, inspiración y motivación, y a quienes con profundo respeto dedico la culminación de esta investigación.

A mi familia y amigos, que fueron de ayuda a lo largo de mi formación académica y profesional.

Agradezco a Carlos Levi Ortiz Henríquez, amigo y compañero, cuya amistad ha sido valiosa durante mi formación académica y profesional. Por su apoyo y compromiso con el proyecto, y cuyo carácter y perseverancia hicieron posible la culminación de este trabajo de investigación.

De igual manera, agradezco a Ada Judith, cuya paciencia, comprensión y apoyo incondicional fueron fundamentales a lo largo de esta etapa. Por su constante motivación que hizo que este proceso fuera no solo más llevadero, sino también profundamente significativo.

Finalmente, agradezco a Dios, por su guía en cada etapa de la vida. A todos, gracias infinitas, y que Dios los bendiga.

“No busques que los acontecimientos sean como quieres; desea que sean como son, y encontrarás serenidad. Y para ello, estudia la naturaleza de las cosas, aprende a discernir lo que depende de ti y lo que no, y haz de tu conocimiento y de tu juicio la guía de tu vida.”

-Epicteto.

Daniel Alejandro Vásquez Zelaya

ÍNDICE GENERAL

	Pág N°
CAPÍTULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO II	
2.0. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GENERAL.	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	15
CAPÍTULO III	
3.0 MARCO TEÓRICO	17
3.1 Género <i>Escherichia</i>	17
3.2 <i>Escherichia coli</i>	17
3.2.1 Características de <i>Escherichia coli</i> .	17
3.2.2 Serotipos patógenos de <i>Escherichia coli</i> .	18
3.3 <i>Escherichia coli</i> derivada de NCTC 13846	18
3.4 Perfil antimicrobiano en bacterias	19
3.4.1 Definición.	19
3.4.2 ¿Cómo se da la resistencia a los antimicrobianos?	19
3.4.2.1 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.	19
3.4.3 Genes de resistencia en <i>Escherichia coli</i> .	20
3.5 Pruebas rápidas de sensibilidad antimicrobiana	23
3.5.1. Galerías ATB.	23
3.5.2. Tipo de galerías.	24
3.6 Identificación molecular de agentes potencialmente patógenos.	24
3.6.1 Definición.	24
3.6.2 Identificación molecular de microorganismos.	25
3.6.3 Reacción de cadena de la polimerasa (PCR).	25
3.6.3.1 Muestra de ADN.	26
3.6.3.2 Cebadores o Primers.	26
3.6.3.3 Polimerasa.	26
3.6.3.4 Solución tampón (buffer).	27
3.6.3.5 Nucleótidos o dNTP's.	27
3.6.4 Ciclos térmicos de reacción en el método de PCR convencional.	27
3.7 Electroforesis	28
3.8 Estandarización del método PCR.	30
3.8.1. Especificidad.	30
3.8.2. Sensibilidad.	31
3.9 Cuantificación de ADN mediante el espectrofotómetro NanoDrop.	31
3.9.1 Cuantificación de muestras de ácidos nucleicos y proteínas.	31
3.9.2 Análisis de pureza de muestras de ácidos nucleicos y proteínas.	32

3.10 Método de secuenciación.	33
3.10.1. Secuenciación de Sanger por electroforesis capilar.	33
CAPÍTULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	36
4.1 Tipo de estudio.	36
4.2 Investigación bibliográfica.	37
4.3 Parte experimental.	38
4.3.1. Manejo e inoculación de la Cepa de referencia <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846.	38
4.3.2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana por medio de Galerías ATB. Procedimiento.	38
4.3.3 Análisis Molecular.	39
4.3.3.1 Lisado de Células de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846.	39
4.3.3.2 Unión de ADN.	39
4.3.3.3 Lavado de ADN.	40
4.3.3.4 Elución de ADN.	40
4.4 Evaluación de empleo del gradiente de concentración de cebadores específicos del protocolo de PCR.	41
4.4.1 Cebadores para amplificación del gen <i>bla</i> TEM-1.	41
4.4.2 Gradiente de concentración de cebadores.	41
4.4.3. Procedimiento para la PCR.	42
4.4.4 Electroforesis en gel de agarosa.	44
4.4.5 Determinación de la reproducibilidad y especificidad del método de PCR.	44
CAPÍTULO V	
5.0 RESULTADOS	47
5.1 Comprobar el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846 por medio de Galería ATB MicroScan Neg BP Combo Panel Type 34.	47
5.2 Evaluar el empleo de diferentes concentraciones de cebadores específicos en el protocolo de reacción de PCR para la detección del gen <i>bla</i> TEM-1 de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846.	49
5.2.1 Verificación de calidad y pureza de DNA de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846.	49
5.2.2 Verificación de la Integridad y Pureza del DNA extraído a través de Electroforesis en gel.	50
5.2.3 Evaluación de las condiciones del termociclador para amplificación y gradiente de concentración de cebadores específicos del gen de resistencia <i>bla</i> TEM-1 en el protocolo de reacción de PCR.	51
5.3 Determinar la reproducibilidad y especificidad del método de PCR para la identificación del gen de resistencia <i>bla</i> TEM-1 de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846.	53
5.3.1 Reproducibilidad del protocolo de PCR para detección del gen <i>bla</i> TEM-1.	53
5.3.2 Especificidad del método de PCR para la identificación del gen de resistencia <i>bla</i> TEM-1 de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846.	55
5.3.2.1 Secuenciación del gen <i>bla</i> TEM-1.	55
CAPÍTULO VII	

6.0 CONCLUSIONES	59
CAPÍTULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo la estandarización del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección específica del gen *bla*TEM-1 en la cepa de referencia *Escherichia coli* NCTC 13846. El estudio se desarrolló bajo un enfoque exploratorio y experimental. En la fase exploratoria se recopilaron y analizaron protocolos previos sobre las condiciones óptimas para la PCR, incluyendo concentraciones de cebadores específicos y temperaturas en el protocolo de reacción de PCR. En la fase experimental se efectuaron pruebas fenotípicas de sensibilidad antimicrobiana mediante galerías MicroScan Neg BP Combo Panel Type 34 y ensayos moleculares para estandarizar el protocolo propuesto.

La metodología comprendió el manejo e inoculación de *Escherichia coli* NCTC 13846, la extracción de ADN genómico utilizando PureLink™ Genomic DNA Purification Kit, la medición de concentración y pureza mediante espectrofotometría y verificación mediante electroforesis, y la evaluación de gradientes de concentración de cebadores entre 0.2 y 10 µM. Las amplificaciones se realizaron en un SimpliAmp™ Thermal Cycler, y se verificaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y secuenciación estándar de Sanger o método de terminación de cadena realizada por MACROGEN.

Los principales resultados evidenciaron resistencia fenotípica a antibióticos β-lactámicos (penicilinas y cefalosporinas de primera generación) y a otros grupos como tetraciclinas y aminoglucósidos. El gradiente de concentración de cebadores específicos del gen de resistencia *bla*TEM-1 determinó que 0.8 µM fue la concentración mínima efectiva y la óptima para la amplificación, y se determinó con la concentración de 10 µM que el protocolo es replicable en un 100%. La secuenciación confirmó un E-value de 0.0 y un 100% de identidad con la secuencia del gen *bla*TEM-1 registradas en el GenBank (aislado GD21 de *Escherichia coli*).

Se concluye que el protocolo PCR estandarizado es sensible, específico y reproducible, constituyendo una herramienta confiable para la detección del gen *bla*TEM-1 en *Escherichia coli* y potencialmente aplicable en laboratorios de microbiología clínica e investigación.

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN

La creciente Resistencia bacteriana a los antibióticos representa uno de los principales desafíos para la salud pública a nivel mundial. Dentro de este contexto, el gen *bla*TEM-1 ha cobrado cierta relevancia, debido a que codifica una beta lactamasa capaz de inactivar antibióticos beta-lactámicos, como la penicilina y ampicilina, reduciendo así la efectividad de estos tratamientos frente a infecciones causadas por *Escherichia coli*.

Identificar con precisión la presencia de este gen en cepas bacterianas es fundamental para el diagnóstico clínico, la vigilancia epidemiológica y la implementación de estrategias terapéuticas adecuadas.

La resistencia a los antibióticos betalactámicos en *Escherichia coli* está asociada principalmente a la presencia de genes que codifican enzimas betalactamasas, entre ellos el gen *bla*TEM, el cual ha demostrado conferir resistencia a diversos fármacos, incluyendo amoxicilina y combinaciones con ácido clavulánico. En este contexto, el primer paso fundamental para avanzar hacia metodologías de detección más complejas, como las pruebas cuantitativas, consiste en la correcta estandarización de técnicas de detección inicial, particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en su modalidad de punto final. Por ello, la presente investigación tuvo como objetivo estandarizar las condiciones de PCR para la detección específica del gen *bla*TEM-1 en la cepa de referencia *Escherichia coli* NCTC 13846. La optimización de los parámetros del termociclador y de las condiciones de amplificación permitió establecer un protocolo reproducible que alcanzó una concordancia del 100% en la detección del gen de interés. Esta estandarización constituye una base metodológica importante para el desarrollo posterior de técnicas moleculares más avanzadas y contribuye a fortalecer los sistemas de diagnóstico molecular en microbiología clínica y laboratorios de investigación.

Dado que se trató de un tema con escasa documentación específica a nivel nacional y considerando que aún existen variaciones técnicas en los protocolos de amplificación de genes de resistencia, esta investigación se abordó desde dos enfoques diferentes: exploratorio y experimental, la parte exploratoria en la cual se recopiló información sobre protocolos existentes o investigaciones relacionadas con el tema en las cuales se evaluó la calidad y pureza del material genético extraído, condiciones de temperaturas del protocolo de amplificación de PCR propuesto, y el gradiente concentración de cebadores específicos. Posteriormente, en la parte experimental, se pusieron a prueba todas las condiciones de la PCR con el ADN de

Escherichia coli NCTC 13846 y se envió para su respectiva secuenciación para comprobar la validez del método.

Por consiguiente, este estudio posee un potencial impacto en los ámbitos clínico y microbiológico, al aportar un protocolo confiable que facilite la identificación del gen de resistencia *bla*TEM-1 en *Escherichia coli* aislada de matrices biológicas, ambientales y alimentarias. El trabajo de campo y laboratorio se desarrolló durante el periodo de junio a noviembre de 2025, en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en la Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

CAPÍTULO II

2.0. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL.

Estandarizar el método PCR para la detección del gen de resistencia *bla*TEM-1 de *Escherichia coli* NCTC 13846.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2.2.1 Comprobar el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* NCTC por medio de Galería MicroScan Neg BP Combo Panel Type 34.

2.2.2. Evaluar el empleo de diferentes concentraciones de cebadores específicos en el protocolo de reacción de PCR para la detección del gen *bla*TEM-1 de *Escherichia coli* NCTC 13846.

2.2.3 Determinar la reproducibilidad y especificidad del método de PCR para la identificación del gen de resistencia *bla*TEM-1 de *Escherichia coli* NCTC 13846.

CAPÍTULO III

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Género *Escherichia*

El género *Escherichia* pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae* o bacterias entéricas. Las bacterias entéricas constituyen un grupo bastante homogéneo dentro de las Proteobacterias y son todas anaerobias facultativas gramnegativas. Los miembros del género *Escherichia* habitan el tracto intestinal de los humanos y otros animales de sangre caliente. Son mayormente inofensivos y desempeñan una función nutricional mediante la síntesis de vitaminas.¹

El género *Escherichia* agrupa cinco especies: *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris* y *Escherichia coli* (*E. coli*), siendo esta última la de mayor importancia para el ser humano y los animales, ya que no solo forma parte de su flora intestinal, sino que también puede, a partir de sus diversas cepas, ser causante de distintas enfermedades como diarrea o causar infecciones del tracto urinario.¹

3.2 *Escherichia coli*

Es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo que prevalece en la flora intestinal del hombre y los animales de sangre caliente. Este microorganismo tiene características que le permiten vencer las defensas del huésped, ganar la competencia con otras bacterias de la flora intestinal y sobrevivir al medio colónico. Logra así establecer infecciones ya sea a nivel intestinal, extraintestinal o bien intrahospitalarias, algunas producen cuadros más severos asociados a la producción de ciertas toxinas, tal es el caso de la cepa O157.²

3.2.1 Características de *Escherichia coli*.

Escherichia coli puede ser identificada por sus características morfológicas al cultivarse en medios diferenciales, pruebas bioquímicas e identificación microscópica mediante tinción de Gram. Se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, no esporulante, que en la tinción de Gram se visualiza de color rosado; produce indol a partir de triptófano, no utiliza citrato como fuente de carbono y no produce acetoina. Además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas.³

3.2.2 Serotipos patógenos de *Escherichia coli*.

Escherichia coli es el principal anaerobio facultativo de la microbiota que reside en el colon humano. El huésped se coloniza desde el nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y establecen una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida. Sin embargo, se ha encontrado que seis grupos patógenos o patotipos de *Escherichia coli* ocasionan diarrea en sujetos sanos: *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), adherente difuso (DAEC) y enteropatógena (EPEC).⁴

3.3 *Escherichia coli* derivada de NCTC 13846

Es una cepa perteneciente a la Colección Nacional de Cultivos Tipo (NCTC por sus siglas en inglés) que es una de las cuatro colecciones de cultivos de la Agencia de Seguridad Sanitaria del Reino Unido. Esta cepa fue originalmente aislada de una muestra de sangre de un paciente con bacteriemia en Greater London, Reino Unido, en octubre de 2013.⁵ La cepa de *Escherichia coli* NCTC 13846 es reconocida por su resistencia a la colistina, que se atribuye al gen MCR-1. Además, posee el gen *bla*TEM-1, que le confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera generación.⁶ Debido a estas características, esta cepa se utiliza como control positivo en pruebas de detección del gen MCR-1 y en controles de calidad para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, especialmente para la colistina. Esta cepa también alberga los siguientes genes de resistencia:⁶

- *bla*TEM-1: Beta-lactamasa de amplio espectro. Confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera generación.
- *bla*CTX-M-27: Beta-lactamasa.
- *aadA1*: Gen del aminoglucósido nucleotidiltransferasa. Activo contra antibióticos aminoglucósidos.
- *aadA2*: Gen del aminoglucósido nucleotidiltransferasa. Activo contra antibióticos aminoglucósidos.
- *aac* (3)-IIa: Gen del aminoglucósido nucleotidiltransferasa. Activo contra antibióticos aminoglucósidos.
- *lnuF*: Lincosamida nucleotidiltransferasa. Activa contra lincosamidas (p. ej., clindamicina).
- *mph*(A): Codifica para la enzima de resistencia MPH (2')-I. Activa contra antibióticos

macrólidos.

- *dfrA14*: Un dihidrofolato reductasa codificada por integrón, activa contra antibióticos de diaminopirimidina (p. ej., trimetoprima).
- *tet(A)*: Una bomba de eflujo de tetraciclina.
- *sul1*: Una dihidropteroato sintasa. Activa contra antibióticos de sulfonamida.
- *sul3*: Una dihidropteroato sintasa. Activa contra antibióticos de sulfonamida.
- *floR*: Un plásmido o exportador de cloranfenicol codificado por cromosoma.

3.4 Perfil antimicrobiano en bacterias

3.4.1 Definición.

El perfil antimicrobiano hace referencia al grado de sensibilidad o resistencia a los antibióticos y otros fármacos que tienen ciertos microorganismos, permite evaluar la eficacia de un tratamiento farmacológico y tener un mejor control de las enfermedades, así como prever el potencial patógeno de un microorganismo.⁷

3.4.2 ¿Cómo se da la resistencia a los antimicrobianos?

La resistencia a los antibióticos ocurre cuando las bacterias, virus, hongos y parásitos se adaptan con el tiempo y se vuelven resistentes a los medicamentos. Esta resistencia hace que la enfermedad sea difícil de tratar y aumenta la morbilidad y la mortalidad. Como resultado, estos medicamentos son menos efectivos, dejan la enfermedad en el cuerpo y hacen que otras sean más contagiosas. Aunque es natural que las bacterias desarrollen resistencia a los antibióticos, el uso indebido y excesivo de estos fármacos ha acelerado este proceso.⁷

3.4.2.1 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.

Los microorganismos pueden desarrollar resistencia a los antibióticos, lo cual les permite adaptarse y sobrevivir, empleando distintos mecanismos como lo son:⁸

- **Mutación genética:** Se da cuando se producen mutaciones o modificaciones espontáneas en el ADN bacteriano, que pueden llevar a cambios en las proteínas dianas donde actúan los antimicrobianos, evitando de esta manera que los fármacos puedan ejercer su acción, y de esta manera disminuir su efectividad.⁸
- **Transferencia horizontal de genes:** las bacterias son capaces de adquirir genes de

resistencia por medio del traspaso de material genético entre distintas especies. Estas son capaces de obtener dichos genes por medio del mecanismo de conjugación, transformación y transducción, lo cual permite que las bacterias adquieran resistencia a los antimicrobianos sin necesidad de mutaciones.⁸

- La producción de enzimas inactivantes es un mecanismo mediante el cual ciertas bacterias degradan o modifican los antimicrobianos, anulando su eficacia. Un ejemplo clínico relevante son las betalactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de antibióticos como la penicilina y la amoxicilina, inactivándolos antes de que puedan actuar sobre la bacteria.⁸
- Alteración de permeabilidad celular: con el fin de reducir la entrada de antimicrobianos en la célula, las bacterias pueden desarrollar cambios en la composición de su membrana celular o la expresión de proteínas transportadoras, lo cual disminuye en gran medida la efectividad de algunos antimicrobianos.⁸
- Expulsión de antimicrobianos: algunas bacterias tienen la capacidad de expulsar los antimicrobianos activamente por medio de sistemas de bombeo de eflujo, esto evita que los antimicrobianos lleguen a alcanzar concentraciones altas, y por el contrario alcanzan una concentración mínima que impide que el antimicrobiano llegue a ser efectivo antes de ser expulsado.⁸

3.4.3 Genes de resistencia en *Escherichia coli*.

La OMS clasifica a *Escherichia coli* como un patógeno de control por ser causante de enfermedades intrahospitalarias, comunitarias y su alta multiresistencia. Es capaz de causar enfermedades intestinales y extraintestinales. En América Latina se han reportado cepas de esta bacteria productoras de betalactamasas de espectro extendido, cepas resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Así como también, resistencia a carbapenémicos y presencia del gen MCR-1 que le confiere resistencia a colistina. Por lo cual resulta ineficaz el uso de tratamientos en muchos casos, debido al alto nivel de resistencia a los antibióticos que se asocia a una mayor morbilidad y mortalidad del ser humano.⁹

Se hace énfasis en el gen MCR-1 porque este gen confiere resistencia a la colistina, que es considerado un antibiótico de “última línea” para tratar infecciones graves por bacterias multiresistentes, incluyendo *Escherichia coli*.

