



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

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

TRABAJO DE TITULACIÓN

Título:

Patrón de bandas genéticas en *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter diversus* aislados en
productos agrícolas y aguas de riego

Autor(es):

Evelyn Alexandra Díaz Cadena

Jhonny Alfredo Silva Guamán

Tutora: PhD. Morella Lucia Guillén Ferraro.

Riobamba - Ecuador

2021

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: Patrón de bandas genéticas en *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter diversus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, dirigido por: la PhD. Morella Lucia Guillén Ferraro, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final escrito del proyecto de investigación con fines de graduación en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

MSc.Mercedes Balladares

Presidente del Tribunal



Firma

Mgs. Eliana Elizabeth Martínez Duran

Miembro del Tribunal



Firma

MSc.Félix Falconí Ontaneda

Miembro del Tribunal



Firma

CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, MORELLA LUCIA GUILLÉN FERRARO, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: Patrón de bandas genéticas en *Pseudomona aeruginosa* y *Citrobacter diversus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, propuesto por Díaz Cadena Evelyn Alexandra, egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 20 de junio de 2021.

175687759 Digitally signed
1 MORELLA by 1756877591
LUCIA MORELLA LUCIA
GUILLÉN GUILLEN
FERRARO
Date: 2021.06.20
21:42:28 -05'00'

Dra. Morella Lucia Guillén Ferraro
Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, MORELLA LUCIA GUILLÉN FERRARO, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: Patrón de bandas genéticas en *Pseudomona aeruginosa* y *Citrobacter diversus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, propuesto por Silva Guamán Jhonny Alfredo, egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 20 de junio de 2021.

175687759 Digitally signed
by 1756877591
1 MORELLA MORELLA LUCIA
LUCIA GUILLEN
GUILLEN FERRARO
FERRARO Date: 2021.06.20
21:42:28 -05'00'

Dra. Morella Lucia Guillén Ferraro
Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

DECLARACIÓN EXPRESA DE TUTORÍA

Yo, PhD. Morella Lucia Guillén Ferraro, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de investigación titulado: “Patrón de bandas genéticas en *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter diversus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, propuesto por la Srta. Evelyn Alexandra Diaz Cadena y el Sr. Jhonny Alfredo Silva Guamán, egresados de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentran aptos para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando a los interesados en hacer uso del presente para los trámites correspondientes.



Firma válida sólo para
Procesos de Titulación

PhD. Morella Lucia Guillén Ferraro

**Docente de la carrera de Laboratorio
Clínico e Histopatológico**

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“La responsabilidad del contenido de este Proyecto de Graduación, corresponde exclusivamente a: Evelyn Alexandra Díaz Cadena, Jhonny Alfredo Silva Guamán y Morella Lucia Guillén Ferraro, y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.”



.....
Evelyn Alexandra Díaz Cadena
172661696-2



.....
Jhonny Alfredo Silva Guamán
060328767-3

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, a mis padres por haberme dado la vida y poder cumplir mis sueños, a mis hermanos que me brindaron ayuda y confiaron en mi esfuerzo, a mis tíos y a todas las personas que me guiaron en cada paso que daba hacia la culminación de mis estudios. Agradezco también a la Universidad Nacional de Chimborazo, a la Facultad Ciencias de la Salud y en especial a la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico por haberme permitido cumplir mis sueños también a cada uno de mis profesores que gracias a ellos permitieron formarme no solo de lo académico sino también en lo humano y profesionalismo.

Evelyn Alexandra Díaz Cadena

Quiero agradecer, a la prestigiosa Universidad Nacional de Chimborazo por abrirme sus puertas para formarme profesionalmente en la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico. A cada uno de los docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico por impartirme sus conocimientos y consejos incondicionalmente durante toda la carrera, a todos los establecimientos de salud donde realicé mis prácticas los cuales permitieron que me formara profesionalmente.

Jhonny Alfredo Silva Guamán

DEDICATORIA

Este proyecto va dedicado a Dios por permitirme llegar lejos y en especial tener al pilar fundamental que es mi familia , sobre todo a mi abuelita Carmen Amelia Díaz Enríquez por haberme educado como la persona que soy en la actualidad, gracias por su sacrificio y esfuerzo, porque siempre me supo decir lo importante que es salir adelante , a mis padres gracias por estar presente no solo en esta etapa de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome lo mejor para mí, les agradezco mucho porque a pesar de las adversidades siempre salieron adelante sin importar lo dura que es la vida.

Evelyn Alexandra Díaz Cadena

El presente trabajo de investigación se lo dedico en primer lugar a Dios por brindarme salud y vida, gracias a ello puedo cumplir con todas mis metas, a mi madre Bertha Corina Guamán Herrera por la ayuda incondicional durante toda mi carrera universitaria ya que por medio de su apoyo tanto económico y moral fueron los impulsos para lograr culminar con mi carrera, a mis hermanos quienes supieron apoyarme durante el transcurso de mi carrera para lograr cumplir este sueño.

Jhonny Alfredo Silva Guamán

INDICE

REVISIÓN DEL TRIBUNAL	II
DECLARACIÓN EXPRESA DE TUTORÍA	III
AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
DEDICATORIA	VI
INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE IMÁGENES	X
INDICE DE ANEXOS.....	XI
RESUMEN	XII
Capítulo I. INTRODUCCIÓN.....	1
Aguas de riego	2
Productos agrícolas	2
Contaminación bacteriana de los productos agrícolas	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
Epidemiología y patogenia de las infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i>	4
Aislamiento de <i>P. aeruginosa</i> en aguas riego	7
Aislamiento de <i>P. aeruginosa</i> en productos agrícolas	7
<i>Citrobacter diversus</i>	8
Epidemiología y patogenia de las infecciones causadas por <i>C. diversus</i>	8
Aislamiento de <i>Citrobacter diversus</i> en aguas riego	9
Aislamiento de <i>Citrobacter diversus</i> en productos agrícolas	10
Técnicas Moleculares.....	10
Tipos de técnicas moleculares fenotípicos y genotípicos	11
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	11
Amplificación al azar de ADN polimórfico o <i>RAPD</i> (<i>random amplification polymorphic DNA</i>)	14

PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR <i>arbitrary primer polymerase chain reaction</i>)	15
Capítulo II. METODOLOGÍA	17
Tipo de investigación	17
Población	17
Muestra	17
Criterios de inclusión	17
Criterios de exclusión	18
Métodos de estudio	18
Técnicas y procedimientos	18
Estrategia de búsqueda	19
Capítulo III. DESARROLLO	21
Estudios de técnicas AP-PCR Y RAPD en <i>P. aeruginosa</i>	21
Estudios de técnicas AP-PCR Y RAPD en <i>Citrobacter</i>	35
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Factores de patogenicidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio.....	26
Tabla 3. Estudios de técnicas de patrones de bandas para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Tabla 4. Estudios de técnicas de patrones de bandas para <i>Citrobacter diversus</i>	39

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Etapas de un ciclo de amplificación de PCR	13
Imagen 2. Esquema de la PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR).....	15
Imagen 3. Patrón electroforético generado por los cebadores arbitrarios (Ba1-Ba-7).....	22
Imagen 4. Cepa de referencia R29 y la cepa N26.....	24
Imagen 5. Discriminación de <i>P. aeruginosa</i> por tipificación RAPD.....	25
Imagen 6. RAPD de diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i>	27
Imagen 7. Patrón de bandas de reacción en cadena de la polimerasa de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente.....	37
Imagen 8. Patrón de bandas de reacción en cadena de la polimerasa de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente.....	38

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Gel de Agarosa al 1,5 %	54
Anexo 2. Materiales y Equipos para realizar técnicas moleculares AP-PCR.....	54
Anexo 3. Primers o Cebadores aleatorios.....	55
Anexo 4. Cuba electroforética	55
Anexo 5. Separación de los fragmentos de ADN en el gel de agarosa debido a su peso molecular	56

RESUMEN

Las técnicas moleculares permiten el estudio completo del genoma y sus secuencias específicas de ADN; sus aplicaciones son variables e ilimitadas, como, estudios de expresión genética, detección de mutaciones, diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas, además forman parte fundamental de la diferenciación y evolución de todo ser vivo, demostrándonos características de adaptación como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter diversus* las cuales son bacterias patógenas cuya epidemiología es ampliamente estudiada. La presente investigación tuvo como objetivo describir la utilidad de los patrones de bandas genéticas en *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter diversus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, trabajo de tipo descriptivo, documental, transversal y retrospectivo. La población de estudio quedó conformada por una totalidad de 83 artículos de los cuales tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión entre los artículos del área temática de patrón de bandas genéticas en *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter diversus*, artículos originales, de revisión, tesis, libros publicados en español e inglés, permitió la selección de 41 artículos como muestra, publicados en diferentes bases científicas: Scielo, Pubmed, Dialnet, Medigraphic, Scopus, Elsevier, Redalyc, Libros. Se utilizó métodos de análisis y síntesis para la redacción de la investigación. En este estudio se determinó de acuerdo al análisis de las distintas investigaciones que en su gran mayoría existe variabilidad genética en las bacterias en estudio, por lo que AP-PCR / RAPD-PCR se consideraron como las técnicas moleculares de identificación más rápida para determinar al genoma de cada uno de los microorganismos.

Palabras clave: Técnicas moleculares, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter diversus*, aguas de riego, productos agrícolas, AP-PCR, RAPD-PCR.

ABSTRACT

Molecular techniques allow the complete study of the genome and its specific DNA sequences; Its applications are varied and unlimited, such as gene expression studies, detection of mutations, diagnoses of genetic and infectious diseases. They are also a fundamental part of the differentiation and evolution of all living beings, demonstrating adaptation characteristics such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Citrobacter diversus*, which are pathogenic bacteria whose epidemiology is widely studied. The present research aimed to describe the utility of genetic band patterns in *Pseudomonas aeruginosa* and *Citrobacter diversus* isolated in agricultural products and irrigation waters, descriptive, documentary, cross-sectional and retrospective work. The study population was made up of a total of 83 articles, of which after applying the inclusion and exclusion criteria among the articles in the subject area of the pattern of genetic bands in *Pseudomonas aeruginosa* and *Citrobacter diversus*, original papers, review articles, thesis, books published in Spanish and English, it allowed the selection of 41 articles as a sample, published in different scientific bases: Scielo, Pubmed, Dialnet, Medigraphic, Scopus, Elsevier, Redalyc, Libros. Analysis and synthesis methods were used to write the research. In this study, according to the analysis of the different investigations, the vast majority of genetic variability exists in the bacteria under study, which is why AP-PCR / RAPD-PCR was considered the fastest molecular identification technique to determine the genome of each of the microorganisms.

Keywords: Molecular techniques, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter diversus*, irrigation waters, agricultural products, AP-PCR, RAPD-PCR.

Reviewed by:

Dr. Narcisa Fuertes, PhD. **ENGLISH**

PROFESSOR Cc: 1002091161

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

El perfeccionamiento de las técnicas moleculares, particularmente de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) facilita en gran manera el estudio y caracterización de diversos microorganismos, que anteriormente representaban un reto para su aislamiento a través de técnicas convencionales. La aplicación de la Biología y Genética Molecular a la Microbiología permitió profundizar en el conocimiento de la estructura genómica de los microorganismos para comprender los mecanismos patogénicos en las diversas enfermedades que afectan a los seres vivos especialmente a los humanos¹.

La productividad agrícola y el agua siempre han estado totalmente relacionadas. Al ser una fuente natural renovable, el agua puede agotarse por el uso inadecuado y la demanda en la producción agrícola. En muchas regiones del planeta la disponibilidad del agua se limita por los cambios climáticos que conllevan a largas temporadas de sequía. La agricultura es una fuente de la economía muy importante, con una contribución anual de alrededor del 12 % al Producto Interno Bruto (PIB) de un país, como lo reporta en los últimos años el Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE)².

A nivel mundial, la actividad agrícola se ha convertido en un sector muy importante, con actividades que van desde pequeñas explotaciones de subsistencia hasta grandes compañías multinacionales³.