La principal preocupación es que el gen MCR-1:

- Se encuentra frecuentemente en plásmidos, lo que facilita su transferencia horizontal entre bacterias.
- Puede diseminarse rápidamente entre distintas especies bacterianas, no solo *E. coli*.
- Reduce las opciones terapéuticas, ya que la colistina se usa cuando otros antibióticos (como carbapenémicos) ya no funcionan.

Por ello, cuando se detecta una cepa portadora de MCR-1 se recomienda un manejo con aislamiento estricto porque:

- Existe alto riesgo de transmisión nosocomial (hospitalaria).
- Puede colonizar pacientes, superficies y equipos médicos.
- Puede transferir el gen a otras bacterias patógenas, generando brotes difíciles de controlar.
- Incrementa la morbilidad y mortalidad debido a fallas terapéuticas.
- En términos de control epidemiológico, una cepa con MCR-1 se considera de alto riesgo biológico y debe manejarse bajo medidas reforzadas de bioseguridad y control de infecciones.

En un estudio realizado en China, donde se evaluó la resistencia a los antibióticos de *Escherichia coli* aislada de alimentos y entornos clínicos en China entre los años 2001 y 2020, se encontró que las cepas de *Escherichia coli* aisladas de los alimentos fueron altamente resistentes a los antibióticos de tetraciclina (TET, 71,3 %), seguida de trimetoprima-sulfametoxazol (SXT, 62,5 %) y cefazolina (CFZ, 36,2 %). Además, se reporta que las cepas son portadoras de múltiples genes de resistencia a antibióticos como *bla*TEM, *gry*A, *gry*B, *sul*1 y *tet*A, lo que convierte a *Escherichia coli* en un reservorio de genes resistentes a antibióticos.¹⁰

La transmisión se facilita porque los alimentos contaminados actúan como vehículos de bacterias resistentes. Cuando una persona consume alimentos de origen marino contaminados con *Escherichia coli* portadora de genes como *bla*TEM-1:

- Las bacterias pueden colonizar el intestino humano.
- Los genes de resistencia pueden transferirse a la microbiota intestinal mediante transferencia horizontal (conjugación plasmídica).
- La manipulación o cocción inadecuada favorece la supervivencia bacteriana.

Además, los ambientes acuáticos suelen estar expuestos a:

- Residuos antibióticos
- Aguas contaminadas
- Descargas hospitalarias o agrícolas, lo que favorece la selección de bacterias multirresistentes en la cadena alimentaria.

Representa un riesgo significativo porque:

- Introduce bacterias multirresistentes directamente en la población.
- Convierte al ser humano en reservorio de genes de resistencia.
- Puede causar infecciones intestinales y extraintestinales difíciles de tratar.
- Limita las opciones terapéuticas (resistencia a betalactámicos como los asociados a blaTEM-1).
- Facilita la diseminación comunitaria de la resistencia a los antimicrobianos.

En consecuencia, el consumo de alimentos contaminados con *E. coli* resistente no solo puede provocar enfermedad, sino también contribuir a la propagación silenciosa de la resistencia a los antibióticos, lo que incrementa la carga de infecciones graves, costos sanitarios y mortalidad a nivel poblacional.

3.4.3.1 Gen de resistencia *bla*TEM-1

El gen *bla*TEM-1 es un gen de resistencia que codifica para una β -lactamasa de tipo TEM-1, una enzima que confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos como las ampicilinas y cefalosporinas. Este gen actúa hidrolizando el anillo β -lactámico de estos antibióticos, inactivándolos y permitiendo que las bacterias que la producen sean resistentes a estos.¹¹

Se ha encontrado una gran variedad de especies bacterianas que poseen este gen de resistencia, obtenidas de diversas fuentes de aislamiento que incluyen ambientes acuáticos y clínicos. Su asociación con elementos genéticos móviles, como transposones e inserciones, facilita la transferencia horizontal entre bacterias de estos genes, contribuyendo a la propagación de la resistencia a antibióticos.¹²

La presencia del gen *bla*TEM-1 en cepas de *Escherichia coli* se ha reportado como un agente común y se encuentra asociado con la resistencia a múltiples fármacos betalactámicos. Por ejemplo, en un estudio realizado en aguas residuales de uso hospitalario, se detectó el gen *bla*TEM-1 en aislamientos de *Escherichia coli* resistentes a ampicilina, poniendo en evidencia

el rol que este tiene sobre la resistencia a los antimicrobianos en entornos clínicos.¹³

Un estudio realizado en alimentos de origen marino (bagre, cangrejos y peces tilapia) en lagos de Nigeria, resalta el hallazgo de cepas de *Escherichia coli* portadoras del gen *bla*TEM-1. La presencia de estas bacterias en alimentos puede facilitar la transmisión de genes de resistencia a los consumidores, lo cual representa un riesgo significativo para la salud pública. Estos resultados enfatizan la necesidad de la implementación de medidas de control de calidad en la cadena de suministro de productos marinos para mitigar la propagación de la resistencia antimicrobiana.¹⁴

3.5 Pruebas rápidas de sensibilidad antimicrobiana

3.5.1. Galerías ATB.

El sistema ATB (Antibiotic Test for Bacteria), son sistemas comerciales utilizados comúnmente en microbiología clínica para la identificación y determinación de la sensibilidad antimicrobiana de bacterias y levaduras, entre ellas se encuentra la galería MicroScan Neg BP Combo Panel Type 34. Estas consisten en paneles de microtubos o micropocillos que contienen sustratos bioquímicos y/o antibióticos específicos, que al ser inoculados con una suspensión bacteriana y observar las reacciones resultantes, es posible identificar el microorganismo y evaluar el perfil de resistencia o susceptibilidad a diversos agentes antimicrobianos que este pueda presentar.¹⁵

El principio básico de las galerías ATB se basa en la capacidad que poseen las bacterias para metabolizar ciertos sustratos o reaccionar a la presencia de antibióticos específicos. Para ello se inocula una concentración estandarizada del microorganismo en cada pocillo de la galería, estos pocillos están diseñados para evaluar una característica particular del microorganismo, ya sea mediante una reacción bioquímica o por medio de la respuesta del microorganismo a un antibiótico. La observación de cambios por medio de la reacción en estos pocillos permite la identificación precisa del microorganismo y la evaluación de su perfil de sensibilidad antimicrobiana, pudiendo evidenciar estos resultados después de 18 a 24 horas.¹⁵

Estas galerías se componen por 16 pares de pocillos, y están diseñadas para evaluar la sensibilidad bacteriana a diversos antibióticos. El primer par de pocillos no contiene antibióticos y su función es servir como control de crecimiento bacteriano. Los siguientes 14 pares contienen antibióticos deshidratados que permiten determinar la concentración mínima

inhibitoria (CMI) de cada uno. El último par de pocillos se encuentra libre de antibióticos, ofreciendo un espacio que permite incluir antibióticos complementarios según las necesidades específicas del análisis.¹⁵

3.5.2. Tipo de galerías.

Existen distintos tipos de galerías ATB, y cada una está optimizada según el grupo bacteriano o fúngico correspondiente, lo que permite proporcionar resultados rápidos y precisos sobre los microorganismos.¹⁵

- Galerías ATB G-CLSI (12): se utilizan para la identificación y evaluación de la sensibilidad antimicrobiana de bacterias gramnegativas. Estas galerías contienen 12 pocillos con antibióticos específicos y se utilizan para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico.¹⁵
- Galerías ATB para grampositivos: Diseñadas para evaluar la sensibilidad de bacterias grampositivas, como *Staphylococcus* y *Streptococcus*.¹⁵
- Galerías ATB para levaduras: Utilizadas para determinar la susceptibilidad de especies de *Candida* y *Cryptococcus* a antifúngicos específicos.¹⁵

Existen además sistemas de galerías ATB rápidos conocidos como “Galerías RAPID ATB” estos son sistemas que permiten realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en un tiempo reducido, que generalmente es de alrededor de 4 horas:¹⁵

- RAPID ATB UR: para enterobacterias en orina. Contiene penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, quinolonas, colistina, nitroxolina, nitrofurantoína y cotrimoxazol.¹⁵
- RAPID ATB G: para enterobacterias en general. Contiene penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y cotrimoxazol.¹⁵
- RAPID ATB E: galería con 30 antibióticos para enterobacterias. Contiene penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol, nitrofurantoína, trimetoprim, sulfametoxazol y fosfomicina.¹⁵

3.6 Identificación molecular de agentes potencialmente patógenos.

3.6.1 Definición.

Es un método de identificación en la cual se emplean ciertos marcadores como el ADN, ARN

y proteínas que permiten determinar características genéticas de células o tejidos.¹⁶

Técnicas moleculares como PCR, PFGE o secuenciación ofrecen ventajas sobre los métodos fenotípicos tradicionales, tales como menor tiempo de obtención de resultados, alta especificidad y sensibilidad, automatización del proceso, entre otras, que son una alternativa viable para su uso rutinario.¹⁶

3.6.2 Identificación molecular de microorganismos.

Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos.¹⁷

Además, se vuelve importante el contrastar la información obtenida de ensayos fenotípicos con métodos genotípicos los cuales son más precisos; uno de los métodos óptimos para realizar esta identificación es la PCR (reacción de cadena de la polimerasa), esta es una técnica molecular que permite amplificar una o unas pocas copias de un fragmento de ADN y generar miles de millones de copias de una secuencia en específico mediante ciclos térmicos.¹⁶

3.6.3 Reacción de cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) representa una técnica innovadora que posibilita la amplificación exponencial de fragmentos específicos de ADN. Este procedimiento es uno de los pilares fundamentales en la actual revolución genética molecular. Antes de su descubrimiento, la obtención de cantidades significativas de ADN para su secuenciación implicaba un proceso arduo y prolongado; sin embargo, gracias a la PCR, se ha vuelto factible la extracción rutinaria de copias de ADN a partir de pequeñas muestras. A nivel celular, esta técnica aprovecha la acción enzimática para desplegar las dobles hebras de ADN, permitiendo así su replicación en masa.¹⁸

La PCR es una técnica muy utilizada para amplificar, es decir, generar múltiples copias de una secuencia específica de ADN. Esta metodología permite analizar y manipular fragmentos de ADN de manera eficiente y precisa.¹⁹ Su funcionamiento se basa en la capacidad del ADN polimerasa para sintetizar nuevas cadenas de ADN complementarias a una plantilla específica.

Mediante ciclos repetidos de desnaturalización, alineamiento de cebadores y extensión, se consigue la replicación exponencial de la región objetivo del ADN.²⁰

La técnica se convirtió en una herramienta fundamental en la investigación científica y en varias áreas de la biología, como la genética, la medicina y la biología forense. Esa reacción requiere de componentes esenciales que conforman las nuevas cadenas formadas, tomando como referencia un punto de partida establecido por cebadores o primers.¹⁶

3.6.3.1 Muestra de ADN.

Es el ADN que se utiliza como molde para la amplificación de la región de interés mediante la acción de cebadores y la enzima polimerasa. Esta es importante para la PCR ya que contiene la información genética que se amplifica y analiza, por lo tanto, debe encontrarse en un alto grado de pureza y estar libre de contaminantes que puedan interferir con la reacción de amplificación, como fenoles, sales, hidratos de carbono, etc.¹⁶

3.6.3.2 Cebadores o Primers.

También conocidos como cebadores son fragmentos cortos de ADN diseñados con la finalidad de unirse específicamente a las secuencias del gen del ARN ribosómico 16S, enlazándose a los extremos opuestos de cada cadena de ADN. Una vez que el cebador se empareja con su secuencia complementaria, el ADN polimerasa inicia la extensión del ADN, comenzando desde el extremo 5' y avanzando hacia el extremo 3'. La selección del cebador se lleva a cabo meticulosamente para asegurar que, al generar nuevas transcripciones, se superpongan en la región de interés, permitiendo así una amplificación precisa del segmento deseado.¹⁸

3.6.3.3 Polimerasa.

Es una enzima que cataliza la formación de polímeros, como los ácidos nucleicos, sintetizando cadenas de nucleótidos a partir de nucleósidos trifosfatos. Los tipos principales de polimerasas son ADN polimerasa que interviene en la replicación del ADN, sintetizando una nueva cadena complementaria a partir de una plantilla de ADN; y el ARN polimerasa que es responsable de la transcripción genética, copia la secuencia de ADN en ARN mensajero (ARNm), permitiendo la expresión de los genes.²¹ Esto

permite extender la cadena de ADN añadiendo nucleótidos al extremo 3' de la cadena "en crecimiento", lo cual implica la adición de un grupo hidroxilo en el carbono 3' al azúcar-fosfato futuro del nucleótido.¹⁸

3.6.3.4 Solución tampón (buffer).

Es una solución utilizada para mantener el pH adecuado para la actividad del ADN polimerasa durante la PCR, asegurando la eficiencia y especificidad de la amplificación, por esta razón se debe seleccionar cuidadosamente la concentración y composición del tampón (este puede variar según el protocolo de PCR empleado).¹⁶

3.6.3.5 Nucleótidos o dNTP's.

Estos son los componentes fundamentales del ADN durante la replicación, se encuentran formados por una base nitrogenada (adenina, timina, citosina o guanina), un azúcar (desoxirribosa) y fosfato.¹⁶ Durante la PCR, los dNTPs sirven como los bloques constructivos para sintetizar nuevas cadenas de ADN. El ADN polimerasa utiliza estos dNTPs para añadir nucleótidos a la cadena en crecimiento, emparejando las bases complementarias del molde de ADN.²²

Los dNTP's son factores importantes implicados en la especificidad de la reacción, por esta razón es importante que su concentración sea óptima, de lo contrario podría incidir negativamente en la funcionalidad del ADN polimerasa, las concentraciones usuales utilizadas son entre 0.2 a 1.0 mM.¹⁶

3.6.4 Ciclos térmicos de reacción en el método de PCR convencional.

Los ciclos de reacción de la PCR constan de tres fases distintas, cada una con temperaturas y tiempos específicos:

1. Desnaturalización (92-98 °C, 30-90 segundos): Durante este paso, las dos cadenas complementarias del ADN objetivo se separan o desnaturalizan, dejando el ADN de cadena sencilla expuesto para la siguiente fase.²³
2. Alineamiento (50-60 °C, 30-90 segundos): En esta etapa, los cebadores (iniciadores) se unen de manera específica a las secuencias de ADN de cadena sencilla generadas en el paso anterior, permitiendo la amplificación selectiva del ADN objetivo.²³

3. Extensión (70-74 °C, 30-90 segundos): Durante este proceso, el ADN polimerasa extiende los cebadores unidos al ADN objetivo, utilizando desoxinucleótidos libres para sintetizar nuevas cadenas de ADN complementarias. Esto da como resultado la formación de nuevas cadenas dobles de ADN a partir de las cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.²³

Estos tres pasos constituyen un ciclo de PCR, y este proceso se repite típicamente entre 20 y 40 ciclos, la cantidad de ADN se duplica en el mismo tubo de reacción, lo que conduce a una síntesis exponencial del segmento de ADN blanco con cada ciclo. La longitud del segmento amplificado se define desde los primeros ciclos de la reacción y es el resultado de la suma de la longitud de los iniciadores más la distancia del ADN blanco flanqueado por estos.^(23,24)

3.7 Electroforesis

La electroforesis es una técnica de laboratorio utilizada para separar moléculas cargadas, como ADN, ARN o proteínas, en función de su tamaño, carga y forma, mediante su migración a través de un medio poroso bajo la influencia de un campo eléctrico.²⁵ Su función se fundamenta en la aplicación de un campo eléctrico, que permite que las moléculas cargadas se desplacen hacia el electrodo de carga opuesta. La velocidad con la que la molécula migra de un punto al otro depende de varios factores, como el tamaño y la carga de la molécula, así como de las características que posee el medio de separación (entre ellas el pH de este).²⁶

La electroforesis es esencial en biología molecular, bioquímica y genética, proporcionando herramientas clave para el análisis y manipulación de biomoléculas en diversas aplicaciones científicas y médicas.²⁵ En biología molecular, existen una gran cantidad de técnicas que se realizan comúnmente y requieren el uso de la electroforesis, una de ellas suele ser la verificación de los resultados del proceso de la PCR, en la cual se utiliza gel de agarosa como polímero capaz de formar fibras helicoidales, que una vez solidificadas crean canales por donde migra el ADN.²⁷

La utilización de gel de agarosa tiene muchos beneficios y aplicaciones, entre ellos:

- Análisis de fragmentos de ADN: Permite estimar el tamaño y la concentración de fragmentos de ADN, facilitando técnicas como la clonación molecular y la detección de mutaciones.²⁸
- Purificación de ADN: Tras la separación, los fragmentos de ADN pueden extraerse del

gel para su posterior uso en experimentos.²⁸

- Detección de proteínas: Aunque es menos común, también se utiliza para separar proteínas según su tamaño y carga.²⁸
- Verificación de la integridad de ácidos nucleicos después de su aislamiento a partir de células.

Uno de los factores fundamentales del gel de agarosa es su concentración; de la cual dependerá la distancia que recorrerán las bandas en el gel y la longitud a la que estarán separadas unas bandas de otras, después se concluya el tiempo establecido.²⁷ Como generalidad se suelen tomar las siguientes concentraciones:

Tabla N° 1. Porcentaje de Gel: Resolución de ADN lineal en geles de agarosa.²⁹

Concentración recomendada (%)	Resolución óptima para ADN lineal (pb)
0.5	1,000-30,000
0.7	800-12,000
1.0	500-10,000
1.2	400-7,000
1.5	200-3,000
2,0	50-2,000

Ajustar la concentración del gel permite optimizar la técnica según el tamaño de las moléculas a analizar. Algunos efectos de la concentración del gel de agarosa en el proceso de electroforesis son:

- Tamaño de los poros del gel: La agarosa forma una red de poros en el gel; a mayor concentración, los poros son más pequeños, lo que facilita la separación de fragmentos pequeños, pero puede dificultar la migración de fragmentos grandes.³⁰
- Resolución de fragmentos pequeños: Concentraciones más altas de agarosa (por ejemplo, 2-3%) mejoran la resolución de fragmentos pequeños (menos de 500 pares de bases), permitiendo una separación más precisa.³⁰
- Resolución de fragmentos grandes: Concentraciones más bajas (por ejemplo, 0.7-1%) son adecuadas para separar fragmentos más grandes (más de 5,000 pares de bases), ya que los poros más grandes facilitan su migración.³⁰
- Integridad del gel: Geles con concentraciones muy altas pueden ser frágiles y propensos a romperse, mientras que concentraciones muy bajas pueden resultar en geles demasiado blandos para manipularse fácilmente.³⁰

- Tiempo de corrida: Geles con mayor concentración pueden requerir tiempos de corrida más largos debido a la mayor resistencia al paso de las moléculas a través de los poros más pequeños.³⁰

3.8 Estandarización del método PCR.

La estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en optimizar los parámetros de la reacción para obtener resultados fiables. Cada protocolo resulta eficaz para la amplificación de determinadas regiones con base en diferentes variables. Cada parámetro influye en la efectividad de la amplificación del gen de interés, y es con base en la experimentación de sus variables que se logra conseguir un protocolo eficiente.³¹

De igual manera es fundamental los ciclos en el proceso dado que permiten a los elementos de la PCR reaccionar adecuadamente para que el proceso de amplificación ocurra, por eso el planteamiento de gradientes térmicos para cada ciclo puede ser útil al establecer un protocolo térmico para el termociclador.³¹

3.8.1. Especificidad.

En los ensayos de PCR, la especificidad se refiere a la detección inequívoca de una secuencia genética apropiada y la diferenciación de cualquier otra secuencia de nucleótidos. Esto se consigue ejecutando en diferentes cepas de diferentes microorganismos que puedan compartir ciertas características taxonómicas, siendo la ausencia de amplificaciones la evidencia de que el protocolo resulta específico para las cepas de estudio, según Vizcaíno (2017).³²

La especificidad de la PCR depende de los ciclos térmicos establecidos en la fase de hibridación y de la cantidad de iones divalentes añadidos a la reacción. Esto se debe a que, mientras mayor sea la temperatura empleada en esta fase, más específica será la reacción, en las temperaturas altas en fase de hibridación los primers o cebadores se unirán solo a la cadena molde cuando haya complementariedad total en todos sus nucleótidos, según lo explica Pérez (2011).³³

La especificidad de la PCR no solo depende de las condiciones de hibridación (temperatura de alineamiento) y la concentración de iones divalentes, sino también de la validación experimental del sistema de amplificación. En este contexto, la verificación de la especificidad se realizó utilizando ADN de una sola especie bacteriana, en este caso *Escherichia coli* NCTC 13846, lo que permite comprobar que los cebadores diseñados amplifican únicamente la

secuencia diana y no generan amplificaciones inespecíficas.

Al emplear ADN puro de una única especie de referencia, se reduce la posibilidad de que existan secuencias homólogas provenientes de otros microorganismos que pudieran hibridar con los cebadores. De esta manera, si bajo las condiciones térmicas establecidas (especialmente una temperatura de hibridación adecuada) se obtiene un único producto de amplificación del tamaño esperado, se confirma que la reacción es altamente específica. Esto indica que los cebadores presentan complementariedad exclusiva con la secuencia blanco presente en el genoma de la cepa analizada.

3.8.2. Sensibilidad.

La sensibilidad, según Vizcaíno, se refiere a la capacidad de un sistema o modelo para responder a cambios en las condiciones o parámetros de entrada. En el caso de la PCR, la sensibilidad se refiere a la capacidad del método para detectar la presencia de secuencias de ADN específicas en muestras con bajas concentraciones de ADN.³²

Villacreses (2021), establece que varios factores pueden influir en la sensibilidad de la PCR, incluida la eficiencia de la amplificación, la especificidad del cebador y las condiciones de reacción, para la estandarización de la PCR es importante garantizar una sensibilidad y confiabilidad del método en diferentes aplicaciones.³⁴

3.9 Cuantificación de ADN mediante el espectrofotómetro NanoDrop.

La lectura espectrofotométrica de NanoDrop se basa en el principio de absorbancia del espectro ultravioleta-visible (UV-Vis), donde los ácidos nucleicos absorben la luz con un pico a 260 nm, las proteínas purificadas absorben la luz con un pico a 280 nm, mientras que los péptidos y las proteínas que carecen de residuos de triptófano y tirosina absorben con un pico a 205 nm. Muchos de los contaminantes que resultan de los protocolos de extracción se absorben a 280 nm o 230 nm.³⁵

3.9.1 Cuantificación de muestras de ácidos nucleicos y proteínas.

Las concentraciones de ácidos nucleicos y proteínas se calculan automáticamente a partir de sus valores de absorbancia medidos en la longitud de onda deseada utilizando la ecuación de Beer-Lambert, donde:³⁵

$$C = \frac{A}{\epsilon L}$$

C = concentración en moles (M)

A = Absorbancia UV en unidades de absorbancia (AU)

ϵ = coeficiente de absortividad molar dependiente de la longitud de onda (o coeficiente de extinción) en M-1 cm-1

L = longitud del recorrido de la luz en cm

Una de las consecuencias de la ecuación de Beer-Lambert es que, en el caso de muestras de baja concentración, una mayor longitud de trayectoria da como resultado una mayor precisión y una mejor relación señal-ruido. Los instrumentos NanoDrop optimizan automáticamente la longitud de la columna de líquido para lograr la máxima precisión en un amplio rango de concentraciones.³⁵

3.9.2 Análisis de pureza de muestras de ácidos nucleicos y proteínas.

La pureza de una muestra se puede evaluar mediante la relación de absorbancia de una longitud de onda con otra. La contaminación de la muestra puede dar lugar a una sobrestimación de la concentración de ácido nucleico o a imprecisiones en los procesos o mediciones posteriores. Más allá de las proporciones de pureza, las impurezas pueden alterar los perfiles espectrales, desplazando picos y valles.³⁵

Tabla N° 2. Relaciones de pureza clave para la absorbancia UV.³⁵

Relación	Analito	Concentración considerado "puro"	Factores que pueden causar proporciones anormales
A260/A280	Ácidos nucleicos	ADN: ~1,8 ARN: ~2,0	Contaminantes indicados por proporciones bajas: <ul style="list-style-type: none"> - Proteínas. - Fenol residual u otros reactivos utilizados en el protocolo de extracción.
A260/A230	Ácidos nucleicos	ADN/ARN: ~2,0–2,2	Contaminantes indicados por proporciones bajas: <ul style="list-style-type: none"> - Proteínas. - Arrastre de carbohidratos (a menudo un problema con las plantas). - Fenol residual de la extracción de

			<ul style="list-style-type: none"> ácidos nucleicos. - Guanidina residual (a menudo utilizada en kits basados en columnas). - El glucógeno se utiliza para la precipitación. Factores indicados por ratios altos. - Problemas con la medición en blanco.
A260/A280	Proteínas	~0,6	Contaminantes indicados por proporciones altas: <ul style="list-style-type: none"> - Ácidos nucleicos

3.10 Método de secuenciación.

La secuenciación del ADN significa determinar el orden de los cuatro componentes básicos químicos, llamados "bases", que forman la molécula de ADN. La secuencia les informa a los científicos la clase de información genética que se transporta en un segmento específico de ADN. Por ejemplo, los científicos pueden usar la información de las secuencias para determinar qué tramos de ADN contienen genes y qué tramos transportan instrucciones regulatorias, que activan o desactivan genes. Además, y de manera muy importante, los datos de las secuencias pueden resaltar los cambios en un gen que pueden causar enfermedades.³⁶ En la doble hélice de ADN, las cuatro bases químicas se unen siempre con la misma pareja para formar "pares de bases". Adenina (A) siempre forma pareja con timina (T); citosina (C) siempre forma pareja con guanina (G).³⁶

3.10.1. Secuenciación de Sanger por electroforesis capilar.

La secuenciación de Sanger por electroforesis capilar es una técnica potente que se utiliza habitualmente para estudiar la expresión génica, identificar variantes de fracciones poco alélicas y validar métodos de secuenciación de nueva generación (NGS). Desarrollada por Frederick Sanger y su equipo en 1977, este método utiliza didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) de terminación de cadena marcados con fluorescencia y la posterior separación por tamaño mediante electroforesis capilar para determinar el orden preciso de los residuos de ácidos nucleicos en una molécula de ADN.³⁷

La secuenciación de Sanger, que se basa en el principio y la bioquímica de la replicación del ADN, sigue dos pasos básicos:

- PCR utilizando didesoxinucleótidos de terminación de cadena fluorescente (ddNTP): utiliza los mismos componentes que el método estándar de PCR, pero con una diferencia clave: la adición de didesoxinucleótidos (ddNTP) marcados con fluorescencia a la mezcla de reacción, estructuralmente, los ddNTP se diferencian de los desoxinucleótidos (dNTP) en que el carbono 3' de la desoxirribosa está unido a una molécula de hidrógeno (-H) en lugar de a un grupo hidroxilo (-OH). Esta ausencia del grupo 3'-OH interrumpe la reacción de condensación durante la replicación del ADN e impide una mayor extensión del amplicón. El resultado de muchas de estas reacciones es una gran cantidad de fragmentos de ADN fluorescentes terminados en longitudes aleatorias.³⁷
- Separación por tamaño y análisis mediante electroforesis capilar: los fragmentos de ADN se inyectan electrocinéticamente en capilares muy finos rellenos de polímero y, bajo la influencia de un campo eléctrico, migran a través de la matriz capilar. Los fragmentos se separan por tamaño, siendo los más pequeños los que se desplazan más rápido. A medida que pasan por la ventana de detección, un láser excita las etiquetas fluorescentes en cada banda, y la luz emitida se separa espectralmente y se registra mediante una cámara CCD. El software del instrumento analiza los datos sin procesar y los genera como un cromatograma que ilustra el pico fluorescente de cada nucleótido a lo largo de la plantilla de ADN.³⁷

CAPÍTULO IV

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio.

Exploratorio: la presente investigación servirá como antecedente para futuras investigaciones relacionadas con el tema, ya que a través del presente estudio se exploró que la cepa *Escherichia coli* NCTC 13846 portará el gen de resistencia *bla*TEM-1 y la secuencia específica de dicho gen.

Experimental: se realizaron una serie de ensayos microbiológicos para comprobar el perfil fenotípico de resistencia de la cepa NCTC 13846 de *Escherichia coli* a través de galerías miniaturizadas “MicroScan Neg BP Combo Panel Type 34” y pruebas moleculares a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la estandarización de un método PCR convencional para la detección del gen *bla*TEM-1 de la misma cepa de referencia. Dicha parte se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo en la Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

Tabla N° 3: Definición y medición de variables por objetivo específico.

Objetivo específico.	Variables.	Tipo.	Medición.
Comprobar el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846 a través de galerías ATB MicroScan Neg BP Combo Panel Type 34	Antibióticos de prueba.	Cualitativo.	Sensible, intermedio o resistente a antibióticos.
Evaluar el empleo de diferentes concentraciones de cebadores específicos en el protocolo de reacción de PCR para la detección del gen <i>bla</i> TEM-1 de	Concentración de cebadores 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.1, 1.2 y 10 μ M. Condiciones del termociclador:	Cualitativo	- No amplifica. - Amplifica varias bandas. - Amplifica solo una banda.

<i>Escherichia coli</i> NCTC 13846.	Desnaturalización inicial 5 min a 94°C, seguido por 35 ciclos por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min y extensión final a 72°C por 10 min
Determinar la reproducibilidad y especificidad del método de PCR para La Identificación del gen de resistencia <i>bla</i> TEM-1 de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13846.	Reproducibilidad y especificidad del método PCR. La
	Cuantitativo.
	% de concordancia $\geq 95\%$
	Especificidad $\geq 99\%$

Fuente: Elaboración propia.

4.2 Investigación bibliográfica.

- Biblioteca Científica Electrónica en Línea (SciELO).
- Biblioteca Electrónica de ELSEVIER INC.
- Manual de Normas de desempeño para pruebas de susceptibilidad del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI).
- ResearchGate GmbH (ResearchGate).
- Repositorio institucional Universidad de El Salvador.
- National Institutes of Health (NIH).
- Fisher Scientific.
- The Indonesian Biomedical Journal.
- Biblioteca electrónica de Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

- Biblioteca electrónica de Universidad de Córdoba.
- Organización Mundial de la Salud.
- Repositorio de Universidad Politécnica Salesiana.
- Repositorio de Universidad Autónoma de México.

4.3 Parte experimental.

4.3.1. Manejo e inoculación de la Cepa de referencia *Escherichia coli* NCTC 13846.

Procedimiento (Ver anexo N° 1).

1. Se preparó apropiadamente el medio adecuado para realizar un estriado e incubar en las condiciones que sugiere el proveedor. En el cual se utilizó agar TSA según lo indica el proveedor. (Ver anexo N° 2).
2. Identificamos el cultivo mediante el número NCTC en el papel interior o en la etiqueta de la ampolla.
3. Se rompió la ampolla en la parte superior donde contiene el fluido hidratante incluido en el tubo con la cepa *Escherichia coli* NCTC 13846, la cual fue conseguida bajo la marca KWIK STIK por presentación de 2 unidades.
4. Se dejó hidratar el pellet del microorganismo ya liofilizado y posteriormente se cultivó en agar TSA.
5. Incubamos por 24 horas a 37°C. Del primer pase se realizaron 5 repeticiones en tubos inclinados de TSA los cuales fueron nuestros cultivos de trabajo.

4.3.2. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana por medio de Galerías MicroScan Neg BP Combo

Panel Type 34.

Procedimiento.³⁸ (Ver anexo N° 3):

1. Se preparó una suspensión bacteriana partiendo de un cultivo de 24 horas de *Escherichia coli* NCTC 13846 con solución de cloruro de sodio al 0.85%, la cual se llevó a una concentración de 0.5 en la escala McFarland.
2. Abrimos la galería y agregamos 115 microlitros de la suspensión anterior a cada pocillo del sistema para conseguir entre 10^{-4} - 10^{-5} bacterias/pocillos.
3. Se incubó por 24-48 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. La lectura de las galerías se realizó de forma visual; los resultados obtenidos se clasificaron como, sensible, intermedia y resistente. Nota: la interpretación de la lectura de las galerías, se basa en la interpretación de la turbidez presente en cada pocillo, es decir, si en dos pocillos presenta turbidez es resistente; si presenta en un pocillo turbidez y en otro no, es intermedio; si en ambos pocillos no se muestra turbidez es sensible.

4.3.3 Análisis Molecular.

Nota: se utilizó el Kit PureLink genomic.

4.3.3.1 Lisado de Células de *Escherichia coli* NCTC 13846.

Procedimiento (Ver anexo N° 4).³⁹

1. Tomar un 1 mL de suspensión de *Escherichia coli* NCTC 13846 y centrifugar a 5,000 g x 20 minutos. (la suspensión fue estandarizada tomando como patrón el estándar 0.5 McFarland).
2. Suspender el sedimento celular en 180 µL de tampón de digestión genómica PureLink y agregar 20 µL de proteinasa K suministrada por el Kit Purelink para lisar las células. Se mezcló correctamente.
3. Incubar el tubo a 70°C por 30 minutos con agitación vorticial hasta que se complete la lisis.
4. Agregar 20 µL de ARNasa A (suministrada por el kit Purelink) al lisado, agitar e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
5. Añadir 200 µL de tampón unión/lisis genómica PureLink® el cual se mezcló bien con agitación constante para obtener una solución homogénea.
6. Agregar 200 µL de isopropanol al lisado, mezclando con agitación en vortex durante 5 segundos para producir una solución homogénea.

4.3.3.2 Unión de ADN.

Procedimiento (Ver anexo N° 5):

1. Retirar una columna de centrifugación PureLink en un tubo de recolección del paquete.

2. Agregar el lisado (aproximado de 640 μ L preparado con PureLink tampón de unión/lisis genómica y el etanol a la columna de centrifugación PureLink).
3. Centrifugar la columna a 10000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Desechar el tubo de recolección y colocar la columna de centrifugación en un tubo PureLink limpio (tubo de recogida suministrado con el Kit).

4.3.3.3 Lavado de ADN.

Procedimiento (Ver anexo N° 5):

1. Agregar 500 μ L de tampón de lavado 1 preparado con etanol (de los pasos de UNIÓN DE ADN) a la columna.
2. Centrifugar la columna a temperatura ambiente a 10.000 x g durante 1 minuto.
3. Desechar el tubo de recolección y colocar la columna de centrifugación en un tubo PureLink® limpio. (Tubo de recogida suministrado por el kit).
4. Agregar 500 μ L de tampón de lavado 2.
5. Centrifugar la columna a 5000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. (se desechó el tubo de recolección).

4.3.3.4 Elución de ADN.

Procedimiento (Ver anexo N° 5):

1. Colocar la columna de centrifugación en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL.
2. Agregar 50 μ L de PureLink® Genomic Elution Buffer a la columna.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar la columna a 20,000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. El tubo contiene purificado ADN genómico.
4. Centrifugar la columna a 20,000 g durante 1.5 minutos a temperatura ambiente. El tubo contiene ADN purificado. Retiramos y desechamos la columna.
5. Cuantificar el material extraído por medio del espectrofotómetro de la marca “Nanodrop”. Además, comprobar por medio de electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

4.4 Evaluación de empleo del gradiente de concentración de cebadores específicos del protocolo de PCR.

4.4.1 Cebadores para amplificación del gen *bla*TEM-1.

La estructura de los cebadores utilizados para la ampliación de los genes propuestos se estableció según lo descrito por Fang H et al. (2008) y se detalla en la tabla N° 4.⁽⁴²⁾

Tabla N°4. Cebadores para la identificación de bacterias.

Gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño de ampliación (bp)
<i>bla</i> TEM-1	F: TTG GGT GCA CGA GTGGGT R: TAA TTG TTG CCG GGA AGC	500b

Fuente: elaboración propia basado en Fang H et al. (2008)⁴²

4.4.2 Gradiente de concentración de cebadores.

Determinación de concentraciones óptimas de cebadores:¹⁶

1. Se realizó una solución madre con concentración inicial de 10 μ M por cada cebador.
2. Preparamos diferentes master mix en donde varía el volumen de los cebadores cuya dilución permite alcanzar las concentraciones de: 0.2 μ M, 0.4 μ M, 0,6 μ M, 0,8 μ M y 1.0 μ M. (Ver tabla N° 5 “Preparación de diluciones de cebadores”).
3. Verificar que cada master mix cuente con los cebadores Forward y Reverse específicos para cada gen. Los volúmenes para cada reacción se especifican en la tabla N° 7.
4. Asegurándonos que cada tubo de master mix contenga un volumen final de reacción de 22.0 μ L.