Proyecciones actuales han indicado que la población mundial de 6 900 millones de personas actualmente pasara a 9 100 millones en 2050. Lo cual, el progreso económico, especialmente en los países emergentes, se traduce en un aumento de la demanda de alimentos y de dietas diversificadas. Por consiguiente, habrá un fuerte crecimiento de la demanda mundial de alimentos, y se prevé que la producción agrícola alimentaria aumentará un 70 % en el mundo y un 100 % en los países en desarrollo. Sin embargo, los recursos de tierras y aguas, la base de nuestra producción agrícola alimentaria, son limitados y se encuentran ya sometidos a una gran presión, por lo que la futura producción agrícola tendrá que ser más productiva y, al mismo tiempo, más sostenible⁴.

Actualmente en nuestro país y provincia no existe un estudio relacionado con Patrones de bandas genéticas en *Pseudomona aeruginosa* y *Citrobacter diversus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, lo cual creímos necesario realizar esta investigación para brindar un aporte científico e informativo para la sociedad.

Aguas de riego

El agua de riego consiste en la dotación de la misma hacia el suelo de los cultivos ya que es un suministro indispensable para un buen crecimiento de los productos agrícolas ⁵.

El agua de riego es un importante factor a considerar para la obtención de altos rendimientos de productos agrícolas, además adquiere cada día más actualidad e importancia debido a la limitación de los recursos hídricos, al aumento de la contaminación de embalses y ríos y a la excesiva explotación de las aguas subterráneas ⁵.

La calidad del agua de riego incide sobre la productividad de los cultivos, la presencia de microorganismos en ella puede significar un efecto benéfico o uno perjudicial ².

Los ríos por lo general se contaminan con los desechos de aguas negras e industriales, residuos agrícolas y materia fecal de criaderos de animales, además con los desechos de la agricultura que incluye fertilizantes, herbicidas, plaguicidas y demás despojos, lo que deja al agua en un estado crítico, por lo que no es apta para el riego de cultivos y mucho menos para el consumo de animales y humanos ².

Productos agrícolas

Un producto agrícola hace referencia a cualquier artículo vegetal, que se origina de la agricultura y que se comercializa para consumo humano. A medida del paso del tiempo la agricultura tradicional ha buscado acrecentar la producción agrícola mediante el manejo del agua, los nutrientes y el control de malezas, insectos y organismos fitopatógenos. Dentro de la producción agrícola existe el cultivo de: granos, cereales y vegetales, es una de las principales e importantes actividades para la subsistencia del ser humano, por lo cual la producción de la misma es siempre una parte relevante de la economía en mayoría de los planetas, independientemente cuan avanzada sea la tecnología o la rentabilidad ⁶.

Contaminación bacteriana de los productos agrícolas

Los contaminantes agrícolas más preocupantes para la salud humana son los patógenos del ganado, plaguicidas, nitratos en las aguas subterráneas, oligoelementos metálicos y los contaminantes emergentes, incluidos los antibióticos y los genes resistentes a los antibióticos excretados por el ganado ⁷.

La enfermedad transmitida por productos agrícolas es el síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afectan la

salud del consumidor. Estas enfermedades se caracterizan por una variedad de síntomas gastrointestinales, como náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal y fiebre; en algunos casos se pueden presentar complicaciones severas, como sepsis, meningitis, abortos, síndrome de Reiter, síndrome de Guillan Barré o la muerte. Ciertas complicaciones son producto de toxinas de origen bacteriano, como por ejemplo, la toxina producida por *Clostridium botulinum*, que puede llegar a generar fallas respiratorias, y la toxina shiga, producida por cepas de *Escherichia coli*, causante del síndrome hemolítico urémico ⁸.

Pseudomonas aeruginosa

La *P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, aerobio, oxidasa positiva. Tiene, gracias a su metabolismo, una cierta facilidad de adaptación que le permite adecuar el hábitat donde se encuentre para utilizar diferentes fuentes como el carbono o el nitrógeno para su nutrición. Posee una cápsula de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas y la protege de la fagocitosis o los iones libres formados en la potabilización del agua, aumentando así su patogenicidad. Debido a esta adaptación al medio ambiente las *Pseudomonas* se han convertido en un problema para la salud pública ya que este microorganismo es capaz de colonizar un amplio rango de nichos dentro de los cuales se encuentra en el agua de riego ⁹.

Características

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, es una especie de bacilo recto o ligeramente curvado, móviles por un flagelo polar que miden de 0,5 a 0,8 µm de ancho y 1,5 a 3 µm, de largo, gram negativos, en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Además, produce amoníaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono¹⁰. Es oxidasa y catalasa positiva y no fermentadora de la lactosa. En la naturaleza puede encontrarse como organismo unicelular o formando biofilms (agrupación de microorganismos en comunidad, que les confiere ventajas frente a la vida libre, aportando mayor resistencia a sustancias químicas agresivas, antibióticos y a los componentes del sistema inmunitario cuando están provocando una infección). Es ubicua, capaz de vivir en una gran variedad de ambientes y de adaptarse a muchos nichos ecológicos, tiene la capacidad de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos como fuente de nutrientes, lo que le confiere la capacidad de colonizar hábitats en los que éstos son limitados. Es una bacteria de vida libre, móvil gracias a su flagelo polar, que la convierte en una potente nadadora en ambientes acuáticos ¹¹.

Epidemiología y patogenia de las infecciones causadas por *P. aeruginosa*

Epidemiología

Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en el agua (ríos, riachuelos, sequias etc.), en los suelos húmedos, en los vegetales y en los materiales húmedos (alimentos, fómites); también puede formar parte de la flora microbiana normal saprófita del ser humano en las zonas húmedas de la piel (axilas, conducto auditivo, región perineal y mucosas). Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero pueden sobrevivir y multiplicarse en la mayoría de ambientes como los que tienen alto contenido de sales y en un rango de temperaturas comprendido entre 20 a 42°C, puede sobrevivir durante al menos 70 días en agua destilada ¹². También, puede crecer en ausencia de oxígeno utilizando el NO₃ como aceptor de electrones. Además, ciertas cepas también han presentado crecimiento incluso a 4°C ¹¹.

Patogenia

Es uno de los principales microorganismos relacionados con las infecciones nosocomiales, responsable aproximadamente de 10 a 15% a nivel mundial. Se le considera la quinta causa más frecuente de enfermedades por infección, la segunda causa de neumonía nosocomial, la tercera causa de infecciones urinarias, el cuarto de infecciones de sitio quirúrgico y el séptimo responsable de sepsis. Este patógeno afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos como en el caso de pacientes quemados o que tienen fibrosis quística. Puede causar un amplio margen de infecciones y esto radica en la gran variedad de factores de patogenicidad que posee. Estos factores se encuentran agrupados en dos variantes: Factores de patogenicidad asociados a la célula bacteriana y factores de patogenicidad secretados por la célula bacteriana ¹³.

Factores de patogenicidad asociados a la célula bacteriana

Dentro de este tipo de factores se encuentra la proteína flagelar FliD, que le confiere a la bacteria la capacidad de adherirse en la mucosa de las vías respiratorias, también cuenta con la proteína flagelar FliC, principal factor que desencadena la secreción de péptidos antimicrobianos por el sistema inmune, además posee la capacidad de ser reconocida a través de los receptores tipo Toll (TLR) tipo 5 (TLR5) teniendo como consecuencia una expresión

de IL-18 e IL-1B, lo que puede desencadenar a una muerte celular piroptótica mediante la vía de vía NFkB (factor nuclear kappa acelerador de la cadena ligera de células B activadas). Presenta, un pili del tipo IV que le confiere la capacidad de adherirse y tener otro tipo de movilidad denominado “*swarming*”. El pili tipo IV contiene a las proteínas PilA, PilB, PilT y PilU. Las últimas dos funcionan como proteínas motoras, así como para la transducción de energía en química ATP y en mecánica mediante la polimerización y despolimerización de PilA. Este pili IV en asociación con dos lectinas solubles, LecA y LecB presentes en la membrana exterior de la bacteria participan en la adhesión hacia las células del hospedero, induciendo daño y diseminación del patógeno, participando de su supervivencia y la formación de biopelícula ¹³.

Factores de patogenicidad secretados por la célula bacteriana

En este tipo de factores se está presente la formación de una biopelícula es su matriz compuesta por diversos factores secretados, entre los que se encuentran: los polisacáridos Pel (sintetizados por PelA–PelG), Psl y alginato; así como ADN extracelular (eADN) y diversas proteínas como las fimbrias reguladas por los grupos de genes: CupA, CupB y CupC, así como las proteínas de membrana LecA y LecB. Como parte de los factores de virulencia secretados, presenta el sistema de secreción de toxinas. Posee cinco sistemas de secreción (I, II, III, V y VI). El sistema de secreción tipo II (SST2) está compuesto de secreciones de multiproteínas codificadas por los operones *xcp* y *hxc*. Dentro de estas secreciones se encuentra las elastasas. La producción de elastasas LasA y LasB están reguladas por el sistema de “quorum sensing”. La elastasa LasB degrada el colágeno y algunas proteínas ausentes de colágeno. El tipo III (SST3) es el principal mecanismo de patogenicidad asociado a la secreción de toxinas que posee la bacteria; por medio de éste secreta toxinas importantes como: Exo A, Exo T, Exo S, Exo U, y ExoY las que pueden llegar a inducir apoptosis. La exotoxina A (ExoA) es secretada al espacio extracelular y corresponde a una ADP-ribosil-transferasa que inhibe el factor de elongación-2 (EF-2), impidiendo la síntesis de proteínas e induciendo la muerte celular. La proteína ExoS es una toxina bifuncional con actividad de proteína activadora de GTPasa (GAP) en el extremo carboxilo terminal y actividad de *adenosina difosfato ribosil transferasa* (ADPRT) en el extremo amino terminal. La proteína ExoT tiene funciones muy parecidas a ExoS ya que también es una toxina bifuncional con actividad de proteína activadora de GTPasa y actividad de ADPRT. La proteína ExoU regula

el incremento de CD95 en las células infectadas, lo que induce la activación de la vía JNK que inducirá, a su vez, muerte de las células infectadas. El sistema de secreción tipo V (SST5), producen lisis de las células eucariotas y que juegan un papel en la producción de biopelícula y adherencia celular. El pigmento denominado como piocianina (un pigmento azul verdoso), es uno de los factores de virulencia, y se refiere a un metabolito secretado que causa disfunción ciliar en el tracto respiratorio, provocando efectos pro-inflamatorios y oxidativos que daña a las células mediante la disrupción de la catalasa y la cadena transportadora de electrones mitocondriales. El Quorum sensing, otro de los factores de virulencia el cual es un mecanismo basado en la comunicación intercelular que permite la adaptación de una población bacteriana a los cambios microambientales. Dos de los principales sistemas del QS son LasIR y RhlIR, y algunos de los genes expresados, son el LasB las que da origen a las elastasas, el operon rhlAB que determina la producción de rhamnolipidos, el operón hcnABC que produce ácido cianídrico y el gen chic para una quintinasa con actividad hidrolasa ¹³ (Ver **Tabla 1**).

Tabla 1 Factores de patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa*

Factores de patogenicidad de <i>Pseudomona Aeruginosa</i>	
Factores	Genes o proteínas involucradas
Asociados a célula bacteriana	
Flagelo	FliC, FliD
Pili (Tipo IV)	PiIA, PiIB, PiIT, PiLU
Proteína de membrana	LecA, LecB, LPS
Secretados	
Factores asociados a la formación de biopelículas	PelA-PelG, Psl, alginato
Efectores SST2	LasA, LasB
Efectores SST3	ExoA, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY
Efectores SST5	EstA
Pigmentos	Piocianina
Efectores quorum sensing	LasIR, RhlIR, rhlIAB, hcnABC, chic
SST2, sistema de secreción tipo 2; SST3, sistema de secreción tipo 3; sistema de Secreción tipo 5.	

Fuente: Paz Zarza M, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria, 2019.

Aislamiento de *P. aeruginosa* en aguas riego

Investigaciones recientes llevadas a cabo en la Provincia de Chimborazo, Ecuador, señalan la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en las aguas de riego del río Chambo ¹⁴.

En la ciudad de Miyazaki, se recolectaron muestras de dos ríos: el río Kiyotake y del río Yae. En los cuales se aislaron 218 cepas de *P. aeruginosa* del río Yae y 298 cepas de la misma del río Kiyotake, identificando una resistencia a diferentes antibióticos como: la tetraciclina y minociclina que fueron 100% y 99%, respectivamente, por lo tanto, estos antibióticos fueron ineficaces contra *P. aeruginosa*. Por otro lado, el 97% de los aislamientos mostró una resistencia intermedia o completa a la cefotaxima, y 143 aislamientos eran resistentes a imipenem ¹⁵.

En un estudio realizado en varios ríos de la Huasteca Potosina en México, se aislaron e identificaron 15 colonias de bacterias y una levadura capaces de crecer en presencia de petróleo, siendo la más frecuente *Pseudomonas aeruginosa* con 8 colonias identificadas equivalente al (50.0%), esta bacteria desarrollo una resistencia y a la vez el mecanismo de degradación del petróleo en un medio ambiente contaminado con el mismo, por lo que los autores concluyen que a futuro sería una excelente alternativa para la eliminación y degradación del petróleo ¹⁶.

En una investigación llevada a cabo en Argentina en las aguas del río Limay en un tramo comprendido entre: Senillosa – Plottier, se aislaron e identificaron 20 cepas bacterianas del género *Pseudomonas*. Los 20 aislamientos presentaron fluorescencia al exponerlos a la luz ultravioleta, esto permitió constatar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, estas presentaron una resistencia a los antibióticos Imipenem (50%) Meropenem (20%). Asimismo, los resultados de susceptibilidad a los dos antibióticos juntos revelaron resistencia de un 20% de las cepas aisladas, y sensibilidad disminuida en un 25% de las mismas ¹⁷.

Aislamiento de *P. aeruginosa* en productos agrícolas

En un estudio, realizado en vegetales cultivados y regados con aguas del río Guamote, en la Provincia de Chimborazo, Ecuador, se aislaron e identificaron 10 especies de bacterias patógenas gramnegativas, entre ellas 3 cepas de *Pseudomona aeruginosa*, las cuales presentaron un mecanismo de resistencia al antibiótico aztreonam, con esto los autores

Concluyeron que existe la presencia de bacterias de interés clínico en los productos agrícolas cultivados y regados con aguas del río Guamote ¹⁸.

En una investigación realizada en vegetales obtenidos de varios mercados y supermercados de Jamaica se aislaron 88 cepas de *P. aeruginosa* de un total de 95 muestras de vegetales analizadas siendo esta susceptible a Imipenem (100%), gentamicina (97%), ciprofloxacina (93%) y ceftazidima (79%). Sin embargo, todos los aislamientos fueron resistentes a la ampicilina y el 84% y el 83% fueron resistentes al cloranfenicol y al sulfametoxazol/trimetoprim, respectivamente ¹⁹.

En Ecuador, provincia de Chimborazo se aislaron e identificaron bacterias patógenas encontradas en productos agrícolas comercializados en los supermercados de la ciudad de Riobamba, se aislaron un total de 37 cepas de enterobacterias de las cuales dos cepas pertenecían a *Pseudomona aeruginosa* siendo esta sensible en un 90% a los antibióticos Imipenem, ciprofloxacina, gentamicina sin evidenciar ningún tipo de mecanismo de resistencia²⁰.

Citrobacter diversus

Es un bacilo gramnegativo, móvil anaerobio facultativo perteneciente a la división de enterobacteriáceas, que se encuentra frecuentemente en la vía genitourinaria y el aparato gastrointestinal de animales y humanos como flora saprófita. *Citrobacter* es una bacteria oportunista, no reconocida como patógeno de las vías respiratorias superiores ²¹.

El *Citrobacter* es diferenciado por la formación de sulfuro del hidrógeno, producción de Indol y fermentación de Adonitol y Malonato de Sodio. Esta bacteria está ampliamente diseminada en la naturaleza encontrándose en la tierra, en el agua y ocasionalmente habita en el tracto gastrointestinal del hombre, usualmente puede causar enfermedad en pacientes comprometidos y también ha sido asociado con epidemias esporádicas de gastroenteritis ²¹. *Citrobacter* puede identificarse y confirmarse sólo mediante cultivo. Todas las especies identificadas como *Citrobacter* fermentan la glucosa con la producción de gas. El patrón de susceptibilidad de los aislamientos ayuda a la identificación ²².

Epidemiología y patogenia de las infecciones causadas por *C. diversus*

Epidemiología

Las infecciones por *Citrobacter* tienen epidemiología y manifestaciones clínicas similares a las de las infecciones por *Enterobacter*. El género *Citrobacter* se encuentra con frecuencia

En agua, alimentos, tierra y ciertos animales. Los aislamientos humanos de todas las especies, excepto *C. koseri*, se han obtenido predominantemente de materia fecal. Es parte de la flora normal de una pequeña proporción de seres humanos sanos, pero las tasas de colonización se incrementan en los individuos internados en instituciones de cuidados de largo plazo y hospitales, situaciones en las que casi siempre ocurren las infecciones. El género *Citrobacter* causa 1 a 2% de las infecciones nosocomiales. Los huéspedes afectados suelen tener inmunodepresión o enfermedades concomitantes. *Citrobacter* causa infecciones extraintestinales similares a las causadas por otros bacilos gramnegativos ²¹.

Patogenia

Son capaces de producir infecciones hospitalarias como neumonías e infecciones del tracto urinario, formando lesiones muy características produciendo síntomas como ardor al orinar, poliaquiuria y puede presentar dolor en la parte baja de la espalda o la pelvis ²³.

Estos microorganismos pueden producir patologías importantes, especialmente en huéspedes inmunosuprimidos, con mayor predilección por el sistema nervioso central; en neonatos se asocian con meningitis, abscesos cerebrales, ventriculitis, panoftalmatitis y sepsis. La mayoría de los casos son esporádicos, sin una fuente clara de infección. Se presenta como uno de los patógenos más importantes en unidades de cuidados neonatales hospitalarios, causando a las largas epidemias de difícil control ²¹.

Aislamiento de *Citrobacter diversus* en aguas riego

En Ecuador, en la Provincia de Chimborazo, recientemente se aislaron bacterias patógenas para el ser humano en aguas del río Guano, entre ellas doce especies de la familia *Enterobacteriaceae*, y dentro de éstas, *Citrobacter diversus*, que resultó resistente a tetraciclina y amoxicilina ²⁴.

Según una investigación realizada en Venezuela en aguas y sedimentos marinos de diferentes Playas de la Isla Margarita, se aislaron un total de 133 cepas bacterianas de las cuales 92 provenían de muestras de agua de mar y 41 de sedimentos, el 91% de las cepas aisladas fueron bacilos gramnegativos y el 9% estreptococos grampositivos. En las muestras de agua se identificaron 12 especies dentro de la cual se encontraba *Citrobacter diversus* el cual presentó resistencia a los siguientes antibióticos: ampicilina y eritromicina en un 100% y cefotaxima en un 70% ²⁵.

Aislamiento de *Citrobacter diversus* en productos agrícolas

En Ghana se tomaron muestras de un total de 120 tomates, de los cuales se analizaron 60 tomates frescos, firmes y sin daños y 60 tomates en mal estado en donde se recuperaron un total de 66 aislamientos bacterianos, el 68,2% se asociaron a tomates en mal estado y el 31,8% a tomates frescos. En este estudio se aislaron once bacterias diferentes, dentro de ellas *Citrobacter sp*, la cual fue resistente a ampicilina (63,1%), tetraciclina (60,1%) y cefuroxima (59,1%)²⁶.

En una investigación realizada en Ecuador, en la provincia de Chimborazo se aislaron bacterias de interés clínico en productos agrícolas regados con aguas del río Chanchán. La familia *Enterobacteriaceae* fue la más aislada y dentro de esta se encontró presente *Citrobacter diversus*, resistente a ampicilina y amoxicilina, los autores concluyeron que los productos vegetales estudiados constituyen un riesgo para la salud, por estar contaminados con enteropatógenos²⁷.

En Ecuador, en la Provincia de Chimborazo, se aislaron e identificaron bacterias en productos agrícolas, regados con aguas del río Guano, en el cual la familia *Enterobacteriaceae* fue la más aislada dentro de esta se identificó a *Citrobacter diversus* el cual mostró resistencia a amoxicilina²⁸.

Tomando como ejemplo la investigación realizada en Tanzania donde analizaron la contaminación bacteriana en frutas y verduras en sistemas de producción de pequeños agricultores, en esta investigación determinaron que la contaminación bacteriana fue alta (63,2%), lo cual género *Citrobacter* obtuvo el 26,8%, llegando a concluir que este género es uno de los encontrados en este tipo de estudios²⁹.

Técnicas Moleculares

Las técnicas moleculares permiten el estudio completo del genoma sus secuencias específicas de ADN estas pueden ser cortas o largas con el fin de descartar y analizar secuencias de interés para una investigación en distintos tipos de diagnóstico clínico; cada una de estas técnicas se caracteriza por la rapidez y confiabilidad en la obtención de resultados³⁰.

Sus aplicaciones son variables e ilimitadas, ejemplo de ello, es la posibilidad de realizar estudios de expresión genética, secuenciación directa de secuencias amplificadas, detección de mutaciones, seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades, diagnósticos

de enfermedades genéticas e infecciosas y en ciencia forense en la identificación de restos biológicos, determinación de paternidad y pruebas periciales en criminalística ³⁰.

Tipos de técnicas moleculares fenotípicos y genotípicos:

Los métodos fenotípicos se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas, estos constituyen la primera herramienta para la comparación de microorganismos que incluye la determinación de actividades enzimáticas, la capacidad metabólica y los determinantes antigénicos o susceptibilidad a agentes bactericidas; sin embargo, con este tipo de métodos no se pueden identificar genes, polimorfismo o mutaciones que determinen la expresión de las características visibles en medios de cultivos, pruebas bioquímicas y de susceptibilidad ^{30, 31}.

Los métodos genotípicos estudian el genoma del microorganismo causal de la enfermedad y posibilitan el análisis de características de polimorfismo genético concurrente en los agentes etiológicos.²³ amplifican regiones *in vitro* específicas de ADN al emplear secuencias que delimitan la zona de amplificación; a partir de una copia de la región a amplificar se adquieren millones de copias que posibilitan su detección y reflejan la presencia de la región de ADN en la muestra a analizar se basan en la localización del material genético del organismo, lo que permite generar nuevos cambios en el patrón de expresión genética, y brinda alternativas más estables y reproducibles ³⁰.

Dentro de los métodos moleculares genotípicos que aportan significativamente en un estudio se encuentran los denominados marcadores RAPD (Polimorfismo amplificado aleatorio ADN), quienes se basan en la RCP, gracias a ellos es posible la detección de los polimorfismos existentes en la secuencia de ADN a estudiar, y los RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción) los cuales expresan las diferencias entre individuos en secuencias específicas del ADN y que son reconocidas por diferentes enzimas que cortan dichas secuencias, y da origen a pequeños fragmentos que pueden ser analizados a través de electroforesis ³⁰.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Ideada por el científico Kary Mullis a mediados de los 80 y más conocida como PCR (*polimerase chain reaction*)), la reacción en cadena de la polimerasa ha cambiado el curso de las ciencias biológicas y biomédicas más que cualquier otra técnica inventada durante el siglo XX. El gran éxito científico de la PCR reside en que permite obtener *in vitro* un gran

número de copias de fragmentos específicos de ADN, basándose en un principio muy sencillo: la utilización de mecanismos similares a los empleados por la propia célula en la replicación del ADN durante la división celular ³².

La Reacción en Cadena de la Polimerasa ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular al punto de alcanzar gran versatilidad como técnica de análisis. La especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la PCR se encuentra directamente influenciada por los diferentes componentes que la integran como la mezcla de reacción, régimen de ciclaje y el ADN polimerasa; la técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conocer las secuencias que lo flanquean, obtener una secuencia de ADN concreta sin recurrir a la clonación en un organismo huésped ³³.

La reacción en cadena de la polimerasa consiste en la repetición cíclica de tres etapas:

La desnaturalización del ADN bicatenario presente en la muestra para separar las dos cadenas, mediante la aplicación de temperaturas superiores a 90°C. La unión específica de los cebadores (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases y la temperatura a la que se realiza esta unión o alineamiento, es muy importante para controlar la especificidad de la reacción ³⁴. La temperatura depende de la composición de bases y del tamaño de los cebadores. Se suelen emplear dos cebadores que se unen cada uno a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. La selección de dichos cebadores constituye uno de los puntos más críticos del ensayo de PCR ³⁵. La extensión de la cadena de ADN a copiar a partir de los cebadores, utilizando los nucleótidos presentes en la solución. Dicha extensión la lleva a cabo la enzima ADN polimerasa, que inicia su actividad tras reconocer la unión de los cebadores a las cadenas de ADN de la muestra. Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana delimitada por la pareja de cebadores específicos. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en los subsiguientes ciclos, la cantidad de ADN generado se incrementa exponencialmente. De este modo, al final de n ciclos el número de copias de ADN por cada molécula será de 2^n ³³. (**Ver Imagen 1**).