Tabla N° 5. Preparación de diluciones de cebadores.

Preparación de diluciones para el cebador Forward					
Componente	0.2 μ M	0.4 μ M	0.6 μ M	0.8 μ M	1.0 μ M
Primer Forward	2.0 μ L	4. 0 μ L	6.0 μ L	8.0 μ L	10.0 μ L

Agua libre de nucleasas	98 µL	96 µL	94 µL	92 µL	90 µL
Preparación de diluciones para el cebador Reverse					
Primer Reverse	2.0 µL	4.0 µL	6.0 µL	8.0 µL	10.0 µL
Agua libre de nucleasas	98 µL	96 µL	94 µL	92 µL	90 µL

Fuente: elaboración propia.

Nota: Las extracciones realizadas para las amplificaciones fueron cuantificadas por medio del espectrofotómetro de la marca “Nanodrop”. Además, se comprobó por medio de electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

4.4.3. Procedimiento para la PCR.

Procedimiento:¹⁶

1. Establecer un protocolo PCR con temperaturas y ciclos térmicos basados en los propuestos por Castillo E, Casa J (2024) enfocados en la amplificación de genes en Enterobacterias.¹⁶
2. Iniciar con la fase de experimentación con la prueba de un protocolo diseñado con base en especificaciones establecidas por Hong Fang (2008) en aislamientos de *Escherichia coli*, que emplean los valores máximos delimitados en los gradientes térmicos para cada fase y los valores mínimos delimitados de tiempo para cada ciclo, los cuales son establecidos específicamente para el gen *bla*TEM-1; los datos se presentan en la tabla N° 6.^(16,42)

Tabla N° 6. Protocolo de termociclador para ensayo de PCR.⁴³

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	15 minutos	-
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Hibridación	62°C	90 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	-

3. Verificar que las reacciones de amplificación por PCR se realicen en un volumen de

25.0 μL como volumen de reacción, los volúmenes que se utilizan de cada componente de la master mix están expresados en la siguiente tabla:

Tabla N° 7. Volúmenes de componentes para prueba de protocolo térmico.¹⁶

Componente.	Volumen (μL).
PCR Super mix	18.0 μL
Primer Forward	1.0 μL
Primer Reverse	1.0 μL
Agua libre de nucleasas	2.0 μL
ADN	3.0 μL

4. Llevar a cabo la amplificación programando el protocolo especificado en la tabla N° 6. En un termociclador PCR punto final MiniAmp de 96 pocillos.
5. Programar el termociclador con dicho protocolo. La placa en donde se cargarán las muestras contará con un control negativo.

Nota: Las condiciones a variar fueron las concentraciones de los cebadores específicos, basándonos en las condiciones propuestas por Hong Fang (2008).

4.4.4 Electroforesis en gel de agarosa.

Procedimiento (Ver anexo No.6 y 7):¹⁶

1. Preparar un gel de agarosa al 1.5%.
2. Pesar 1,5 gramos de gel en 100 mL de Buffer TAE 10X.
3. Disolver el gel de agarosa calentando el matraz en un microondas por 1 minuto y medio o hasta lograr una solución homogénea.
4. Una vez disuelto el gel, dejar enfriar alrededor de 55 °C y añadir 1.0 μL de Gel Red, verter en el soporte porta gel, colocar el peine (que permite formar los pocillos) en el porta peine y dejar endurecer.
5. Instalar el soporte porta gel dentro de la cámara de electroforesis de manera que el ADN migre del polo negativo al positivo.

6. Verter solución tampón TAE hasta cubrir el gel y retirar el peine.
7. Mezclar, sobre papel parafilm, 2.5µL de agua libre de nucleasas y 2.5µL de marcador de peso molecular, inocular la mezcla (5.0µL) en el primer pocillo del gel de agarosa.
8. Mezclar, sobre papel parafilm, 2.0µL de Loading Buffer y 5.0µL de muestra amplificada, inocular esta mezcla (7.0µL) en el segundo pocillo del gel. Repetir la mezcla con Loading Buffer para las demás muestras y el control negativo, e inocular en los siguientes pocillos
9. Iniciar la corrida electroforética a 110 voltios por 60 minutos.

4.4.5 Determinación de la reproducibilidad y especificidad del método de PCR.

Procedimiento 1: Determinación de la reproducibilidad del método de PCR para la determinación del gen *bla*TEM-1.

1. Ejecutar el protocolo para la amplificación del gen propuesto *bla*TEM-1, en el microorganismo de *Escherichia coli* NCTC 13846.
2. Preparar una master mix para el gen *bla*TEM-1 a una concentración de 10µM de cebadores forward y reverse.
3. Amplificar las muestras en el termociclador corriendo el protocolo previamente establecido (tabla N° 6).
4. Verificar el producto de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de concentración a 110 voltios por 60 minutos, y realizando la lectura a luz UV.
5. Realizar 6 repeticiones siguiendo los pasos del 3 al 5.
6. Calcular el porcentaje de concordancia mediante la siguiente ecuación:⁴⁴

$$\%Concordancia\ porcentual = \frac{\text{Número de resultados concordantes}}{\text{Número de muestras}} \times 100$$

Procedimiento 2: Secuenciación del gen *bla*TEM-1.

Nota: Se utilizará el producto de amplificación obtenido del procedimiento 1.

1. Verificar el producto de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de concentración a 110 voltios por 60 minutos, y realizando la lectura a luz UV.
2. Diluir el producto de amplificación obtenido, utilizando agua libre de nucleasas, hasta una concentración de 10 ng/µL. y se prepararon por separado los cebadores forward y reverse a una concentración de 5 pmol/µL (5µM).

3. La muestra y los cebadores se embalaron y enviaron a la empresa MACROGEN para realizar la purificación y secuenciación del producto de amplificación. (Ver anexo N° 8).

CAPÍTULO V

5.2 Evaluar el empleo de diferentes concentraciones de cebadores específicos en el protocolo de reacción de PCR para la detección del gen *bla*TEM-1 de *Escherichia coli* NCTC 13846.

5.2.1 Verificación de calidad y pureza de DNA de *Escherichia coli* NCTC 13846.

En la siguiente tabla, se presentan los resultados de las diferentes concentraciones de ADN de *Escherichia coli* NCTC 13846 para diferentes propósitos y su relación A260/280, A260/230, obtenido por medio del uso del nanodrop.

Tabla N° 9. Concentración y pureza del ADN genómico de *E. coli* NCTC 13846 cuantificado por espectrofotometría.

Muestra	Propósito de la extracción	Concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	A260/280	A260/230
E1	Inicial	5.415	1.188	-1.37
EA2	Amplificación 2	6.070	1.5669	0.567
EA3	Amplificación 3	6.827	1.269	0.401
EG4	Gradiente	6.780	1.275	0.405
ER5	Repetición	5.710	1.895	2.039

Nota: E1= extracción inicial 1; EA2=Extracción para amplificación 2; EA3 = Extracción para amplificación 3; EG4 = extracción para gradiente de concentración; ER5= Extracción para repeticiones del protocolo.

En la Tabla 9 se presentan los resultados de la cuantificación del ADN de *Escherichia coli* NCTC 13846. Se obtuvieron concentraciones de material genético entre 5.41 y 6.83 microgramos/microlitro, las cuales se consideran adecuadas para los propósitos de la investigación. Respecto a la pureza, se tomó como referencia el valor ideal de 1.8 para la relación de absorbancia A260/280. Las muestras procesadas presentaron un rango de 1.19 a 1.89. Aunque algunos valores se encuentran por debajo del óptimo teórico, lo que sugiere la presencia de residuos del proceso de extracción, los resultados fueron funcionales. De igual forma, la relación A260/230 mostró variabilidad, lo cual es indicativo de un posible arrastre de sales; sin embargo, se determinó que estas impurezas no interfirieron con el proceso de amplificación, permitiendo la detección exitosa del gen *bla*TEM-1.

5.2.2 Verificación de la Integridad y Pureza del DNA extraído a través de Electroforesis en gel.

A continuación, en la figura N° 2 se presenta la integridad del material genético extraído de *Escherichia coli* NCTC 13846.

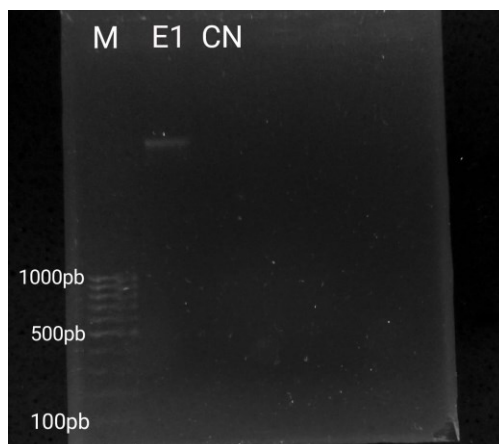


Figura N° 2: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular (M). Carril 2 correspondientes al material genético (E1) de *Escherichia coli* NCTC 13846 obtenido en el proceso de extracción. Carril 3 correspondientes al control negativo (CN) llevado junto a la muestra E1 durante el proceso de extracción del material genético.

En la muestra E1, la evaluación de la calidad del ADN mediante las relaciones de absorbancia teóricas ($A_{260}/A_{280} \approx 1,8$ y $A_{260}/A_{230} \approx 2,0-2,2$) y los datos experimentales obtenidos evidenció una discrepancia significativa, ya que los valores experimentales ($A_{260}/A_{280} = 1,188$ y $A_{260}/A_{230} = -1,37$) indicaron una baja pureza del ADN, asociada principalmente a contaminación por proteínas o arrastre de reactivos de la extracción. Desde el punto de vista teórico, los valores sugerirían un ADN de calidad limitada y potencialmente no apto para aplicaciones moleculares sensibles.

Sin embargo, al realizar la corrida en gel de agarosa al 1,5 %, se observó la presencia de una banda definida, aunque de intensidad tenue, lo cual confirma experimentalmente la existencia de ADN genómico en la muestra E1. Este resultado demuestra que, a pesar de la baja pureza indicada por las relaciones de absorbancia, el ADN se encuentra presente e íntegro en una cantidad suficiente para ser visualizado mediante electroforesis. La tenue intensidad de la banda es coherente con la baja concentración de ADN y con la presencia de contaminantes que pueden afectar la cuantificación espectrofotométrica y la eficiencia de la tinción en el gel.

La discrepancia entre los valores teóricos y los resultados experimentales puede atribuirse a que las relaciones A260/A280 y A260/A230 evalúan pureza química, pero no necesariamente la presencia física del ADN. En este caso, la electroforesis en gel cumple su objetivo principal, que es evidenciar la presencia de la banda de ADN, independientemente de la pureza óptima de la extracción. Por lo tanto, aunque los datos espectrofotométricos indican una calidad baja del ADN de la muestra E1, la visualización de la banda en el gel confirma que la extracción fue exitosa en términos de recuperación de ADN. Sin embargo, la baja pureza observada sugiere que sería necesario optimizar el protocolo de extracción o realizar pasos adicionales de purificación para mejorar la calidad del ADN y garantizar su desempeño en aplicaciones moleculares posteriores.

5.2.3 Evaluación de las condiciones del termociclador para amplificación y gradiente de concentración de cebadores específicos del gen de resistencia *bla*TEM-1 en el protocolo de reacción de PCR.

Se inició evaluando las condiciones de temperaturas para el termociclador (ver tabla N°10) propuestas por Hong Fang (2008), para ello se empleó la concentración de cebadores de 10 μ M en la preparación de la mastermix. El producto de amplificación obtenido se comprobó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% donde se observa una banda integra a 500 pb (ver figura N°3), lo que concuerda con lo reportado por Mumbo et al. (2023), quienes describen un amplicón de tamaño similar para dicho gen de resistencia.

Tabla N° 10. Condiciones de temperaturas utilizadas en el termociclador para protocolo de PCR.⁴²

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	15 minutos	-
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Hibridación	62°C	90 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	-

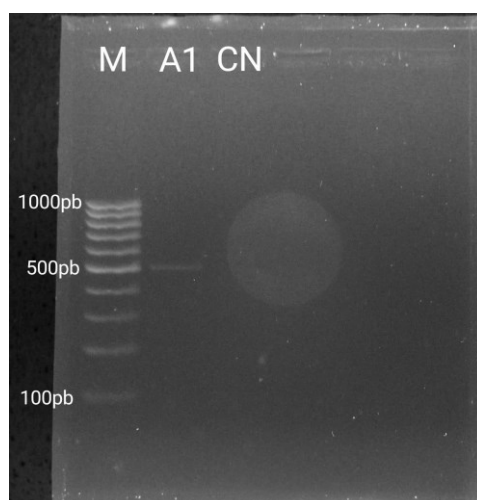


Figura N° 3: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular (M). Carril 2 correspondientes al gen de resistencia *bla*TEM-1 amplificado (A1) de *Escherichia coli* NCTC 13846. Carril 3 correspondientes al control negativo (CN) llevado junto a la muestra A1 durante el proceso de amplificación.

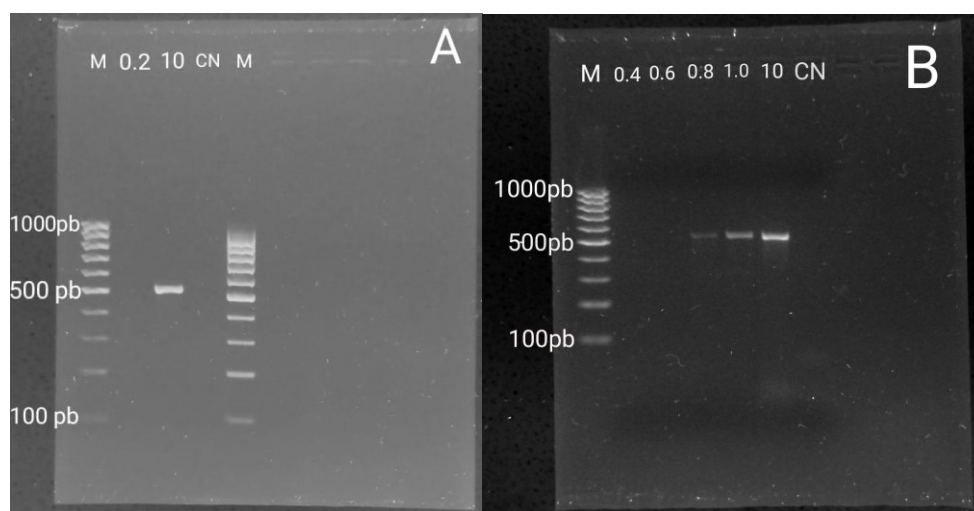


Figura N° 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Figura 4-A: Carril 1 y 5 correspondiente al marcador de peso molecular (M); Carril 2 correspondiente a la amplificación utilizando cebador a 0.2 μ M; Carril 3 correspondiente a la amplificación utilizando cebador 10 μ M; Carril 4 correspondiente al control negativo (CN). Figura 4-B: Carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular (M); Carril 2 correspondiente a la amplificación utilizando cebador a 0.4 μ M; Carril 3 correspondiente a la amplificación utilizando cebador 0.6 μ M; Carril 4 correspondiente a la amplificación utilizando cebador a 0.8 μ M; Carril 5 correspondiente a la amplificación utilizando cebador a 1.0 μ M, Carril 6 correspondiente a la amplificación utilizando cebador a 10 μ M, Carril 7 correspondiente al control negativo (CN).

Se realizó un gradiente de concentración de cebadores 0.2 μM a 10 μM para determinar las condiciones óptimas de reacción. Las concentraciones de 0.2, 0.4 y 0.6 μM resultaron insuficientes para la detección del amplicón (ver figura 4-A y 4-B). Sin embargo, a partir de la concentración de 0.8 μM se observaron bandas nítidas y de la intensidad esperada, aproximadamente a 500 pb (ver figura 4-B). Por tanto, se estableció 0.8 μM como la concentración óptima de trabajo, ya que esta constituye la mínima cantidad de cebadores necesaria para garantizar una amplificación específica y reproducible, minimizando el riesgo de formación de dímeros o artefactos inespecíficos que podrían presentarse en concentraciones superiores como la de 10 μM .

5.3 Determinar la reproducibilidad y especificidad del método de PCR para la identificación del gen de resistencia *bla*TEM-1 de *Escherichia coli* NCTC 13846.

5.3.1 Reproducibilidad del protocolo de PCR para detección del gen *bla*TEM-1.

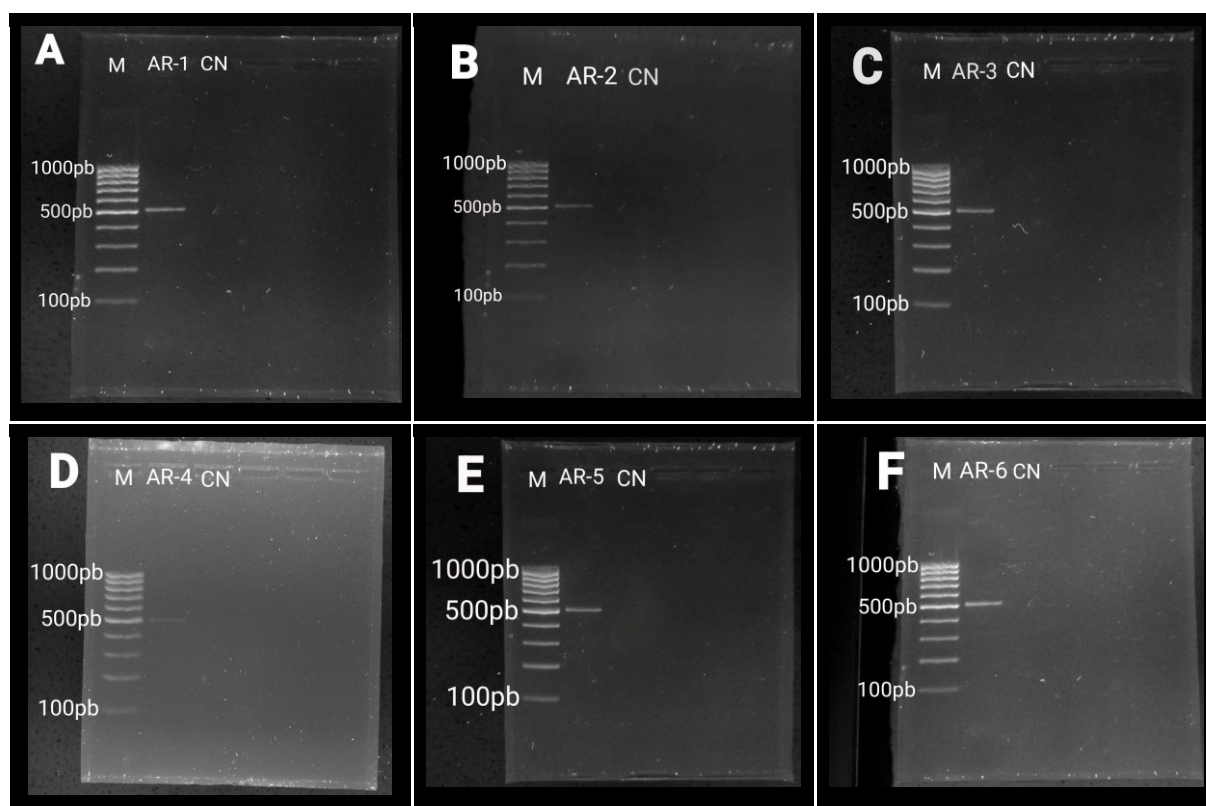


Figura N° 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Figura 5-A: Carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular (M); Carril 2 correspondiente a la repetición 1 de la amplificación del gen *bla*TEM-1 (AR-1); Carril 3 correspondiente al control negativo (CN).