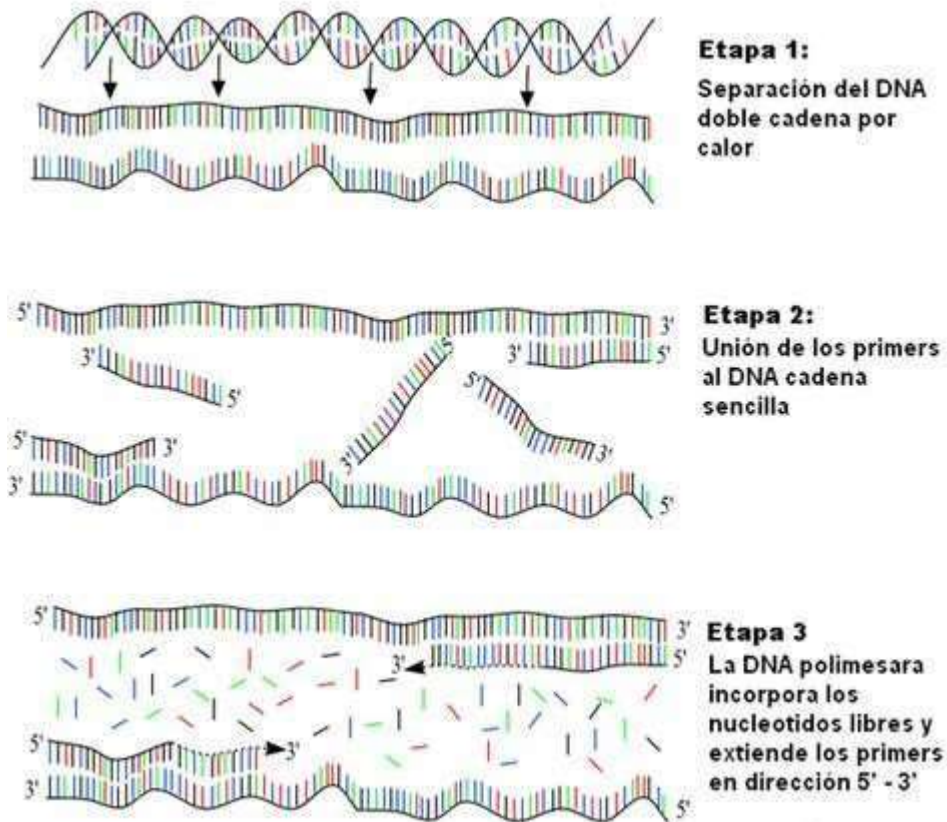


Imagen 1. Etapas de un ciclo de amplificación de PCR

Fuente: León I. ¿Cuales son las diferencias entre PCR, RT PCR, Q PCR y RTQPCR?, 2017.

Un proceso de PCR típico, de entre 20 a 40 ciclos, permite amplificar por tanto un millón de veces como mínimo el número de copias del fragmento de ADN diana que exista en la muestra original. Los fragmentos amplificados se detectan fácilmente mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio³⁶.

El bromuro de etidio es una sustancia fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN, posibilitando su visualización cuando se ilumina con luz ultravioleta. Cuando los fragmentos esperados son de un tamaño muy pequeño se pueden emplear también geles de poliacrilamida. La utilización de polimerasas termoestables junto con el diseño de termocicladores, aparatos que permiten llevar a cabo los ciclos de tiempo y temperatura necesarios de un modo rápido, han permitido la completa automatización de la técnica de PCR, facilitando así su empleo rutinario³⁷.

Otro factor clave para la expansión de esta técnica ha sido la creciente disponibilidad de cebadores específicos, posibilitada tanto por los avances en las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos que han permitido conocer las secuencias de un número considerable de genes, como por el desarrollo de equipos y reactivos que permiten una síntesis rápida y económica de los mismos. La técnica de PCR presenta sin embargo una limitación: es necesario conocer parte de la secuencia que se quiere amplificar, al menos aquellas zonas en las que se van a unir los cebadores. Esto, que en principio podría suponer un importante obstáculo a la hora de amplificar los ADN desconocidos, se ha conseguido resolver siguiendo distintas estrategias. Por un lado, se pueden utilizar las secuencias génicas de diversas especies conocidas para buscar regiones conservadas sobre las que diseñar cebadores denominados universales, que permitan la amplificación del mismo gen en una gran variedad de especies³⁵.

Amplificación al azar de ADN polimórfico o *RAPD* (*random amplification polymorphic DNA*)

Fue desarrollada por Williams y colaboradores en 1990 y se caracteriza por utilizar un único cebador de 10 nucleótidos que hibrida aleatoriamente, en condiciones de baja temperatura (entre 36 y 45 °C), con regiones inespecíficas del cromosoma. Los productos de amplificación se separan generalmente en geles de agarosa y se tiñen con bromuro de etidio. Este método de tipificación es rápido, poco laborioso y permite realizar un análisis sencillo de los perfiles de bandas. Una ventaja es que no es necesario el conocimiento previo de la secuencia del genoma del organismo que se está investigando³⁸.

RAPD es una adaptación de la PCR que se basa en el razonamiento de que, con una baja astringencia, es probable que un cebador oligonucleotídico sintético encuentre una serie de secuencias en el ADN molde con el que puede aparearse cuando estos sitios están cerca unos de otros y se encuentran en orientaciones opuestas, por lo que la secuencia de ADN entre los sitios se amplificará para producir un fragmento de ADN característico de ese genoma. Las bandas múltiples de diferentes tamaños producidas a partir del mismo ADN genómico constituyen una "huella dactilar" de ese genoma. Los patrones de diferentes individuos y especies variarán en función de cuán similares sean las secuencias de ADN genómico entre muestras³⁹.

PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR *arbitrary primer polymerase chain reaction*)

Se considera una variante especial de RAPD. Fue propuesta por Welsh y McClelland en 1990, esta técnica utiliza un único cebador de aproximadamente 15 pares de bases que no está dirigido a amplificar cualquier secuencia específica de ADN procariota o eucariota. Por el contrario, a bajas temperaturas de anillamiento, el cebador se hibridará en múltiples ubicaciones cromosómicas aleatorias e iniciará la síntesis de ADN. Si una copia del cebador se une a una cadena de ADN y otra copia del cebador se une a la cadena opuesta de ADN pero cerca del primer cebador, se sintetizará un fragmento de ADN y por lo tanto ocurrirá su amplificación (**Ver Imagen 2**). El resultado de la separación de los productos de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa es por lo tanto un patrón de bandas, las cuales, en teoría, son características de la bacteria que se está estudiando ⁴⁰.

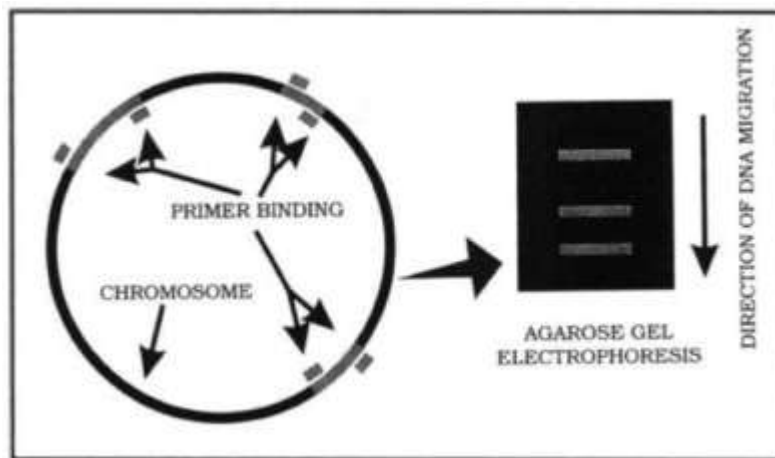


Imagen 2. Esquema de la PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR).

Esquema de la PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR). Izquierda: unión del cebador en dos lugares en las hebras opuestas de ADN próximas entre sí. Derecha: gel de agarosa con los productos de amplificación usando PCR con cebador al azar ⁴¹.

Fuente: Tenover F, et al. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. 2011

Esta metodología es mucho más susceptible a la variación técnica que la PCR de rutina empleando cebadores dirigidos a secuencias conocidas. En la AP-PCR puede haber variaciones sustanciales en la eficiencia con la que los cebadores inician la síntesis de ADN en un sitio en particular, dependiendo incluso de pequeñas variaciones en el pH o la fuerza

iónica de los tampones utilizados, el método de extracción del ADN molde y su concentración, el tipo de Taq polimerasa, el tipo de termociclador y, sobre todo, la temperatura de hibridación y la concentración de iones magnesio. En consecuencia, se ha observado, en amplificaciones de la misma cepa llevadas a cabo en momentos diferentes, que el número de copias generado a partir de un *locus* particular pueden ser apreciablemente diferentes, produciendo variaciones amplias en las intensidades de los fragmentos individuales. Estos factores pueden dificultar la obtención de patrones e interpretaciones reproducibles con AP-PCR, particularmente cuando se intenta comparar los aislados evaluados en distintos días. En este punto, los resultados más confiables se obtienen cuando un conjunto de los aislados se prueba en una sola reacción de amplificación y se analizan en un solo gel electroforético ^{42, 43,44}.

AP-PCR se usa generalmente para comparar el perfil genómico de cepas y puede ser muy útil para investigar brotes de infecciones. La ventaja que ofrece es la posibilidad de multiplicar los ensayos con varios cebadores, lo que conduce a patrones de amplicones distintivos que aumentan la discriminación entre las cepas que se están estudiando. Además, no es necesario el conocimiento previo de la secuencia del genoma del organismo.

El propósito de la presente investigación fue describir la utilidad que tiene el estudio de los patrones de bandas genéticas, obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores aleatorios, en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter diversus* obtenidos a partir de productos agrícolas y aguas de riego.

Capítulo II. METODOLOGÍA

Tipo de investigación

Nivel: esta investigación es de tipo descriptiva, pues nos ayuda a puntualizar las Características de nuestra población es estudio, mediante la utilización de diversas fuentes bibliográficas, la metodología utilizada para estudiar la determinación de patrones de bandas genéticas en las diferentes bacterias, como *Pseudomona aeruginosa* y *Citrobacter diversus*.

Diseño: es documental debido a la compilación de información científica obtenida de distintas bases de datos.

Según la secuencia temporal: el tipo de investigación es de carácter transversal puesto que la investigación se efectuó en el período comprendido entre los años 2011 al 2021.

Según la cronología de los hechos: la metodología usada fue de tipo retrospectivo porque se llevó a cabo en base a estudios ya realizados como artículos científicos, tesis doctorales, revisiones bibliográficas y libros verificados.

Población

La presente investigación se desarrolló mediante una revisión bibliográfica documental, donde la población de estudio quedó conformada por la totalidad de 83 artículos científicos revisados en los que se aborda la temática, patrones de bandas genéticas en *Pseudomona aeruginosa* y *Citrobacter diversus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego, publicados en revistas indexadas en bases regionales y de impacto mundial entre las que se ubican Scielo, Redalyc, Pubmed, Elsevier, Medigraphic, Scopus, Dialnet, divulgados durante el período comprendido entre los años 2011 al 2020.

Muestra

Para la selección de la muestra se procedió a una investigación en las bases de datos previamente mencionadas, de las cuales se escogieron 41 publicaciones, cuya selección se realizó tomando en consideración los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- Artículos basados en la temática: patrones de bandas genéticas en *Pseudomona aeruginosa* y *Citrobacter diversus* en productos agrícolas y aguas de riego.
- Los documentos deben ser artículos científicos originales, ensayos científicos, tesis doctorales y libros.

- Las bibliografías investigadas deben estar en el límite de tiempo entre los años 2011 al 2021.
- Artículos que estén en idiomas español e inglés.

Criterios de exclusión

- Artículos sobre resistencia antimicrobiana.
- Artículos que estén fuera del límite tiempo.
- Artículos que no tengan resumen.
- Bibliografías científicas en idiomas diferentes al español e inglés.