Figura 5-B: Carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular (M); Carril 2 correspondiente a la repetición 2 de la amplificación del gen *bla*TEM-1 (AR-2); Carril 3

correspondiente al control negativo (CN). Figura 5-C: Carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular (M); Carril 2 correspondiente a la repetición 3 de la amplificación del gen *bla*TEM-1 (AR-3); Carril 3 correspondiente al control negativo (CN). Figura 5-D: Carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular (M); Carril 2 correspondiente a la repetición 4 de la amplificación del gen *bla*TEM-1 (AR-4); Carril 3 correspondiente al control negativo (CN). Figura 5-E: Carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular (M); Carril 2 correspondiente a la repetición 3 de la amplificación del gen *bla*TEM-1 (AR-5); Carril 5 correspondiente al control negativo (CN). Figura 5-F: Carril 1 correspondiente al marcador de peso molecular (M); Carril 2 correspondiente a la repetición 6 de la amplificación del gen *bla*TEM-1 (AR-6); Carril 3 correspondiente al control negativo (CN).

Se realizaron 6 repeticiones individuales, por distinto analista y en distintos días, donde se prepararon por separado 6 mastermix empleando la misma cantidad de reactivos y cebadores a 10 μ M, estas se amplificaron individualmente y el resultado se comprobó por medio de electroforesis en distintos geles de agarosa al 1.5% (ver figura N° 5). Las 6 repeticiones distintas realizadas empleando las mismas condiciones, presentaron una banda nítida y bien definida aproximadamente a 500 pb perteneciente al gen de resistencia *bla*TEM-1 de *Escherichia coli* NCTC 13846.

Si bien la concentración de cebador de 10 μ M es un tanto elevada para utilizarse en mezclas finales de PCR, al tratarse de una cepa pura se minimiza la probabilidad de presentar formación de dímeros o artefactos inespecíficos en la amplificación que puedan afectar la visualización del gen de resistencia en el gel de agarosa, por lo tanto, es una concentración apropiada para utilizarse en esta etapa de estudio.

Para demostrar estadísticamente la reproducibilidad del método propuesto, se determinó el porcentaje de concordancia por medio de la siguiente ecuación:

$$\%Concordancia\ porcentual = \frac{\text{Número de resultados concordantes}}{\text{Número de muestras}} \times 100$$

$$\%Concordancia\ porcentual = \frac{6}{6} \times 100$$

$$\%Concordancia\ porcentual = 100\%$$

5.3.2 Especificidad del método de PCR para la identificación del gen de resistencia *bla*TEM-1 de *Escherichia coli* NCTC 13846.

5.3.2.1 Secuenciación del gen *bla*TEM-1.

Para realizar la secuenciación, el producto de amplificación junto con los cebadores, se enviaron a Macrogen para ser purificado y su posterior análisis de “Secuenciación Sanger con electroforesis capilar (CES)”. La muestra fue enviada a temperatura ambiente en tubos de microcentrífuga herméticamente sellados con papel parafilm, y colocados en una caja para evitar derrames.

El producto de amplificación obtenido se encontraba a 500 pb, por tanto, el marcador de peso molecular nos indica que la muestra posee una concentración de 156 ng/5 μ L (ver anexo N° 9), la muestra se diluyó hasta obtener una concentración de 10 ng/ μ L. Los cebadores forward y reverse se prepararon a una concentración de 5 pmol/ μ l (5 μ M) utilizando agua libre de nucleasas. Esto con el fin de cumplir con los requisitos que especifica Macrogen para obtener una secuenciación óptima. (Ver tabla N° 11)

Al realizar el pedido, el producto de amplificación se identificó como “AbT-2”, y se identificó el cebador forward como “*bla*TEM-1F” y reverse como “*bla*TEM-1R”, y se rotulan los tubos de microcentrífuga de esta misma manera

Tabla N° 11: Preparación de muestra y cebadores para secuenciación de Sanger con electroforesis capilar.

Nombre	Concentración	Volumen enviado (μ L)	Condiciones de envío
Producto de amplificación “AbT-2”	10 ng/ μ L	25	Tubos de microcentrífuga a temperatura ambiente, herméticamente sellados.
Cebador o primer forward “ <i>bla</i> TEM-1F”	5 pmol/ μ L (5 μ M)	10	
Cebador o primer reverse “ <i>bla</i> TEM-1R”	5 pmol/ μ L (5 μ M)	10	

Tabla N° 12: Secuencia de ADN genómico.

A continuación, se presenta la secuencia del ADN genómico del gen de resistencia *bla*TEM-1 de *Escherichia coli* NCTC 13846.

Muestra	Secuencia de ADN genómico
AbT-2_ <i>bla</i> TEM-1F	CCCTCTATGACTCCGCGGTAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCC CGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC TATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAG CAACTCGGTCCGCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGT TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGC ATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGA GTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGA GGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGG ATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAAT GAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTG CAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGA ACTACTTACTCTAGCTTCCCG
AbT-2_ <i>bla</i> TEM-1R	CTCTTCCCTTTACAACAGTTATAGTTTGCGCAACGTTGTTGC CATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTA TGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTT ACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTT CGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCAGCAGTGT TATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACT GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTA CTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCG AGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAAATCCGCACC ACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGT TCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAG ATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAA
Secuencia consenso	GAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGAT CCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGT GTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACT ATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAA AAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCA GTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTA CTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTT TTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGT TGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGC GTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG CAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCC

Para determinar la especificidad se realizó una validación bioinformática, en la que los

electrogramas obtenidos (ver anexo N° 10 y 11) fueron procesados en el software FinchTV para el control de calidad y recorte de extremos (trimming). Las secuencias depuradas se ensamblaron mediante el programa “CAP3 Sequence Assembly Program” para obtener una secuencia consenso (ver tabla N° 12). Finalmente, la identidad genética se confirmó mediante la herramienta BLASTn del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI), utilizando como criterios de aceptación un porcentaje de identidad (Identities) que fué del 100% y un E-value (Expect) de 0.0, que nos confirman que la secuencia obtenida pertenece al gen *bla*TEM-1 de *Escherichia coli* NCTC 13846. (Ver anexo N° 12)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
893 bits(483)	0.0	483/483(100%)	0/483(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCG			60
Sbjct 122				181
Query 61	AAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCC			120
Sbjct 182				241
Query 121	GTGTTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGG			180
Sbjct 242				301
Query 181	TTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT			240
Sbjct 302				361
Query 241	GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATCG			300
Sbjct 362				421
Query 301	GAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTG			360
Sbjct 422				481
Query 361	ATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGC			420
Sbjct 482				541
Query 421	CTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTT			480
Sbjct 542				601
Query 481	CCC 483			
Sbjct 602				
	CCC 604			

Figura N° 6: Alineamiento de secuencia consenso amplificada de gen *bla*TEM-1 de *Escherichia coli* NCTC 13846 y la secuencia del aislado GD21 de *Escherichia coli*, realizado por BLAST. Código de acceso a la secuencia en GenBank: MT387484.1⁴⁵

Organismo: *Escherichia coli* (Bacteria; Pseudomonadati; Pseudomonadota; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.)

Gen: *bla*TEM-1

Autores: Tanaka,H., Hayashi,W., Iimura,M., Nagano,Y. and Nagano,N.

CAPÍTULO VII

6.0 CONCLUSIONES

1. A través de la galería microscan neg bp combo panel type 34 se comprobó que la cepa en estudio de *Escherichia coli* NCTC 13846 es resistente a las penicilinas y cefalosporinas de primera generación, así como también a cefalosporinas de segunda y tercera generación, tetraciclinas, aminoglucósidos (como la Tobramicina y Kanamicina), Polimixina (como la Colistina) y Diaminopirimidinas (como Trimetoprim).
2. Los resultados experimentales confirman que las muestras de ADN obtenidas poseen una calidad compatible con las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. La consistencia en la detección del gen *bla*TEM-1 valida que el proceso de extracción y la pureza del material genético son adecuados para los fines diagnósticos de la presente investigación.
3. Bajo las condiciones de termociclador establecidas en este protocolo de PCR (desnaturalización inicial 15 min a 95°C, seguido por 30 ciclos por 30 segundos a 94°C, 62°C por 90 segundos, 72°C por 1 min y extensión final a 72°C por 10 min) se logró la amplificación de una banda íntegra de 500 pb. Este fragmento corresponde al tamaño esperado para el gen de resistencia *bla*TEM-1 en *Escherichia coli* NCTC 13846, validando la especificidad del ensayo.
4. La evaluación del gradiente de cebadores determinó que las concentraciones de 0.2, 0.4 y 0.6 µM resultaron insuficientes para la detección del gen. Por el contrario, se obtuvo una amplificación bien definida a partir de 0.8 µM hasta 10 µM. Se estableció 0.8 µM como la concentración óptima de trabajo, ya que esta representa la mínima cantidad de reactivo necesaria para garantizar una banda íntegra y específica, optimizando así el rendimiento del ensayo.
5. El protocolo de PCR propuesto demostró ser reproducible en un 100% obteniéndose la amplificación del gen de resistencia *bla*TEM-1 en todas las repeticiones bajo las mismas condiciones.
6. La especificidad del protocolo de PCR fue confirmada mediante secuenciación y análisis bioinformático. La secuencia consenso obtenida presentó un porcentaje de identidad del 100% con la secuencia de referencia del gen *bla*TEM-1 depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), validando así la identidad del amplicón y la eficacia del protocolo propuesto.

CAPÍTULO VII

7.0 RECOMENDACIONES

A futuras investigaciones:

1. Se recomienda aplicar el protocolo de PCR desarrollado para la detección del gen *bla*TEM-1 en aislamientos de *Escherichia coli* provenientes de diversas matrices (clínicas, alimentarias y ambientales), bajo el enfoque de “Una Salud (One Health)”. No obstante, es imperativo realizar una validación específica por matriz utilizando la concentración óptima de cebadores (0.8 μ M) identificada, con el fin de evaluar y mitigar posibles interferencias o inhibidores que pudieran afectar la especificidad y sensibilidad del ensayo.
2. Explorar la estandarización de protocolos de PCR que permitan la detección específica de otros genes de resistencia que posee la cepa de referencia de *Escherichia coli* NCTC 13846

A la facultad de Química y Farmacia y el Centro de investigación y desarrollo en salud (CENSALUD) de la universidad de El Salvador:

1. Seguir promoviendo investigaciones en la línea de investigación de patógenos bacterianos resistentes a los antimicrobianos, utilizando técnicas de biología molecular y secuenciación para generar más evidencia científica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beeckmans S. Glyoxylate Cycle. En: Encyclopedia of Microbiology. 4a ed. Amsterdam: Elsevier; 2015. p. 159-179.
2. Musto A. Manual de Microbiología y Parasitología. Berazategui: Universidad Nacional Arturo Jauretche; 2013. p. 37-40.
3. Estornell J. Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención [Internet]. Christeyns. 2016 [citado 29 ene 2025]. Disponible en: <https://www.christeyns.com/es-es/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i-2/>
4. Vidal J, Canizalez-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena. Salud Publica Mex. 2007;49(5):376–86.
5. Culture Collections. Escherichia coli [Internet]. Salisbury: UK Health Security Agency; 2025 [citado 7 mar 2025]. Disponible en: <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/escherichia-coli-370>
6. Microbiologics. Escherichia coli derived from NCTC 13846 [Internet]. St. Cloud (MN): Microbiologics; 2025 [citado 4 mar 2025]. Disponible en: <https://www.microbiologics.com/lyfo-disk-escherichia-coli-nctc-13846>
7. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Ginebra: OMS; 2021 [citado 10 mar 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
8. AIMS Microbiology. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria [Internet]. 2018 [citado 17 ene 2025]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6604941/pdf/microbiol-04-03-482.pdf>
9. Peñaloza Piña LM, Aspiazú Hinojosa KA. Mecanismos de resistencia de Escherichia Coli en América Latina. Revista Vive. 2021;4(11):203–16.
10. Liu C, Sun S, Sun Y, Li X, Gu W, Luo Y, et al. Antibiotic resistance of Escherichia coli isolated from food and clinical environment in China from 2001 to 2020. Sci Total Environ. 2024;939:173498.
11. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. Salud Publica Mex. 2009;51 Suppl 3:s439–46.

12. Farooq A, Rafique A, Han E, Park S-M. Global dissemination of the beta-lactam resistance gene blaTEM-1 among pathogenic bacteria. *Sci Total Environ.* 2025;963:178521.
13. Charlene Princess ST, Geraldine Budomo D. Presence of blaCTXM-1, blaCTXM-9, and blaTEM-1 Genes in Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* Isolates from Hospital Wastewater. *Indones Biomed J.* 2023;15(5):296–350.
14. Odumosu BT, Obeten HI, Bamidele TA. Incidence of multidrug-resistant *Escherichia coli* harbouring blaTEM and tetA genes isolated from seafoods in Lagos Nigeria. *Curr Microbiol.* 2021;78(6):2414–9.
15. Gutiérrez Fernández J, Nogales Perez MC, Martín Mazuelos E. El sistema ATB: Un nuevo sistema para estudios de identificación y sensibilidad en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1992;10(10):1039-1050.
16. Lojano Castillo EX, Quishpe Casa JD. Estandarización del método PCR para la identificación genotípica de *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* y *Klebsiella oxytoca* en muestras remitidas al (CRN RAM) INSPI Quito [Tesis]. Quito: Universidad Politécnica Salesiana de Ecuador; 2024 [citado 22 feb 2025]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/26931>
17. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología [Internet]. Madrid: SEIMC; 2025 [citado 5 mar 2025]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
18. Biologia.edu.ar. Amplificación por la PCR [Internet]. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste; 2024 [citado 8 mar 2024]. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/identificacion/2.htm>
19. Khan Academy. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Internet]. Mountain View (CA): Khan Academy; 2025 [citado 3 mar 2025]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
20. OneLab. Proceso de PCR: Pasos Clave Explicados [Internet]. Buenos Aires: OneLab; 2025 [citado 3 mar 2025]. Disponible en: <https://www.onelab.com.ar/proceso-de-pcr-pasos-clave-explicados>

21. Clínica Universidad de Navarra. RNA polimerasa [Internet]. Pamplona: CUN; 2025 [citado 5 mar 2025]. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/rna-polimerasa>
22. Biochain Institute. Using dNTP in polymerase chain reaction (PCR) [Internet]. Newark (CA): Biochain; 2025 [citado 5 mar 2025]. Disponible en: <https://www.biochain.com/blog/using-dntp-in-polymerase-chain-reaction-pcr/>
23. Doyley M. Escherichia coli O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microbiol.* 2011;141 Suppl:S135-43 (Nota: Se ajustó el año y volumen según registros de la revista).
24. Pérez GD. Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) [Internet]. Córdoba: Universidad de Córdoba; 2025 [citado 5 mar 2025]. Disponible en: <https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/44%20PCR.pdf>
25. National Human Genome Research Institute. Electroforesis [Internet]. Bethesda (MD): NHGRI; 2025 [citado 7 mar 2025]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>
26. Khan Academy. Electroforesis en gel [Internet]. Mountain View (CA): Khan Academy; 2025 [citado 10 mar 2025]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
27. de la Mora D, Sandoval Rodríguez A. Electroforesis. En: Salazar Montes A, Sandoval Rodríguez A, Armendáriz Borunda J, editores. *Biología molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.* México: McGraw-Hill; 2013. Cap. 12.
28. Fierro FF. Electroforesis de ADN. En: Cornejo Romero A, Serrato Díaz A, Rendón Aguilar B, Rocha Munive MG, editores. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos.* México: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa; 2014. p. 27–51.
29. Rojas AC. Método: Gel de electroforesis Agarosa [Internet]. Conogasi; 2020 [citado 9 mar 2025]. Disponible en: <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>
30. BIOTED. Electroforesis avanzada [Internet]. Las Rozas (Madrid): Bioted; 2025 [citado 9 mar 2025]. Disponible en: <https://www.bioted.es/protocolos/ELECTROFORESIS-AVANZADA.pdf>
31. Bolívar AM, Rojas A, García P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Bioanal.* 2014;3(1):25–33.