Métodos de estudio

Se usaron técnicas de análisis y síntesis de diferentes artículos científicos, libros y tesis doctorales con el objetivo de obtener resultados. En esta investigación se buscó información para poder sustentar el proyecto, mediante la siguiente interrogante ¿Cuáles son los patrones de bandas genéticas en *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter diversus* en productos agrícolas y aguas de riego?

Técnicas y procedimientos

En esta búsqueda de información se empezó estableciendo los principales parámetros, uno de ellos fue que debían buscarse referencias bibliografías durante el periodo comprendido entre los años 2011 al 2021. Para lo cual, se indagaron fuentes de datos científicas como: Scielo, Redalyc, Pubmed, Elsevier, Medigraphic, Scopus, Dialnet. Para ello, se tomó en cuenta la información más relevante que se encontraban en el tiempo establecido.

También se tomó en cuenta para la búsqueda de información los idiomas español e inglés. Se utilizaron palabras claves en español como: biología molecular, bandas genéticas, bacterias, *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter diversus*, productos agrícolas, aguas de riego, técnicas moleculares, reacción en cadena de la polimerasa con cebadores aleatorios, ADN polimórfico amplificado al azar. Del mismo modo se utilizaron palabras claves en inglés como son: *molecular biology*, *genetic bands*, *bacteria*, *Pseudomona aeruginosa*, *Citrobacter diversus*, *agricultural products*, *irrigation waters*, *molecular techniques*, *arbitrary primers polimerase chain reaction (AP-PCR)*, *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*.

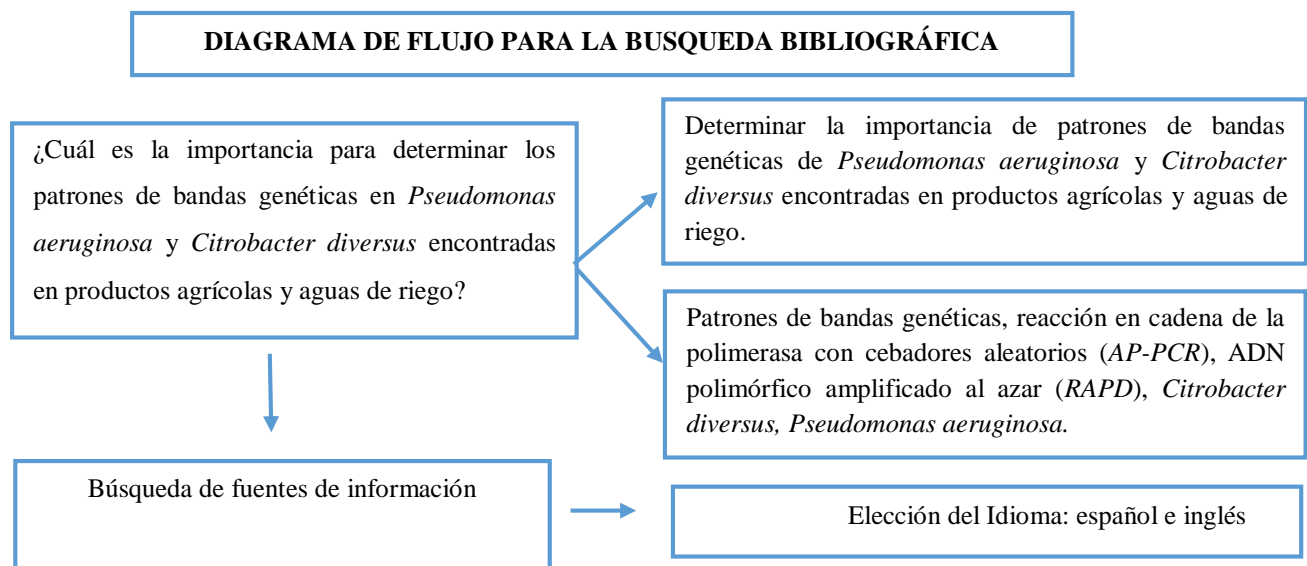
Los operadores booleanos utilizados fueron: “AND”, “OR”, “NOT” cuando la revisión se hizo en el idioma inglés. En español, se utilizó “Y”, “O” y “NO”. Se combinaron las palabras clave con los conectores para poder encontrar artículos científicos válidos para el objetivo de trabajo.

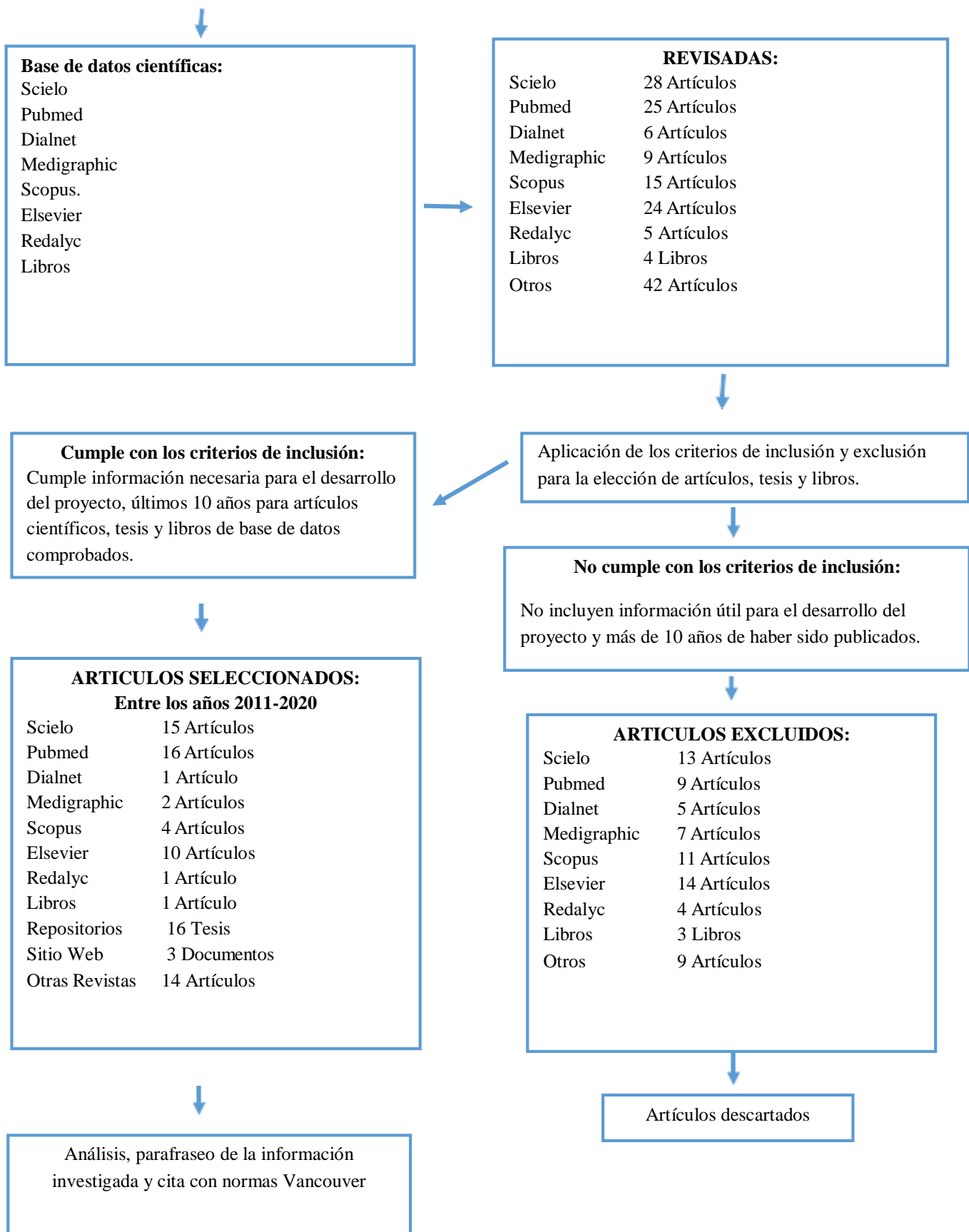
Ya encontrada la información sobre la temática con las diferentes palabras claves en inglés y español se clasificaron estos datos científicos mediante los criterios de inclusión y exclusión. Se analizaron cada uno de los artículos, tesis doctorales y libros relacionados con el tema los cuales ayudaron a la realización del informe final de investigación.

En total se recabaron 83 publicaciones científicas, que proporcionaron información relevante para este estudio y que fueron registradas con sus respectivas citas y referencias de acuerdo con las Normas Vancouver.

Estrategia de búsqueda

Se describió la estrategia de búsqueda bibliográfica, para identificar los documentos o artículos que contenían información útil, siguiendo el diagrama de flujo que se muestra a continuación:





Capítulo III. DESARROLLO

La amplificación con cebador arbitrario / aleatorio de ADN polimórfico (AP-PCR / RAPD-PCR) se ha señalado como un método para la caracterización genética de microorganismos. Se utiliza para producir huellas dactilares de ADN simples y reproducibles en presencia de cebadores cortos diseñados al azar. Tanto las variaciones genómicas entre especies bacterianas como el polimorfismo genético entre cepas bacterianas podrían identificarse como las diferencias en el tamaño molecular y número de fragmentos de ADN obtenidos ⁴⁵. La revisión en las diferentes bases de datos no arrojó investigaciones de *Pseudomonas aeruginosa* caracterizada por la técnica AP-PCR /RAPD-PCR en aguas de riego, ni en productos agrícolas en el período de tiempo estudiado, sin embargo, se encontraron algunos trabajos en otros tipos de aguas, algunos de los cuales se describen a continuación.

Estudios de técnicas AP-PCR Y RAPD en *P. aeruginosa*

En un estudio llevado a cabo en muestras de sedimento recolectado de la zona de manglares del estuario de Vellar, India, se identificaron tres aislamientos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus circulans* y *Serratia marcescens*, mediante características morfológicas y pruebas bioquímicas. La investigación fue realizada mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa utilizando ADN polimórfico amplificado al azar (*RAPD-PCR*), para ello se utilizaron siete cebadores decaméricos de secuencia arbitraria (Ba-1-Ba-7), seleccionados en base al número e intensidad de las bandas resultantes, la reproducibilidad y el potencial para discriminación de los productos amplificados. Las condiciones de los ciclos de la PCR fueron: una fase inicial de desnaturalización a 94° C durante 3 min y 40 repeticiones a 94° C durante 1 min, 35° C durante 1 min y 72° C durante 1,5 min. La fase de extensión final se prolongó durante 10 min a 72° C en el último ciclo. Los productos de amplificación se fraccionaron mediante electroforesis en agarosa al 2%. Como resultado de este estudio, se observaron 67 bandas (alelos) específicos en las 3 especies bacterianas: 25 bandas en *P. aeruginosa*, 19 bandas en *B. circulans* y 23 bandas en *S. marcescens* ⁴⁶. (**Ver Imagen 3**).



Imagen 3. Patrón electroforético generado por los cebadores arbitrarios (Ba1-Ba-7)

En tres especies bacterianas. Carriles 1, 13 y 20: escalera de ADN de 500 pb. Carriles 1, 4, 8, 14, 17, 21, y 24: *Pseudomonas aeruginosa*. Carriles 2, 5, 10, 15, 18, 22, y 25: *Bacillus circulans*. Carriles 3, 6, 12, 16, 19, 23 y 26: *Serratia marcescens* ⁴⁶.

Fuente: Thangaraj M, et al. RAPD Fingerprinting and Demonstration of Genetic Variation in Three Pathogens Isolated from Mangrove Environment, 2011.

En la discusión, los autores señalan con respecto al método utilizado, que los cebadores que dan más productos de amplificación y, en consecuencia, más bandas en las huellas dactilares son los que deben ser seleccionados. Señalan también que la desventaja de la RAPD-PCR, es la baja reproducibilidad de las bandas, debido a ello se debe realizar una estandarización estricta de las condiciones de PCR, porque el uso de diferentes polimerasas, proporciones ADN/cebador y diferentes temperaturas de alineamiento, pueden llevar a una discrepancia en los resultados obtenidos cuando se comparan con otros laboratorios o en diferentes períodos de tiempo, aún utilizando las mismas cepas. Los autores sugieren que la metodología de tipificación por RAPD-PCR puede ser un método rápido para conocer las diferencias potenciales del genoma de cada uno de los microorganismos investigados así como el estudio de su epidemiología ⁴⁶.

El aislamiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de ambientes acuáticos se considera importante desde el punto de vista de la salud pública, debido a su ubicuidad y patogenicidad.

Pappa O, Mandilara G y Col, llevaron a cabo una investigación en Grecia, aislando 70 cepas de esta bacteria en muestras de agua de varias regiones geográficas de ese país, las cuales fueron estudiadas en el Laboratorio Central de Salud Pública: 17 de aguas de red, 4 de piscinas, 9 de pozos, 1 de manantial y 17 muestras de aguas residuales. La identificación fenotípica se basó en el hecho de que las colonias productoras de piocianina se consideran *P.*

aeruginosa positivas. Fueron utilizados como controles positivos dos cepas de referencia: N26 y R29. Las cepas aisladas fueron también evaluadas mediante tipificación serológica y análisis por electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE). Para la tipificación mediante la RAPD-PCR, se utilizaron dos cebadores, 208 (5'-ACGGCCGACC-3') y 272 (5'-AGCGGGCCAA-3')⁴⁷. La amplificación se realizó según la metodología de Rademaker et al. 2000 (48) y los productos RAPD fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. La identificación fenotípica permitió la confirmación de 70 colonias de *P. aeruginosa* en total (20 de la red agua, siete de piscinas, dos de agua de pozo, 10 de perforaciones, dos de agua de manantial y 29 de muestras de aguas residuales). Mediante la RAPD-PCR, cuarenta y nueve de las 70 cepas identificadas como *P. aeruginosa*, fueron analizadas por comparación de las bandas en los geles, las que diferían en una o más bandas fueron considerados como pertenecientes a diferentes tipos de RAPD. De esta manera, el análisis de los 49 aislados dio como resultados 18 genotipos⁴⁷ (**Ver Imagen 4**).

Los autores discuten la importancia de la pureza del ADN, sí como la concentración del cebador y el ion Mg^{+2} para obtener una alta reproducibilidad en RAPD. En base al número de bandas más intenso y alto, eligieron el cebador 208 como control para el ensayo RAPD. En este estudio, la serotipificación se utiliza como método estándar de tipificación fenotípica. Señalan que es necesario el uso de métodos de identificación molecular, ya que demostraron que cada ensayo RAPD logró tipificar un mayor número de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con resultados confiables y fáciles de interpretar en comparación con la metodología serológica, estos hallazgos demostraron la presencia de diferentes clones de *Pseudomonas aeruginosa* circulando en Grecia⁴⁷. (**Ver Imagen 4**).

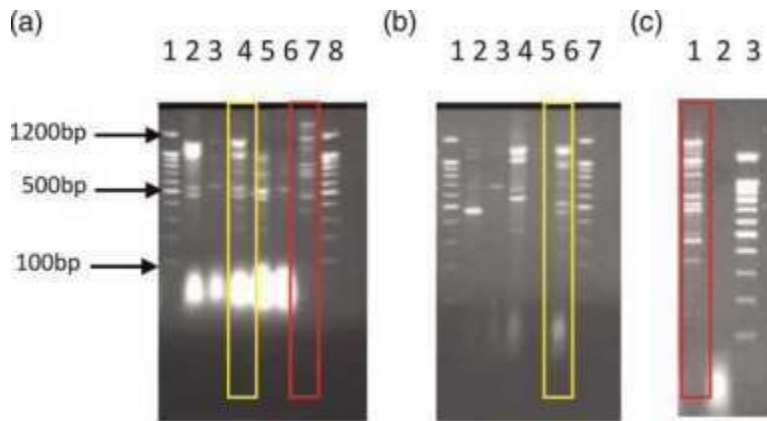


Imagen 4. Cepa de referencia R29 y la cepa N26

Cepa de referencia R29 (imágenes de las líneas 7 y 1) y la cepa N26 elegida al azar (líneas 4 y 6, imágenes a y b) produjeron perfiles idénticos en el ensayo RAPD. Se cargó una escalera de ADN de 100 pb en las líneas 1 y 8 (imagen a), 1 y 7 (imagen b) y en la línea 3 (imagen c).

Fuente: Pappa O, et al. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Greek water samples by three typing methods: serotyping, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), 2013.

Las piscinas y otras aguas recreativas por lo general se asocian al bienestar y beneficios para la salud, sin embargo, pueden constituir un peligro de tipo microbiológico, por los microorganismos que se pueden encontrar en dichas aguas y sus instalaciones relacionadas. Amagliani G y Col, en su investigación realizada en Italia recolectaron un total de 44 muestras de agua, 17 agua de piscina y 27 de la entrada de agua. *Pseudomonas aeruginosa* se aisló y caracterizó de acuerdo con la producción de piocianina (colonias azul verdosas, fluorescentes) para la cual esta bacteria es positiva ⁴⁹. También se hizo la caracterización molecular para la confirmación de la especie mediante la amplificación de un fragmento específico de 528 pb del gen *ecfX*. La tipificación RAPD- PCR se realizó de acuerdo con Lanotte et al. (2004) con el cebador 272 (50-AGCGGGCCAA-30) ⁵⁰. Los productos de PCR se procesaron en gel de agarosa al 1,5% con escalera de peso molecular de 100 pb. Para probar el poder discriminatorio de la tipificación RAPD con el cebador 272, se utilizaron cuatro cepas adicionales de *P. aeruginosa*, junto con aislamientos obtenidos de muestras de agua de otras piscinas. Como se muestra en el Panel B de la Ilustración 5, la huella digital RAPD permite diferenciar todas estas cepas distintas de *P. aeruginosa*. En el Panel A, se

muestran todas las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de las muestras de agua de la piscina estudiada, utilizando el mismo protocolo, encontrándose que poseían perfiles de huellas dactilares RAPD idénticos. Los investigadores concluyen que los resultados pueden explicarse por la presencia de biopelícula en la tubería de entrada de agua y están respaldados por la tipificación RAPD de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* que indican su correlación epidemiológica ⁴⁹.

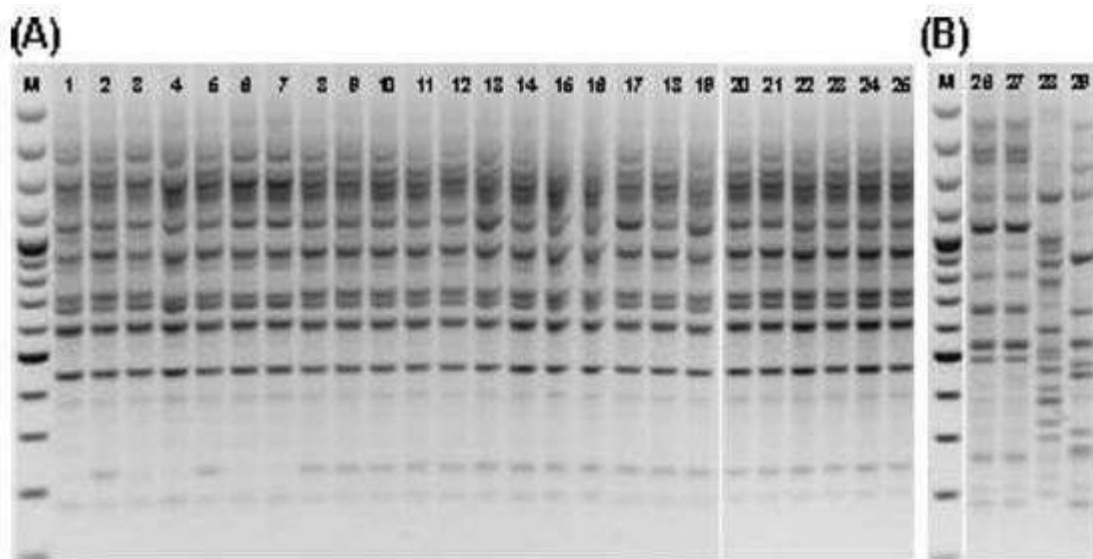


Imagen 5. Discriminación de *P. aeruginosa* por tipificación RAPD.

Se muestra la capacidad de la toma de huellas dactilares RAPD con el cebador 272 para agrupar aislados idénticos (Panel A) y diferenciar distintos aislados dentro de la especie *P. aeruginosa* (Panel B). Carril M, Escalera Plus, Fermentas de 100 pb. Carriles 1–25, *P. aeruginosa* aislada de agua recreativa; carril 26, aislamiento piscina 1 de *P. aeruginosa*; carril 27 aislamiento piscina 2 de *P. aeruginosa*; carril 28, CQXVIII y carril 29, *P. aeruginosa* ATCC 10145 ⁴⁹.

Fuente: Amagliani G, et al. Molecular detection of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational water, 2014.

Oluborode OB, y Col en Nigeria estudiaron 48 cepas de *Pseudomonas*, treinta provenientes de especies clínicas y dieciocho de muestras ambientales. Para este estudio se empleó la técnica RAPD-PCR y dos cebadores: 10514 (5' TGGTGGCCTCGAGCAAGAGAACGG-3') y 14306 (5'-GGTTGGGTGAGAATTGC-3'). La tipificación molecular mediante análisis de PCR-RAPD de aislamientos de *P. aeruginosa* de fuentes clínicas y ambientales dio como

resultado treinta y siete perfiles diferentes de PCR-RAPD, demostrando nivel elevado de variaciones basadas en los patrones de bandas entre los aislados y concuerda con la expectativa de un organismo con un genoma grande como lo es el de *P. aeruginosa*⁵¹.

Askar Nawas, y Col realizaron una investigación sobre el análisis de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) de especies bacterianas desnitrificantes dominantes en el estuario Rajakkamangalam de la costa suroeste de la India. De las muestras de agua recolectadas, fueron identificadas dos cepas bacterianas, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus cereus*. Estas especies bacterianas fueron caracterizadas mediante la técnica RAPD-PCR. Se utilizaron 10 cebadores (**Ver Tabla 2**). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: temperatura inicial 94°C durante 5 min, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, alineamiento a (36°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 2 min y un paso de extensión final a 2°C durante 7 min. Los amplificados de ADN fueron separados en gel agarosa al 1,6%. Los resultados indicaron la existencia de una notable variación en la amplificación de pares de bases de ADN para *P. aeruginosa*. Además, hubo variación dependiente de la temporada de muestreo y de la estación donde se tomó la muestra. En consecuencia, el índice de similitud y el coeficiente de homología de los aislados también variaron mucho⁴⁵.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio.

Código del cebador	Secuencia
RAPD kit A1	5' CAGGCCCTTC 3'
RAPD kit A2	5' TGCCGAGCTG 3'
RAPD kit A3	5' AGTCAGCCAC 3'
RAPD kit A4	5' AATCGGGCTG 3'
RAPD kit A5	5' AGGGGTCTTG 3'
RAPD kit A6	5' GGTCCCTGAC 3'
RAPD kit A7	5' GAAACGGGTG 3'
RAPD kit A8	5' GTGACGTAGG 3'
RAPD kit A9	5' GGGTAACGCC 3'
RAPDkit A10	5' GTGATCGCAG 3'

Fuente: Askar N, et al. RAPD analysis of dominant denitrifying bacterial species in the estuarine environment of south west coast of India, 2016.

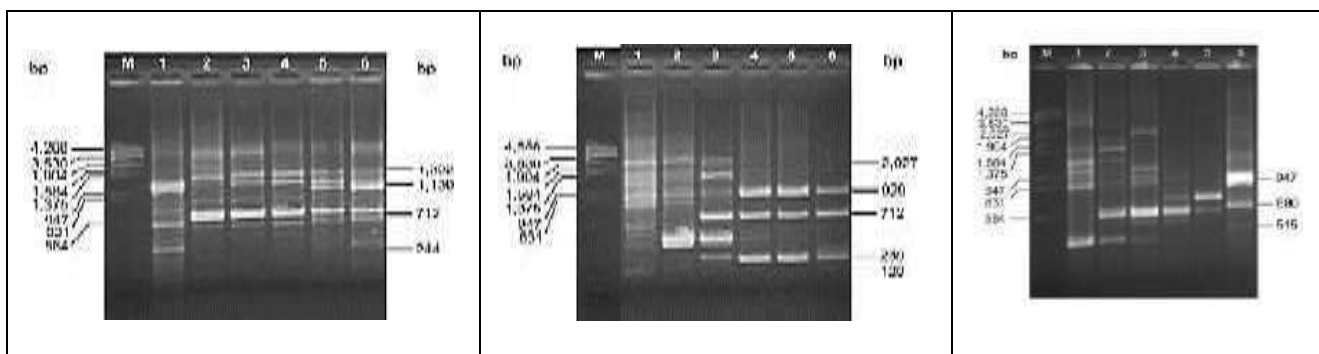


Imagen 6. RAPD de diferentes cepas de *P. aeruginosa*

RAPD de diferentes cepas de *P. aeruginosa* aisladas durante la temporada del monzón suroeste (izquierda), monzón suroeste (centro) y monzón noreste (derecha) en las estaciones seleccionadas generadas por el kit de cebador RAPD (el carril 1 a 6 representa las estaciones I - VI respectivamente) ⁴⁵.