32. Vizcaino-Salazar GJ. Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Med Lab*. 2017;23(7-8):365-386.
33. Pedrosa Amado A. Reacción en cadena de la polimerasa. *AMC* [Internet]. 1999 [citado 27 feb 2025];3(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011
34. Lino-Villacreses LA, González-Vera LV, Castro-Jalca J, Lino-Villacreses W. Aplicación, cálculo e importancia de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de las pruebas de diagnóstico en el laboratorio clínico. *Dom Cienc*. 2021;7(3):685–709.
35. Thermo Fisher Scientific. NanoDrop Spectrophotometer Resources [Internet]. Waltham (MA): Thermo Fisher; 2025 [citado 19 feb 2025]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/sv/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/instruments/nanodrop/resources.html>
36. National Human Genome Research Institute. Secuenciación de ADN [Internet]. Bethesda (MD): NHGRI; 2025 [citado 7 jul 2025]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN>
37. AAT Bioquest. Sanger Sequencing [Internet]. Pleasanton (CA): AAT Bioquest; 2025 [citado 7 jul 2025]. Disponible en: <https://www.aatbio.com/catalog/sanger-sequencing>
38. Siemens Healthcare. MicroScan Manual de procedimiento para gram negativo deshidratado. West Sacramento (CA): Siemens Healthcare Diagnostics; 2008. p. 1-7.
39. Fisher Scientific. PureLink Genomic DNA Kits [Internet]. Carlsbad (CA): Life Technologies; 2024 [citado 8 jul 2024]. Disponible en: https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_genomic_man.pdf
40. Park KH, Jeong HD. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide. *Aquaculture*. 1996;141(3-4):135-143.
41. Cabanetos Renaud P. Identificación de microorganismos gram-negativos mediante una aproximación polifásica [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013 [citado 4 feb 2025]. Disponible en: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/342745>
42. Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish

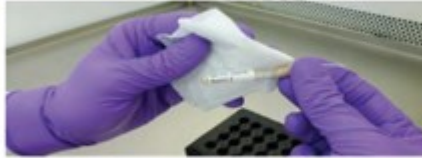
- hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol.* 2008;46(2):707–12.
43. Mumbo MT, Nyaboga EN, Kinyua JK, Muge EK, Mathenge SGK, et al. Antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from fresh Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish marketed for human consumption. *BMC Microbiol.* 2023;23(1):306.
44. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends Food Sci Technol.* 2014;37(2):115–26.
45. National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Escherichia coli* isolate GD21 class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-1 (*bla*TEM) gene, *bla*TEM-1 allele, complete cds. GenBank: MT387484.1 [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2020 [citado 13 feb 2026]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MT387484.1>
46. Culture Collections. *Escherichia coli* [Internet]. Salisbury: UK Health Security Agency; 2025 [citado 28 ene 2025]. Disponible en: <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/escherichia-coli-370>
47. BritaniaLab. Tripteína Soya Agar [Internet]. Buenos Aires: Britania Lab; 2025 [citado 25 feb 2025]. Disponible en: https://www.britaniyalab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e7678b1e3.pdf
48. Life Technologies. Kits de ADN genómico PureLink: Para la purificación del ADN genómico [Internet]. 2025 [citado 8 mar 2025]. Disponible en: <https://www.studocu.com/ec/document/universidad-de-especialidades-espiritu-santo/biologia-molecular/adn-de-pure-link-espanol-nuevo/113701505>
49. Macrogen. DNA Order Guide [Internet]. Seúl: Macrogen; 2025 [citado 20 ago 2025]. Disponible en: <https://dna.macrogen.com/support/retrieveDownloadCenter.do?menuCd=SUP500>
50. Stellar Scientific. Accuris SmartCheck 100bp DNA Ladder [Internet]. Baltimore (MD): Stellar Scientific; 2025 [citado 9 jul 2025]. Disponible en: <https://www.stellarscientific.com/accuris-smartcheck-100bp-dna-ladder-500ul-100-lanes/>

ANEXOS

ANEXO N° 1.

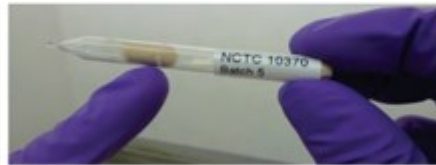
CÓMO ABRIR Y CULTIVAR TUS CEPAS LIOFILIZADAS DE NCTC.

1. Prepare el medio adecuado necesario para la reactivación de la cepa y verifique las condiciones de incubación requeridas.

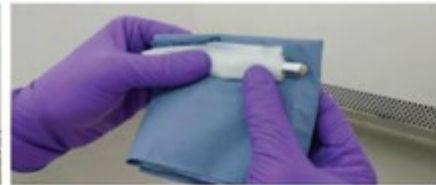
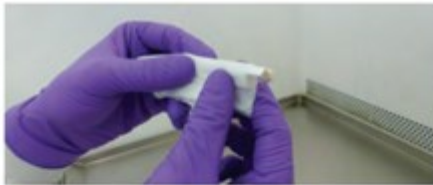


2. Identifique el cultivo mediante el número NCTC en el papel interior o en la etiqueta de la ampolla

3. Limpie el exterior de la ampolla utilizando una toallita desinfectante o un papel impregnado con alcohol al 70%.



4. Haga una marca profunda alrededor de la circunferencia de la ampolla, utilizando un cortador de diamante, lápiz de diamante o lima para vidrio, a mitad del tapón de algodón



5. Envuelva la ampolla en una toallita desinfectante o papel impregnado con alcohol al 70%.

6. Luego envuélvala con toallas de papel, pañuelos o gasa para actuar como capa de protección.

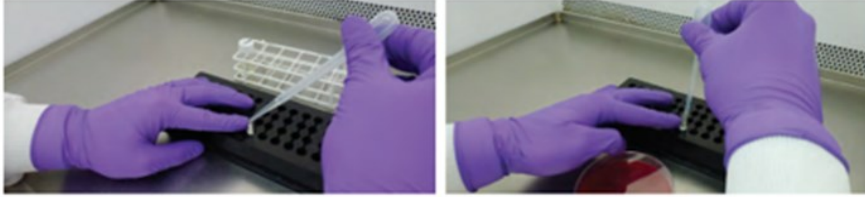


7. Rompa la ampolla, aún envuelta, en el punto donde se realizó la marca



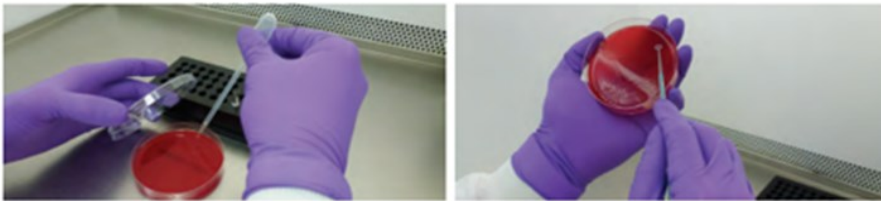
8. Desenvuelva cuidadosamente la ampolla, ya que pueden existir fragmentos de vidrio. Deseche el papel y la punta de la ampolla en un contenedor para objetos punzocortantes

9. Una vez abierta, el aire entrará en la ampolla porque el vacío ya no está intacto. Este aire será filtrado por el tapón de algodón, el cual debe desecharse de forma segura.



10. Para reconstituir, transfiera aproximadamente 0.5 ml de caldo, cuando sea necesario enriquecido con sangre, a la ampolla.

11. Permita que los microorganismos se rehidraten durante 5–10 minutos. Mezcle con mucho cuidado para evitar la formación de aerosoles.



12. Subcultive en medios de cultivo apropiados, idealmente incluyendo un medio sólido

13. La mayoría de las bacterias liofilizadas crecerán en pocos días, aunque algunas pueden requerir un período de incubación ligeramente mayor.

Figura N° 7: Procedimiento del manejo de Cepa NCTC. Fuente: National Collection of Type Cultures.⁴⁶

ANEXO N°2.

FICHA TÉCNICA PARA PREPARACIÓN DE AGAR TSA.

Tripteína Soya Agar

IVD

USO

Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos.

Al ser suplementado con sangre permite el crecimiento de microorganismos exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis.

Su fórmula cumple con los requerimientos de la Armonización de Farmacopeas Europea, Japonesa y de los Estados Unidos de Norteamérica (EP, JP y USP respectivamente).

FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, la tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya además es fuente de hidratos de carbono que estimulan el crecimiento de diversos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante.

Puede ser utilizado como base a la cual se suplementa con nutrientes o con antimicrobianos, lográndose un medio enriquecido o selectivo de acuerdo al aditivo.

El agregado de 5-10 % sangre ovina desfibrinada estéril (**Britasheep**) promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis.

El agregado de extracto de levadura en concentración 0,6 % favorece el crecimiento de especies de *Listeria*.

Es un medio adecuado para cultivar y mantener cepas de *Aeromonas*, y aumentando el porcentaje de cloruro de sodio, para mantener cepas de algunos *Vibrios* (excepto *V. cholerae*).

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0210205: envase x 100 g.

Código B0210206: envase x 500 g.

FÓRMULA (en gramos por litro)

TRIPTEÍNA.....15.0

PEPTONA DE SOYA.....5.0

CLORURO DE SODIO.....5.0

AGAR.....15.0

pH FINAL: 7.3 ± 0.2

INSTRUCCIONES

Disolver 40 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando suavemente y hervir durante 1 o 2 minutos hasta su disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 118-121 °C durante 15 minutos.

Preparación de Agar Sangre: agregar 5-10 % de sangre ovina desfibrinada estéril (**Britasheep**) al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50 °C. Homogeneizar y distribuir en placas de Petri estériles.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color beige claro, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar.

Suplementado con sangre: color rojo cereza.

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

Siembra

Por inoculación directa del material en estudio, sobre la superficie del medio de cultivo.

Incubación

El tiempo, la temperatura, y la atmósfera de incubación, dependerán del microorganismo que se quiera recuperar.

En general se recomienda:

Bacterias de fácil crecimiento: en aerobiosis, a 33-37 °C durante 18 a 24 horas.

Bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales: en atmósfera con 5 % de CO₂, a 33-37 °C durante 24-48 horas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Observar las características de las colonias.

Para el medio de cultivo conteniendo sangre, observar las reacciones de hemólisis:

Figura N° 8: Ficha técnica para preparación de agar TSA.⁴⁷

ANEXO N° 3.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD MICROBIANA POR GALERÍAS ATB G-CLSI.

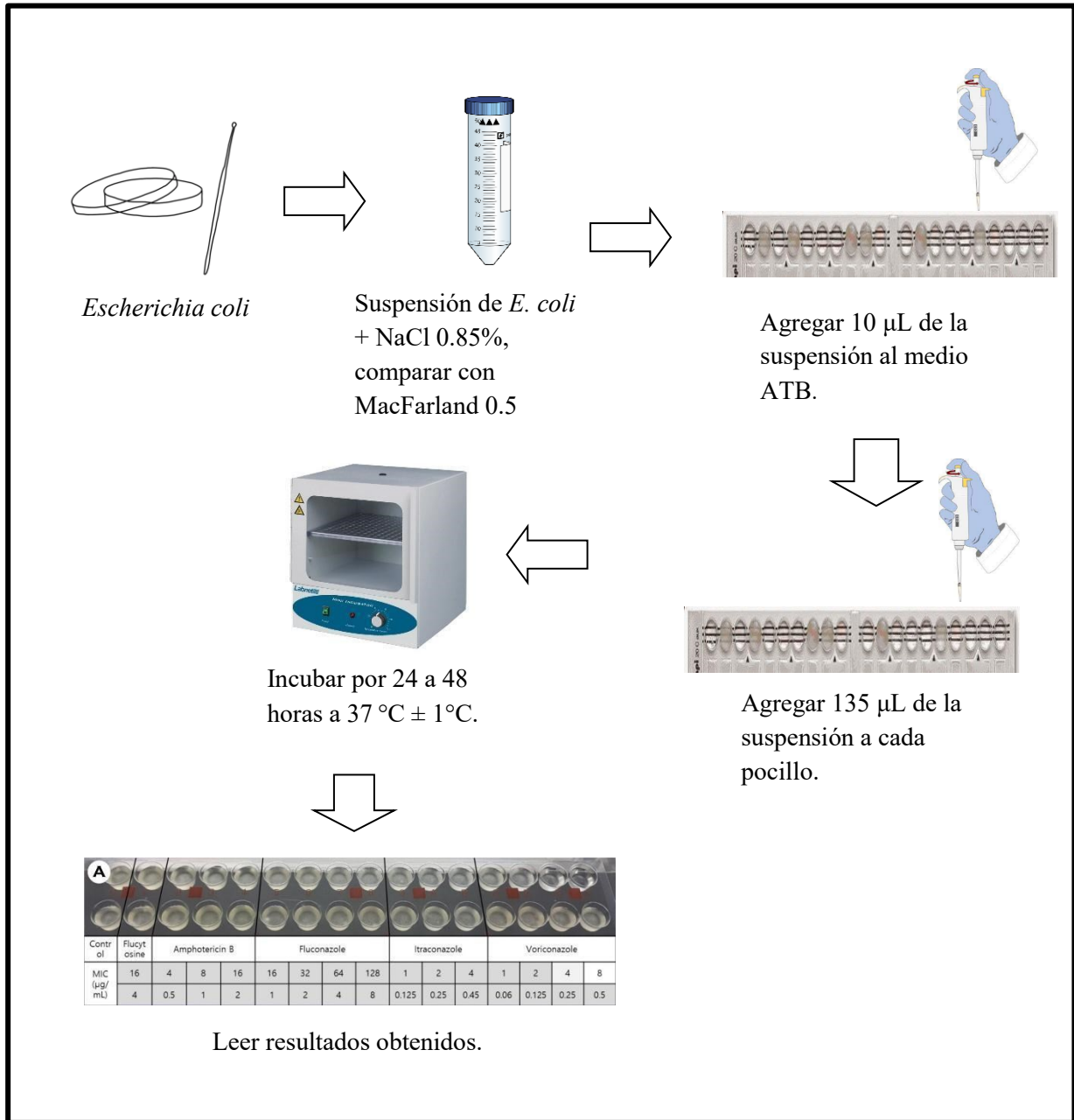


Figura N° 9: Esquema de prueba de sensibilidad en Galerías ATB G-CLSI. Fuente: Elaboración propia.

ANEXO N° 4.
LISADO DE CÉLULAS.

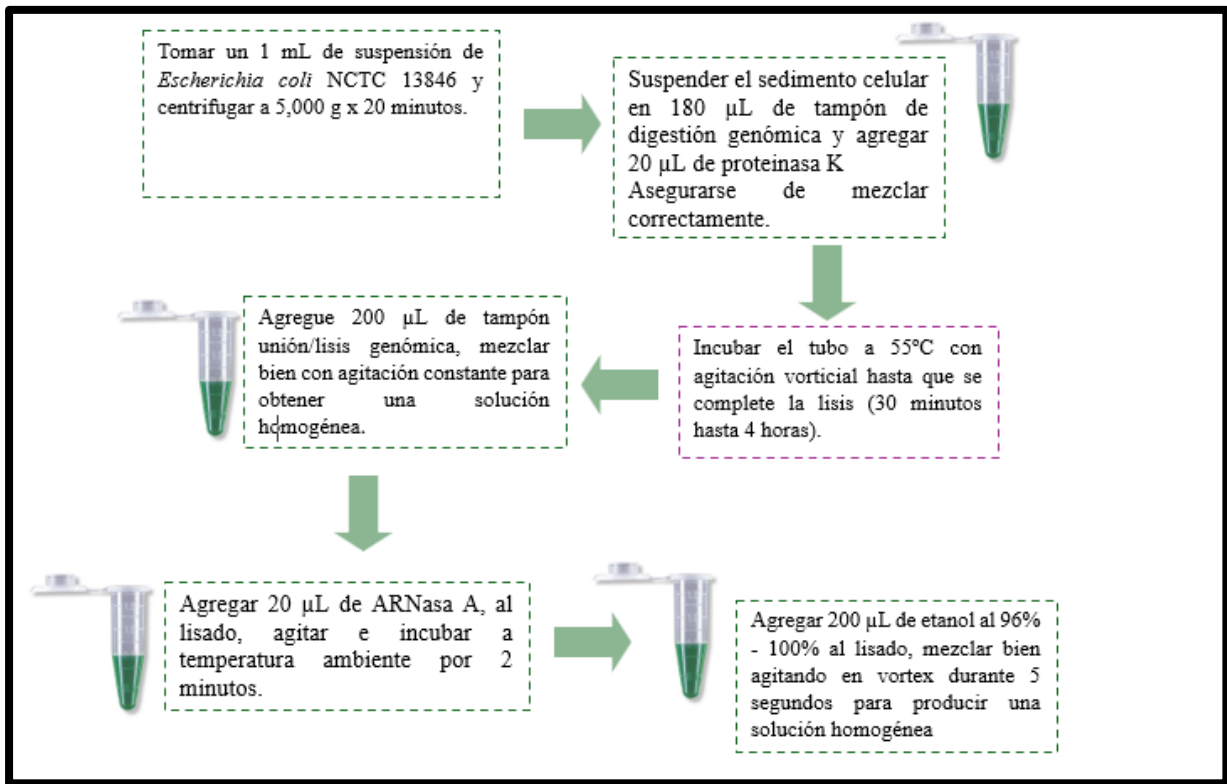


Figura N° 10: Esquema de Lisado de Células Bacterias Gramnegativas. Fuente Elaboración propia.

ANEXO N°5.

EXTRACCIÓN DE ADN.