Fuente: Askar N, et al. RAPD analysis of dominant denitrifying bacterial species in the estuarine environment of south west coast of India. 2016.

Tabla 3. Estudios de técnicas de patrones de bandas para *Pseudomonas aeruginosa*.

TITULO	AUTOR	TÉCNICA	RESULTADOS	
			NUMERO DE BANDAS	PESO MOLECULAR
Toma de huellas dactilares RAPD y demostración de variación genética en tres patógenos aislados en ambientes de manglares.	(Thangaraj M, Vishruth P , Ramesh T y Lipton A, 2011)	RAPD-PCR	2	500pb
Tipificación de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de muestras de agua griegas mediante tres métodos de tipificación: serotipificación, ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	(Pappa O, Mandilara G, Vatopoulos A y Mavridou A, 2013)	RAPD-PCR	2	500pb 1500pb
Detección molecular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en aguas recreativas.	(Amagliani G, Parlani M, Brandi G, Sebastianelli G, Stocchi V, Schiavano G, 2012)	RAPD-PCR	2	100pb
Patrón de susceptibilidad a antibióticos y tipificación molecular mediante análisis PCR-RAPD de aislados clínicos y ambientales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Oluborod OB, Smith S, Seriki T, Fowora M, Ajayi A, y Coker A, 2018)	RAPD- PCR	2	250pb 150pb

Análisis RAPD de especies bacterianas desnitrificantes dominantes en el ambiente estuarino de la costa suroeste de la India.	(Askar N, Ramasubburayan R, Palavesam A y Immanuel G, 2016)	RAPD-PCR	2	230pb 929pb
Los efectos de las bombas de eflujo activas sobre la resistencia a los antibióticos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Huseyin A, Canan K, Ihsan H, 2014)	AP-PCR	5	273pb 236pb 254pb 270pb 250pb
Polimorfismo de los genes mucA yfpvA en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de pacientes con fibrosis quística: coexistencia de variantes genéticas en el mismo paciente	(Pozueloa M, Jiménez P, Valderrey B, Fernández A, Cantón R, y Rafael R, 2011)	AP-PCR	2	202pb 283pb
Carbapenemasas VIM-1, VIM-2 y GES-5 entre aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en un hospital terciario en Estambul, Turquía	(Gulsah E, Banu B, Baris O, Bulut E, 2017)	AP-PCR	2	175pb 275pb
Un estudio comparativo de aislados costeros y clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Anusree N, Neetha J, Kiran K, Sneha K, Neenu T, Kamlesh J, Shanta N, 2015)	AP-PCR	2	750pb 600pb
Vigilancia molecular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productora de carbapenemasas en tres centros médicos de Colonia, Alemania.	(Schafer E, Malecki M, Tellez C, Pfennigwerth N, Marlinghaus L, Higgins P, 2019)	RAPD-PCR	3	500pb 278pb 350pb

Tipificación basada en RAPD y ERIC de aislados clínicos y ambientales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Ghadban I, Israa M, Sawsan M, Khyuon A, Lafta, Hussein M, 2017)	RAPD-PCR	4	180pb 260pb 450pb 230pb
Identificación de loci genómicos asociados con la variación genotípica y fenotípica entre los aislados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de neumonía	(Mesquita C, Soares P, Faustino A, Santos H, Capelo J, Santos P, 2019)	RAPD-PCR	9	100pb 150pb 50pb 37pb 20pb 35pb 25pb 75pb 100pb
Prevalencia de genes de β -lactamasa, integrones de clase 1, principales factores de virulencia y relaciones clonales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistente aislado de pacientes hospitalizados en el sureste de Irán	(Sharifi H, Gholamreza P, Shakibaie M, Pourabbas B, Mardaneh J, Mansouri S, 2019)	RAPD-PCR	19	200pb a 2000pb
Relación clonal entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a imipenem aislado de pacientes hospitalizados en UCI	(Vaez H, Sharareh M, Bahram E, Ghasemian H, 2015)	RAPD-PCR	3	600pb 400pb 120pb
Genotipado de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes quemados mediante RAPD-PCR	(Nanvazadeh F, Azar D, Zolfaghari M, Parhizgari N, 2013)	RAPD-PCR	5	100pb 300pb 500pb 700pb

				1000pb
Formación de biopelículas, susceptibilidad a antibióticos y genotipos de RAPD en cepas clínicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes de la unidad de cuidados intensivos de un solo centro.	(Vanerková M, Malisová B, Kotásková I, Holá V, Freiburger T, 2017)	RAPD-PCR	3	100pb 790pb 100pb
Atributos de virulencia en aislados clínicos brasileños de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Silva L, Galdino A, Nunes A, Moreira L, Santos A, 2014)	RAPD-PCR	5	140pb 110pb 260pb 350pb 350pb
Caracterización de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas de pacientes con fibrosis quística mediante diferentes métodos de tipificación.	(Hafiane A, Ravaoarinoro M, 2011)	RAPD-PCR	3	112pb 140pb 155pb
Cómo y por qué monitorear las infecciones por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a largo plazo en un centro de fibrosis quística	(Kalferstova L, Vilimovska D, Antuskova M, Melter O, Drevinek P, 2016)	RAPD-PCR	7	296pb 282pb 198pb 197pb 1050pb 1055pb 267pb
Susceptibilidades antimicrobianas y caracterización clínica de aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de infecciones del tracto urinario	(Xiaobing Z, Liping ZN, 2014)	RAPD-PCR	7	590pb 450pb 390pb 200pb

				780pb 350pb 450pb
Diversidad fenotípica y genotípica de aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirresistentes de infecciones del torrente sanguíneo recuperadas en los Hospitales de Belo Horizonte, Brasil	(Hanoch I, Bomfim M, Franca R, Farias L, Carvalho M, Serufo J, Santos S,2014)	RAPD-PCR	2	250pb 700pb
Caracterización RAPD de especies de <i>Pseudomonas</i> identificadas a partir de muestras clínicas	(Kumar K, Rajarajan P, Rajani G, Kuppuswamy Ch, 2018)	RAPD-PCR	4	Oscilaron entre 500pb-2000pb
Persistencia clonal de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> productora de metalo- β -lactamasas en un hospital de Ciudad Bolívar, Venezuela	(Guevara A, Sahaia J, Tedesco R, 2015)	RAPD-PCR	2	450pb 1000pb
Huella genética de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> involucrada en la infección nosocomial según lo revelan los marcadores RAPD-PCR	(Akanji B, Ajele J, Onasanya A y Oyelakin O, 2011)	RAPD-PCR	3	200pb 530pb 900pb

Los microorganismos utilizados para el presente estudio fueron aislados de diferentes muestras como: aguas de diversas procedencias, muestras clínicas y productos agrícolas de diferentes países. El género *Pseudomona* se la puede encontrar en diferentes muestras ya que esta bacteria puede adherirse con facilidad y además sobrevive en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias, por lo tanto, favorece el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos, neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, así como una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística ⁵².

Huseyin T y Col ⁵³ estudiaron el patrón de bandas genéticas en cepas de *Pseudomona aeruginosa* encontradas en pacientes con infecciones nosocomiales utilizando la técnica de AP-PCR al igual que Gulsxah M y Col ⁵⁴ en su investigación usaron primers aleatorios no específicos. Los resultados que obtuvieron fue la titulación en el gel de agarosa de 2 a 5 bandas genéticas con 175 a 275pb ; .Sin embargo Schafer E y Col ⁵⁵ , Hamid Vaez y Col ⁵⁶ Martina Vanerková1 y Col ⁵⁷ y Sharifi H y Col ⁵⁸, utilizaron la técnica de RAPD-PCR y los resultados fueron que se obtienen más bandas genéticas que con la AP-PCR con pares de bases que oscilan de 200 a 2000, los cuales dan a conocer que cada cepa tiene variabilidad genética y además estos estudios se basaron en la resistencia antibiótica llegaron a la conclusión que *Pseudomona aeruginosa* es resistente a las betalactamasas ya que presentan diferentes formas de adaptación a diferentes ambientes.

Pseudomona aeruginosa causa infecciones intrahospitalarias este estudio de Pozueloa M y Col ⁵⁹ tomaron como población a pacientes de unidades hospitalarias las muestras fueron recogidas a personas que sufren de fibrosis quística utilizaron la técnica de AP-PCR la cual se usaron 2 cebadores los que dieron a conocer 2 bandas genéticas con 202- 283 pb al igual que Hafiane A y Col ⁶⁰ y Kalferstova L y Col ⁶¹ cada uno en sus estudios utilizaron la técnica de RAPD-PCR con un solo primer el cual le dio resultado de 3 a 7 bandas genéticas con 112 a 1055pb en conclusión se identificó que en cada paciente se presentaba una cepa dominante observaron una relación entre cepas no evidente es decir cada cepa tiene sub poblaciones aunque pertenezcan a una sola familia cada una tiene diferentes perfiles de sensibilidad .

Pseudomona aeruginosa es una bacteria muy versátil y es de importancia clínica y ecológica, el estudio de Anusree V y Col ⁶² dan a conocer que obtuvieron muestras de aislamientos marinos en diferentes lugares de fuentes de aguas costeras las cuales fueron sometidas a las técnicas de AP-PCR obteniendo como resultado 2 bandas genéticas con 750 y 600pb ,en

conclusión este estudio reveló que hay una gran diversidad genética en los diferentes aislamientos ambientales, este tipo de estudios es importante ya que es necesario para comprender la desintegración ecológica de este tipo de bacterias y su forma de adaptación a diferentes lugares.

Las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* son varias como es del tracto urinario, torrente sanguíneo, heridas, quemaduras y neumonías. Los siguientes estudios de Ghadban I y Col.⁶³, Mesquita C y Col.⁶⁴, Nanvazadeh F y Col.⁶⁵, Silva L y Col.⁶⁶, Xiaobing Z y Col.⁶⁷, en sus estudios utilizaron la técnica de RAPD-PCR. Todas las muestras obtenidas fueron de unidades hospitalarias de diferentes lugares del mundo. Cada uno de ellos utilizó un solo cebador aleatorio el cual les dio resultados de 4, 5 y 7 bandas genéticas que oscilan entre 100 y 1000pb. En conclusión esta bacteria puede provenir de diferentes fuentes, pueden ser comunes y comprenden una capacidad alta de colonización y transmisión. Cada cepa de esta tiene variabilidad genética muy diversa ya sea que las muestras sean tomadas de seres humanos, aguas, plantas o diferentes ambientes y ejecutadas por diferentes técnicas moleculares.

Hanoch I y Col.⁶⁸, en su estudio utilizaron la técnica RAPD-PCR para determinar la Diversidad fenotípica y genotípica de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes de infecciones del torrente sanguíneo en Hospitales de Belo Horizonte, Brasil, obteniendo como resultados dos bandas de peso molecular 250pb y 700pb. Resultados similares lograron obtener en sus investigaciones Kumar V.⁶⁹, Akanji B.⁷⁰, empleando la técnica RAPD-PCR en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas de muestras clínicas aisladas de diferentes Hospitales, en donde la diferencia fue sus pesos moleculares que oscilaban de 200pb a 2000pb demostrando con esto una pequeña variación en los pesos moleculares obtenidos en cada estudio.

Guevara A y Col.⁷¹, analizaron la Persistencia clonal de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas en un hospital de Ciudad Bolívar, Venezuela, para esto emplearon la técnica RAPD-PCR en donde obtuvieron como resultados dos bandas de peso molecular de 450pb a 1000pb, guardando similitud con el estudio realizado por Akanji B.⁷⁰, en donde las bandas obtenidas en este estudio fueron de 200pb a 900pb.