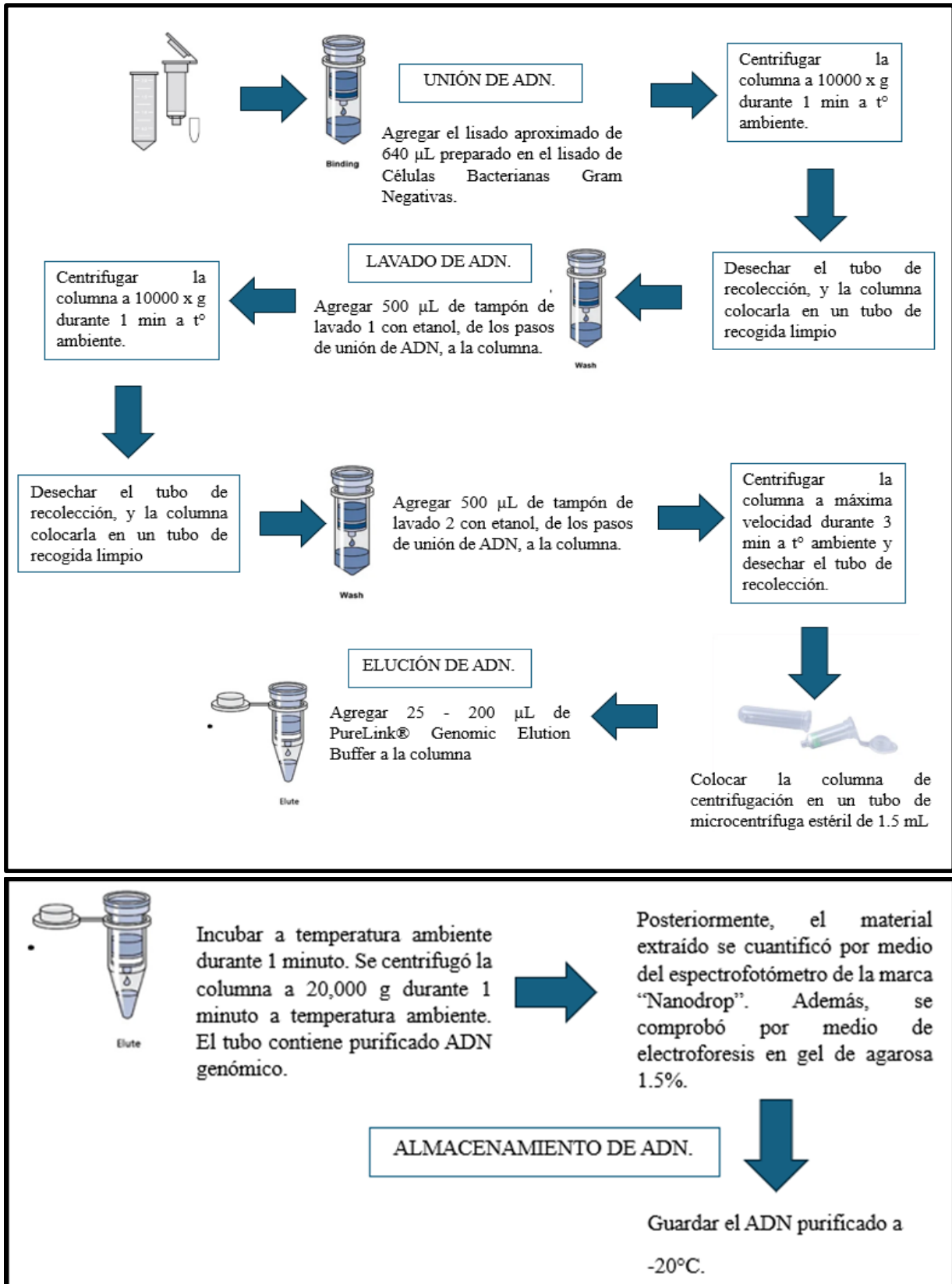


Figura N° 11: esquema de extracción de ADN. Elaboración propia.

ANEXO N° 6.

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

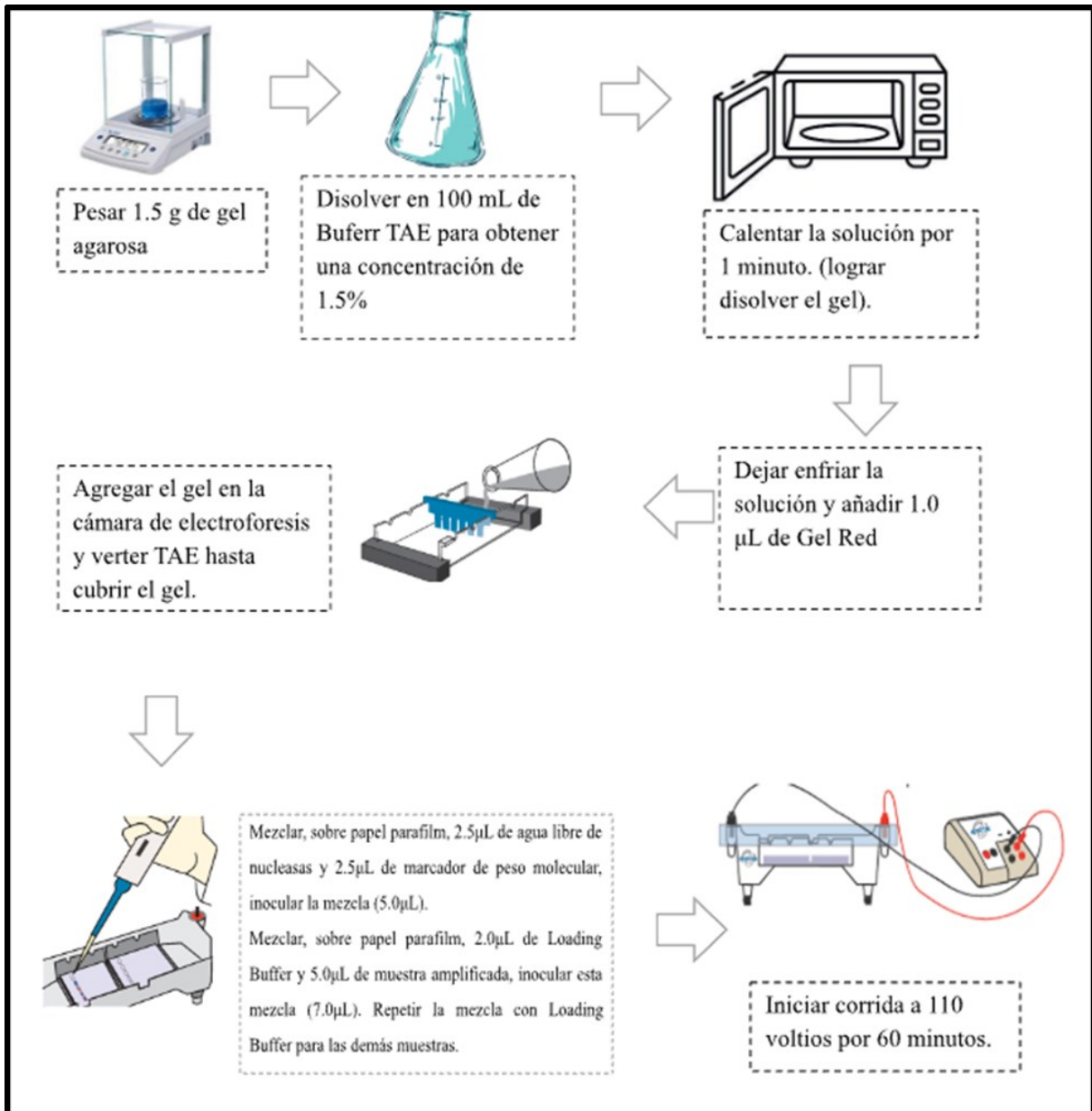


Figura N° 12: esquema de electroforesis. Fuente: Elaboración propia.

ANEXO N° 7.

PARÁMETROS DE ELUCIÓN

Directrices generales, continuación

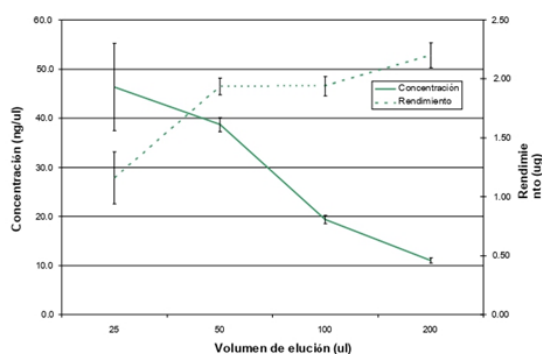
Parámetros de elución

Tampón de elución

El ADN genómico se eluye utilizando el tampón de elución genómica ^{PureLink®} (10 mM Tris-HCl, pH 9,0, 0,1 mM EDTA). Alternativamente, puede utilizarse tampón Tris (10 mM Tris-HCl, pH 8,0-9,0) o agua estéril, si el EDTA inhibe las reacciones posteriores.

Volumen de tampón de elución

El ADN genómico se eluye en 25-200 μ L (Mini Kit) o 50-200 μ L (96 Kit) de tampón de elución genómica ^{PureLink®}. Puede cambiar el volumen de tampón de elución para obtener ADN genómico en la concentración final deseada. Utilice el gráfico que se muestra a continuación para determinar las condiciones de elución más adecuadas para su aplicación. Para aumentar el rendimiento de ADN, utilice un volumen mayor de tampón de elución. Para aumentar la concentración de ADN, utilice un volumen menor de tampón de elución.



Leyenda de la figura: El ADN genómico se purificó a partir de muestras de sangre de 100 μ L con el ^{PureLink®} Genomic DNA Mini Kit utilizando diferentes volúmenes de elución.

Número de eluciones

Utilizando 50 μ L y 100 μ L de volumen de tampón de elución, la primera elución recupera ~80% y 90% del ADN genómico unido, respectivamente. Para maximizar la recuperación de ADN genómico, puede realizar una segunda elución para recuperar el 10-15% de ADN_g restante. Para evitar la dilución de la muestra de ADN_g, realice la segunda elución con el mismo volumen de tampón utilizado para la primera elución. Evite el contacto de la columna de centrifugación con el fluido utilizando tubos diferentes para los dos pasos de elución.

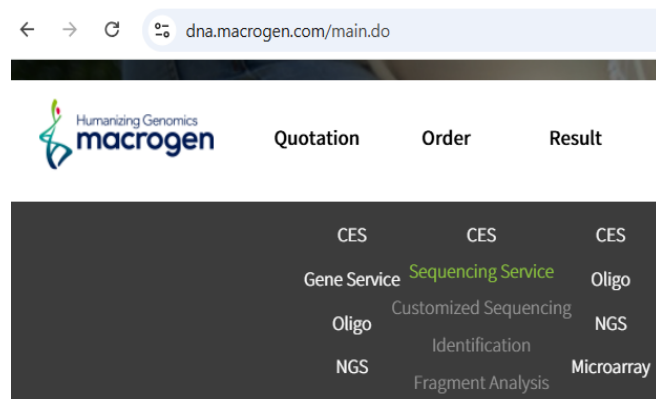
Nota: Se incluye suficiente tampón de elución genómica ^{PureLink®} para realizar hasta $2 \times 100 \mu$ L de elución por muestra. Si desea realizar $>2 \times 100 \mu$ L de elución por muestra, deberá adquirir más tampón de elución ^genómica ^{PureLink®} (página 43) disponible por separado.

Figura N° 13: Documento traducido, Parámetros de elución.⁴⁸

ANEXO N° 8.

PROTOCOLO DE ENVÍO DE MUESTRAS A MACROGEN.⁴⁹

1. Crear una cuenta en la página oficial de MACROGEN (<https://dna.macrogen.com/main.do>).
2. Para la preparación de la muestra, el producto de PCR amplificado se inoculó en un gel de agarosa al 1.5% para verificar el peso molecular que posee. Ya que la empresa MACROGEN recomienda verificar la concentración por electroforesis en lugar de nanodrop, ya que la lectura en nanodrop podría ser un poco imprecisa.
3. Una vez determinado el peso molecular, se verifica la concentración a la que se encuentra la muestra en ng/μL, para ello se hace la relación con la concentración que reporta el marcador de peso molecular (ver anexo N° 9) y calcular la concentración de la muestra. También se sugiere usar el programa “ImageJ” (<https://imagej.net/ij/index.html>) el cual puede calibrar concentraciones usando estándares de densidad de colores de imagen para obtener un estimado de la concentración de la muestra en el gel.
4. Se verificó la concentración que la empresa indica a la que debe estar la muestra en base al peso molecular del producto de PCR, para 500 pb requiere una concentración entre 5-10 ng/μL, y la muestra se diluyó hasta 10 ng/μL utilizando agua libre de nucleasas.
5. Los cebadores o primers forward y reverse se prepararon a 5 pmol/μL (5μM), según lo requiere la empresa para una secuenciación óptima.
6. La muestra, y cada primer se colocó en tubos individuales debidamente codificados y sellados con parafilm.
7. Para ordenar el servicio de secuenciación de Sanger, en la página oficial de MACROGEN seleccionar “Order”, luego en CES seleccionar “sequencing service”.



8. Se seleccionó “PCR product” en el tipo de muestra, se seleccionó el servicio adicional de purificación (esto debido a que no se contaba con insumos necesarios para realizar la purificación antes de enviar a secuenciar) y el peso molecular que posee la muestra, seleccionó la opción de “Tube” ya que se enviará la muestra en un tubo individual.


Standard Sequencing

STEP 1 Basic Info > STEP 2 Reaction Info > STEP 3 Sample Info > STEP 4 Primer Condition > STEP 5 Billing Info > STEP 6 Complete

STEP 1 Enter Basic Information. (* Required field)

Order Guide [Q](#)

Sample Type *	PCR Product
Add. Service	Choose
Product Size(bp) *	<input type="radio"/> Over 600bp <input checked="" type="radio"/> Less 600bp
Tube Type *	<input checked="" type="radio"/> Tube <input type="radio"/> 96 Well Plate



9. Se colocó el nombre de la muestra y de los primers con el que se desea realizar la secuenciación (el nombre colocado acá debe coincidir con el que se colocó en el tubo que contiene la muestra y los primers).

Standard Sequencing

STEP 1 Basic Info > **STEP 2** Reaction Info > STEP 3 Sample Info > STEP 4 Primer Condition > STEP 5 Billing Info > STEP 6 Complete

- Please write a unique name on each tube and send it to us, and enter the same name as the tube in the reaction information.
 - If the names are the same, they will be recognized as the same tube.
 (If you use the same sample/primer multiple times, enter the same name on multiple fields.)
 - Only English Alphabet (either capital small letters), digit 0-9, a hyphen (-) or under bar (_) is allowed.

Add + | Delete -

[2 / 2] Filtered Row: 2

#	Sample Name *	Primer Name *
1	AbT-2	blaTEM-1F Q
2	AbT-2	blaTEM-1R Q

10. Se debe especificar la concentración a la que se encuentra la muestra que se enviará. Para el primer se debe seleccionar en el tipo “enclosed”, ya que el primer se enviará junto con la muestra, se especificó la secuencia de cada primer y la concentración a la que se encuentran.

Standard Sequencing

STEP 1 Basic Info > STEP 2 Reaction Info > **STEP 3** Sample Info > STEP 4 Primer Condition > STEP 5 Billing Info > STEP 6 Complete

[1 / 1] Filtered Row: 1

#	Sample Name *	Rxn. Cnt. *	Conc.(ng/ul)	Plate Name	Well	Product Size(bp) *	Target Size(bp)
1	AbT-2	2	10			Less 600bp	

Standard Sequencing

STEP 1 Basic Info > STEP 2 Reaction Info > STEP 3 Sample Info > **STEP 4** Primer Condition > STEP 5 Billing Info > STEP 6 Complete

[2 / 2] Filtered Row: 2

#	Primer *	Type *	Sequence	Conc.(pmol/ul)	Required vol(ul)	Sequencing Primer (Y / N)	PCR Primers (Y / N)
1	blaTEM-1F	Enclosed	TTGGGTGCACGAGTGGGT	5	1.5	Y	N
2	blaTEM-1R	Enclosed	TAAITGTTGCCGGAAGC	5	1.5	Y	N

11. Se verificó que los datos de envío sean correctos y se envió la solicitud de análisis.

12. Al realizar la orden se recibe una etiqueta que contiene el número de orden para realizar el análisis, esta debe agregarse junto con las muestras al realizar el envío.



13. Para realizar el envío de la muestra hasta la empresa MACROGEN se debe hacer por medio de Fedex o DHL, la empresa da la opción de generar el pedido de envío con estas empresas directamente, esto para realizar el seguimiento del envío en todo momento. Sin embargo, se puede realizar el pedido directamente en la sucursal de una de las empresas en el país.

ANEXO N° 9.

MARCADOR DE PESO MOLECULAR SmartCheck.

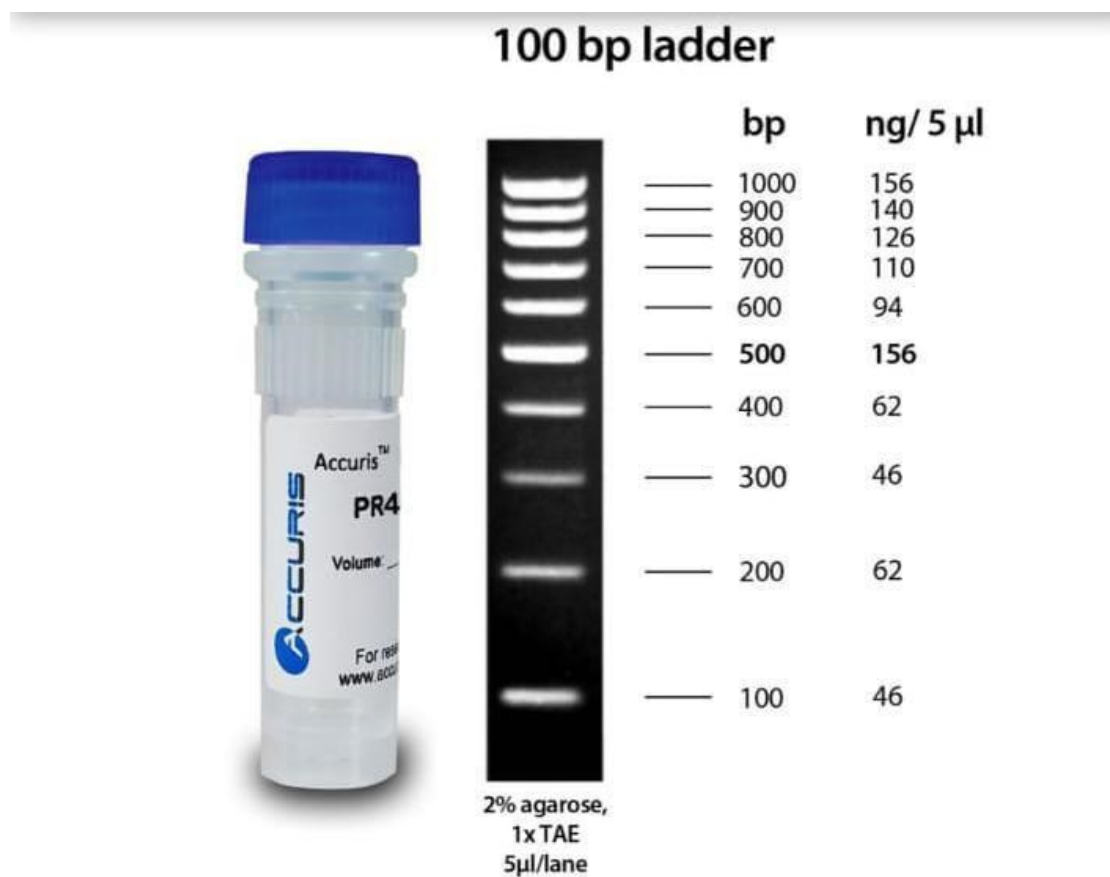


Figura N° 14 Marcador de peso molecular SmartCheck utilizado para medición de peso molecular y concentración del ADN genómico amplificado.⁵⁰

ANEXO N° 10.

AMPLIFICACIÓN DE MUESTRA AbT-2 CON PRIMER FORWARD.

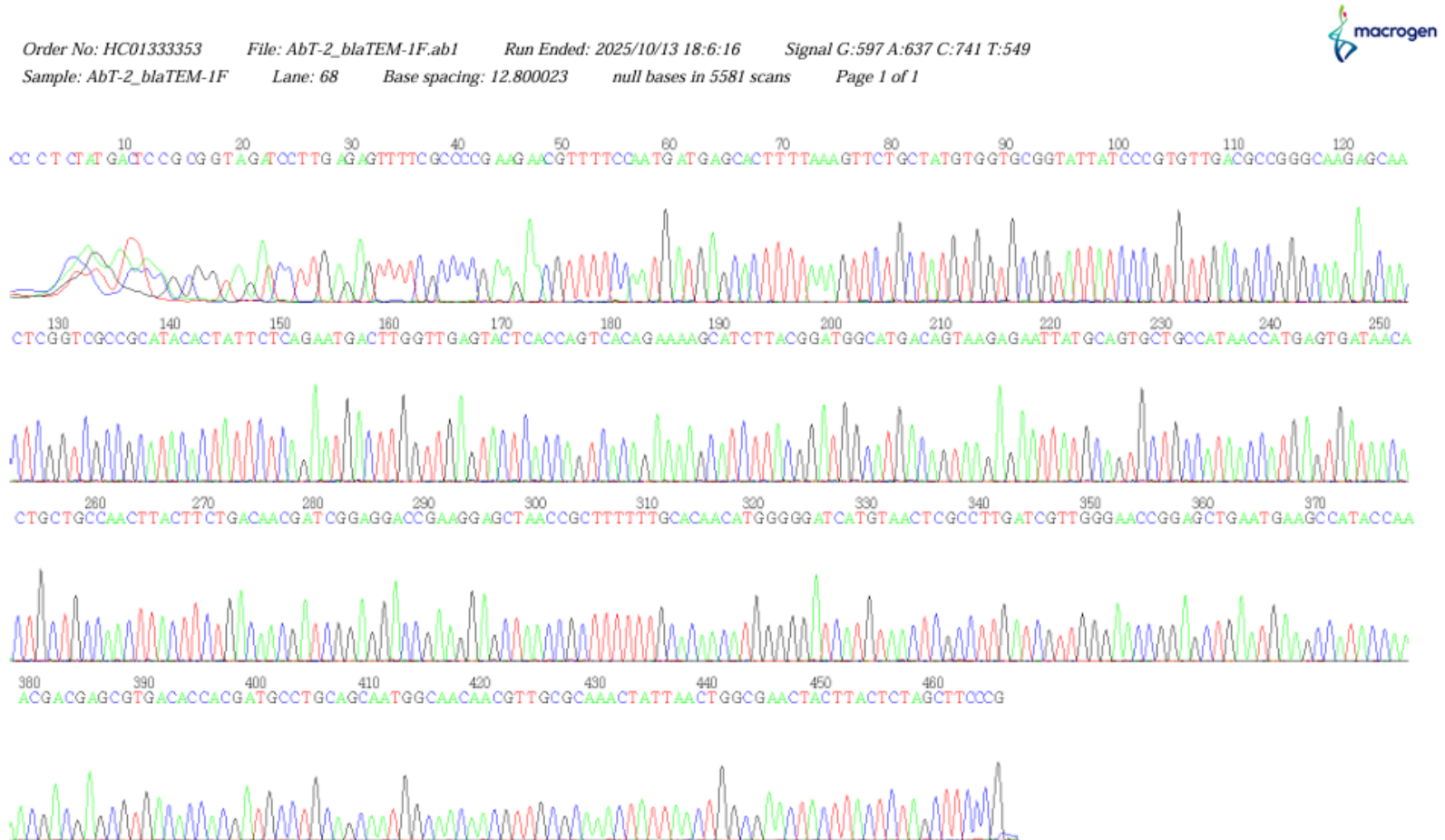


Figura N° 15 Resultado de amplificación con primer forward obtenido por MACROGEN.

ANEXO N° 11.

AMPLIFICACIÓN DE MUESTRA AbT-2 CON PRIMER REVERSE.

Order No: HC01333353 File: AbT-2_blaTEM-1R.ab1 Run Ended: 2025/10/13 18:6:16 Signal G:176 A:156 C:231 T:182
Sample: AbT-2_blaTEM-1R Lane: 66 Base spacing: 12.740018 null bases in 5751 scans Page 1 of 1

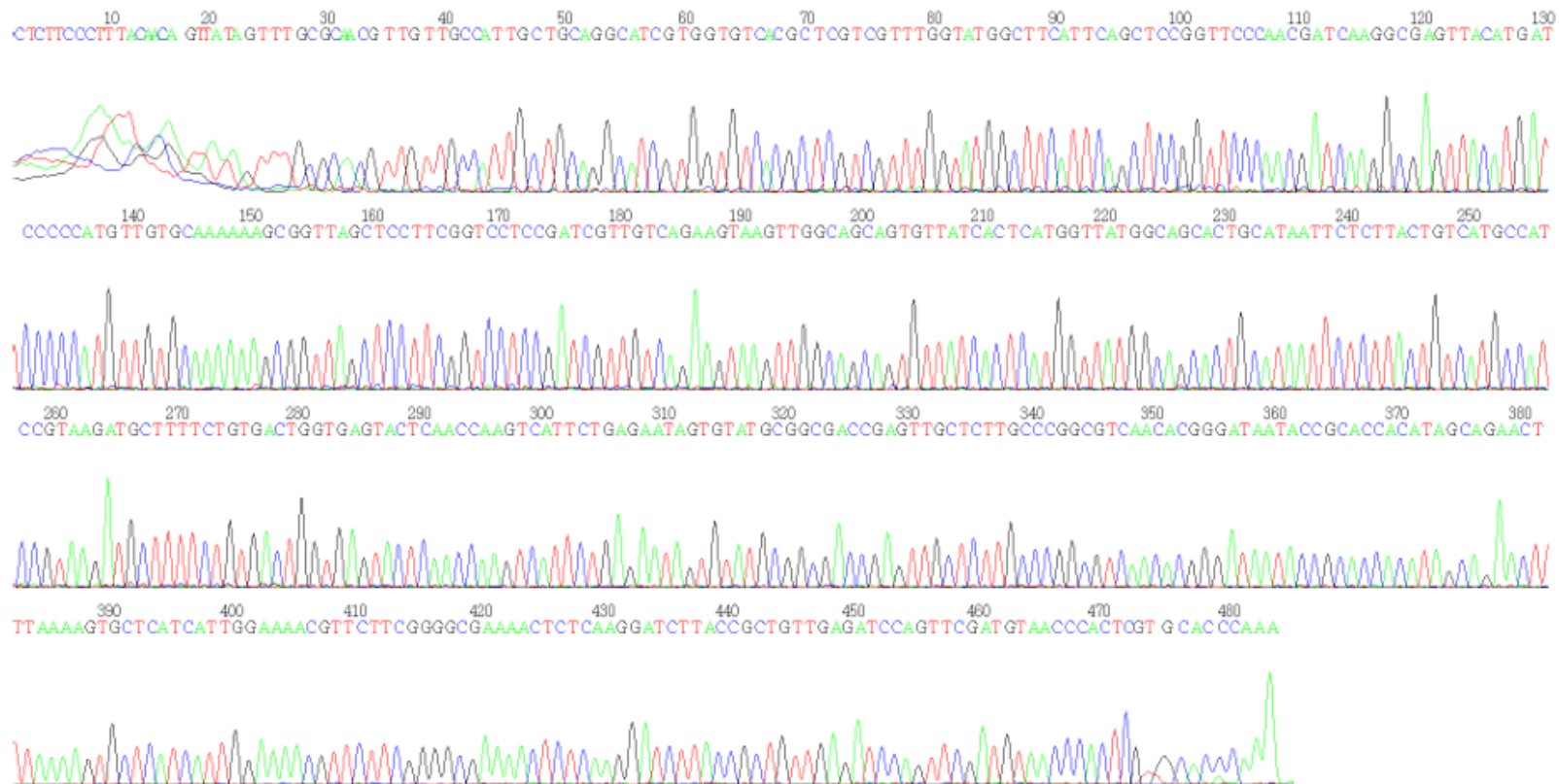
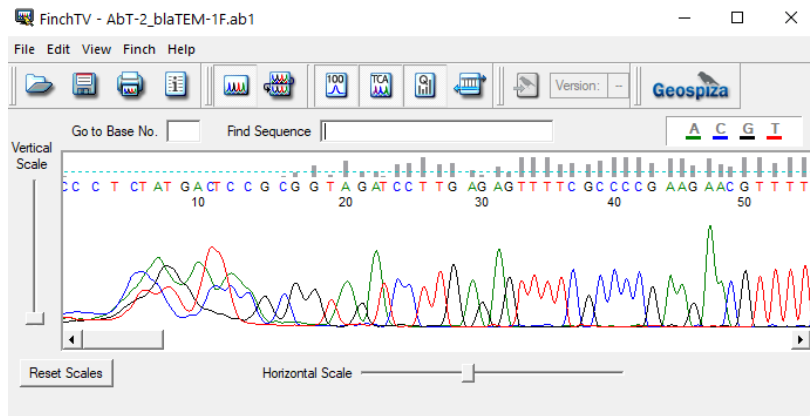


Figura N° 16 Resultado de amplificación con primer forward obtenido por MACROGEN.

ANEXO N° 12.

PROTOCOLO PARA LA VERIFICACIÓN BIOINFORMÁTICA DE SECUENCIAS

- 1- Control de Calidad y Limpieza (Trimming): Las lecturas de secuenciación (Sanger) suelen tener picos ambiguos o "ruido" en los extremos, por tanto se debe realizar una limpieza utilizando la herramienta FinchTV. Acción.
- 2- Abrir la secuencia “archivos.ab1” (electrogramas enviados por MACROGEN) y recortar los extremos donde los picos se vean encimados o planos. Criterio: Solo se conservan las regiones donde los picos son definidos, altos y no se solapan. Realizar para ambas secuencias y obtener las secuencias limpias.



- 3- Generación de la Secuencia Consenso (Ensamble): debido a que el cebador Forward lee en un sentido y el Reverse en el opuesto, hay que unirlos para generar una secuencia consenso, para ello se sugiere utilizar la herramienta “CAP3 Sequence Assembly Program. Acción”. Pegar ambas secuencias en formato FASTA y el software automáticamente hará el reverso-complemento de la secuencia reverse y las alineará para formar un único fragmento (contig). Resultado: Obtendrán la secuencia real y completa del amplicón.

- 4- Identificación mediante BLASTn: la secuencia consenso se compara contra la base de datos del NCBI para confirmar la identidad del gen. Herramienta: NCBI BLAST

(nucleotide blast).

The diagram illustrates the Web BLAST interface. On the left is a box for "Nucleotide BLAST" with a DNA double helix icon and the text "nucleotide → nucleotide". In the center are two blue arrows: the top one points right and is labeled "blastx translated nucleotide → protein"; the bottom one points left and is labeled "tblastn protein → translated nucleotide". On the right is a box for "Protein BLAST" with a protein ribbon icon and the text "protein → protein".

- 5- Pegar la secuencia consenso en "Database", seleccionar "Standard databases (nr/nt)" y dar Clic en el botón "BLAST". Criterio: Identidad: > 99% para confirmar que es el gen de interés, Query Cover: cercano al 100%, E-value: igual a 0.0 (significa que la coincidencia es exacta y no al azar).

The screenshot shows the "Standard Nucleotide BLAST" search page. At the top, there are tabs for "blastn", "blastp", "blastx", "tblastn", and "tblastx", with "blastn" selected. Below the tabs, the text reads "BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. more...".

The "Enter Query Sequence" section contains a text area with the following sequence:
AGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAA
CTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGA
CGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA
CTATTAACTGGCGAACTACTACTTAGCTTCCC

Below the text area are fields for "Or, upload file" (with a "Seleccionar archivo" button and "Ningún archivo seleccionado" text), "Job Title" (with a text input field and "Enter a descriptive title for your BLAST search" text), and a checkbox for "Align two or more sequences".

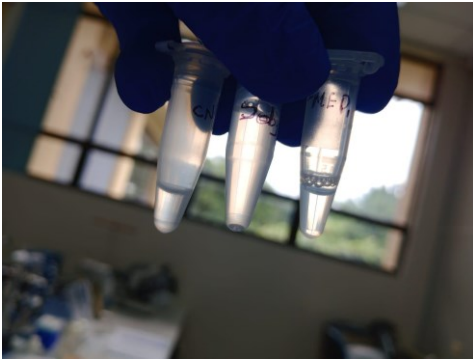
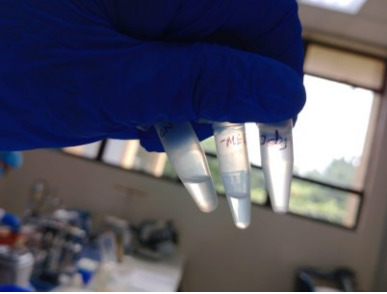
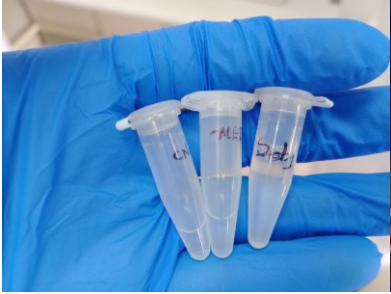
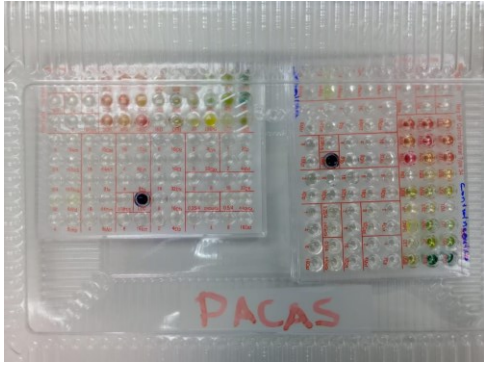
The "Choose Search Set" section includes a "Database" dropdown menu set to "Nucleotide collection (nr/nt)", an "Organism" field with an "Add Organism" button, and checkboxes for "Exclude" (Models (XM/XP), Uncultured/environmental sample sequences) and "Limit to" (Sequences from type material). There is also an "Entrez Query" field with a "Create custom database" button.

The "Program Selection" section has radio buttons for "Optimize for": "Highly similar sequences (megablast)" (selected), "More dissimilar sequences (discontiguous megablast)", and "Somewhat similar sequences (blastn)". Below these is a "Choose a BLAST algorithm" link.

At the bottom, there is a large blue "BLAST" button and a checkbox for "Show results in a new window". The text "Search database nt using Megablast (Optimize for highly similar sequences)" is displayed above the checkbox.

ANEXO N° 13.

EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DE TRABAJO DE LABORATORIO.



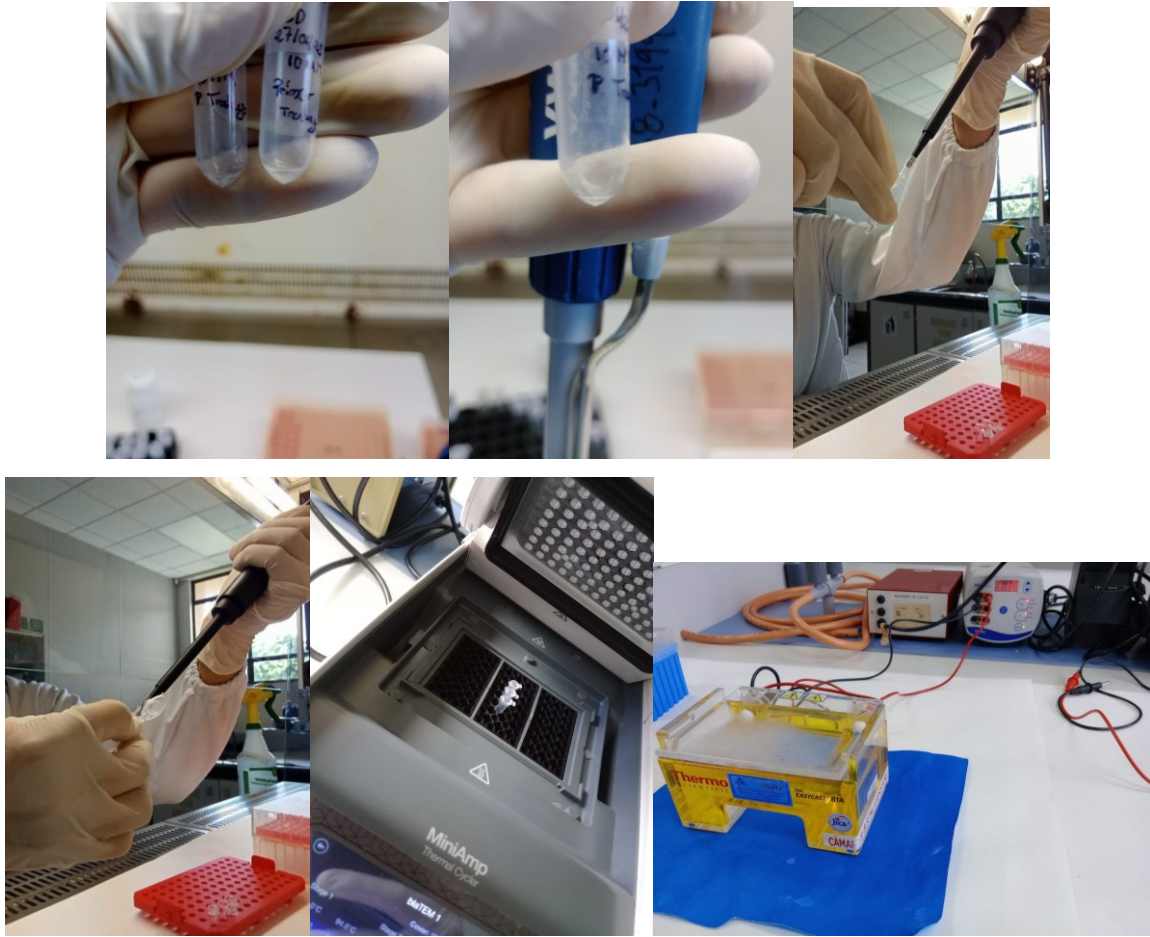


Figura N° 17 Evidencia fotográfica del trabajo realizado para la parte experimental en el laboratorio de microbiología y laboratorio de biología molecular en CENSALUD.