Estudios de técnicas AP-PCR Y RAPD en *Citrobacter*.

El género *Citrobacter* pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae y comprende 11 especies diferentes de bacilos gramnegativos anaeróbicos facultativos, móviles, no formadores de esporas, que son oxidasa negativos y citrato positivo. Las especies de *Citrobacter* aisladas con mayor frecuencia de las muestras clínica humanas son *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter youngae*, *Citrobacter braakii* y *Citrobacter amalonaticus*. La mayoría de las infecciones clínicas están asociadas con *C. koseri* y *C. freundii*. Esta bacteria se encuentra comúnmente en el agua, el suelo y los alimentos, y como colonizadores ocasionales del tracto gastrointestinal de animales y humanos. Pueden dar origen a varios tipos de infecciones, que incluyen las del tracto urinario, respiratorio, digestivo, cutáneas y de tejidos blandos, ojos, huesos, hemáticas y del sistema nervioso central ⁷².

En la búsqueda realizada en las bases de datos señaladas previamente y siguiendo los criterios de inclusión y exclusión establecidos, no se encontró ningún artículo relacionado con Patrón de bandas genéticas en *Citrobacter diversus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego. Algunos estudios señalan la presencia de *C. diversus* en muestras de sedimentos superficiales a lo largo del río Shifeng en la provincia de Zhejiang, China, las cuales fueron utilizadas para detectar bacterias productoras de carbapenemasas. De igual modo, algunas especies de *Citrobacter* han sido aisladas en aguas de ríos, como el hallazgo de *Citrobacter freundii* en aguas del Rio Ayuquila, México ⁷³, o en muestras de aguas residuales, de río y subterráneas en la ciudad de Miyazaki, Japón, en esta última además de *C. freundii* se aisló también *C. koseri* ⁷⁴. En un trabajo realizado en el río Soummam en Bejaia, Argelia con el propósito de detectar enterobacterias productoras de carbapenemasas, se encontraron 20 cepas de la familia Enterobacteriaceae y entre ellas *C. freundii* y *C. braakii* ⁷⁵.

Algunas especies del género *Citrobacter* también puede dar origen a un amplio espectro de enfermedades infecciosas en los animales de la acuicultura. En un trabajo realizado por Chen y Col., se aisló un gran número de cepas de este microorganismo en el intestino de cangrejos de río aparentemente sanos, que fueron comprados en el supermercado o recolectados en una granja de cangrejos de río en Hefei, China. Mediante características bioquímicas y análisis de secuencias multilocus por ERIC-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de consenso

intergénico repetitivo enterobacterial) se identificaron las especies *C. freundii*, *C. braakii*, *C. werkmanii* ⁷⁶.

Praharaj y Col., aislaron un total de 221 *Citrobacter spp.* de muestras clínicas de pacientes en un hospital de Pune, India. La identificación bacteriana se realizó mediante cultivos microbiológicos convencionales de rutina y pruebas bioquímicas. La tipificación molecular de las cepas se llevó a cabo mediante ensayos de PCR basada en elementos repetitivos (REP-PCR), consenso intergénico repetitivo de enterobacterias (ERIC-PCR) y ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD-PCR) para caracterizar las especies de *Citrobacter spp.* recuperadas de los pacientes. El análisis genotípico por tipificación molecular de 81 cepas de *C. freundii* (productores de MBL) mediante RAPD-PCR produjo un promedio de 14-18 fragmentos por cada cepa. Se encontraron en total 10 patrones RAPD asignados como CF-A a CF-J (**Imagen 7**). El análisis genotípico de *C. freundii* mediante REP-PCR produjo un promedio de 6 a 8 fragmentos por cada cepa ⁷⁷.

El análisis genotípico por tipificación molecular de 48 cepas de *C. koseri* mediante RAPD-PCR produjo un promedio de 10-12 fragmentos por cepa, encontrándose en total 6 patrones RAPD asignados como CK-A a CK-F (**Imagen 8**). El análisis genotípico mediante ERIC-PCR produjo un promedio de 12 a 18 fragmentos por cada cepa de *C. koseri*. Los investigadores concluyeron que RAPD-PCR distingue los distintos clones entre sí mejor que REP-PCR y ERIC-PCR ⁷⁷.

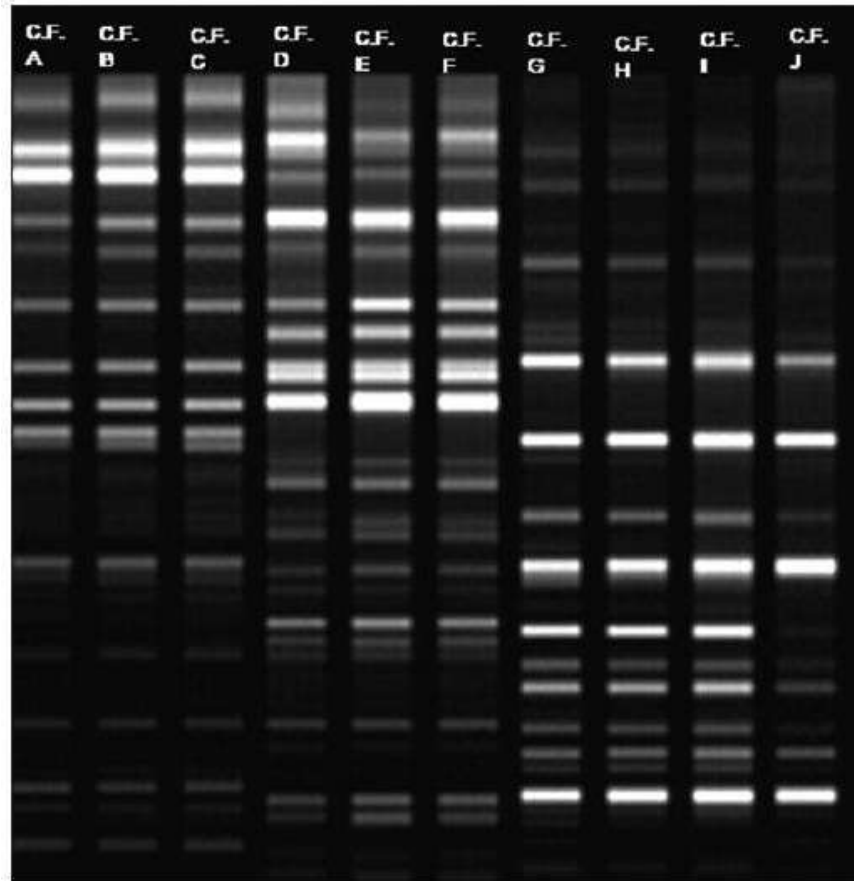


Imagen 7. Patrón de bandas de reacción en cadena de la polimerasa de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente

Patrón de bandas de reacción en cadena de la polimerasa de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPDS-PCR) entre 10 grupos clonales de *C. freundii* (Praharaj et al, 2016).

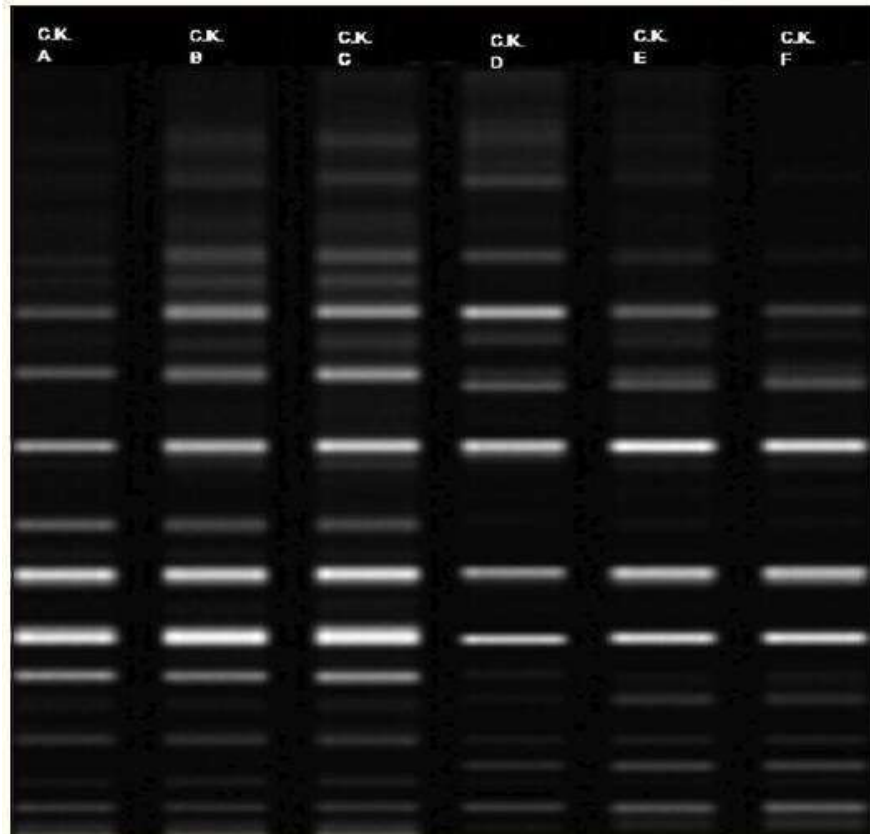


Imagen 8. Patrón de bandas de reacción en cadena de la polimerasa de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente

Patrón de bandas de reacción en cadena de la polimerasa de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente entre 6 grupos clonales de *Citrobacter koseri*. (Praharaj et al, 2016).

Tabla 4. Estudios de técnicas de patrones de bandas para *Citrobacter diversus*.

TÍTULO	AUTOR	TÉCNICA	RESULTADOS	
			NUMERO DE BANDAS	PESO MOLECULAR
Detección fenotípica y caracterización molecular de genes de betalactamasa entre especies de <i>Citrobacter</i> en un hospital de tercer nivel.	(Praharaj AK, Khajuria A, Kumar M, Grover N, 2016)	RAPD-PCR	4	230pb 35pb 50pb 200pb
Epidemiología Molecular de un brote nosocomial debido a cepas productoras de SHV-4 de <i>Citrobacter diversus</i>	(Harrif H, Arpin C, Benliman Y, Quentin C, 2017)	AP-PCR	2	453pb 560pb
blashV-Citrobacter spp. Al mismo tiempo albergar blaCIX-M-blaTem ,blasiv y secuencias de inserción IS26 Y orf513	(Shahid M, 2011)	AP-PCR	2	593pb 933pb
Detección y bases genéticas de beta-lactamasas AmpC y carbapenemasas en aislados clínicos de <i>Citrobacter spp</i>	(Nerea Porres O, 2015)	RAPD-PCR	1	450pb
Caracterización molecular del gen BLEE en <i>Citrobacter spp.</i> y Actividad antibacteriana de	(Mayada D, 2017)	AP-PCR	3	754pb 619pb 516pb

omega-3 resistentes	contra	cepas				
------------------------	--------	-------	--	--	--	--

Las técnicas moleculares han demostrado ser muy importantes y útiles para la especificación, detección, análisis y secuenciación de los diferentes agentes etiológicos, así como también para el estudio de la variabilidad genética la cual es una parte fundamental de la diferenciación y evolución de todo ser vivo. Las técnicas moleculares más sofisticadas para la identificación de microorganismos patógenos, incluyen sistemas de amplificación in vitro y en tiempo real ⁷⁸. Dentro de las técnicas más utilizadas en la presente investigación fueron: PCR con cebadores arbitrarios (AP-PCR) ⁴⁰ y ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR) que son un sistema de identificación y caracterización genotípica que ha mostrado una gran sensibilidad y especificidad para definir los aislados bacterianos en el que se utilizan cebadores arbitrarios bajo condiciones de baja especificidad ⁷⁹.

Harrif H y Col ⁸⁰, en su investigación emplearon la técnica AP-PCR para tipificar *Citrobacter diversus* en personas que presentaban un brote nosocomial debido a cepas productoras de SHV-4, en donde obtuvieron como resultado dos bandas de peso molecular 453pb y 560pb. Resultados similares lograron obtener en sus investigaciones Shahid M ⁸¹, Mayada D ⁸², por el método de AP-PCR en cepas de *Citrobacter* aisladas en aguas de diversas procedencias en donde la diferencia fue su peso molecular de 516pb a 754pb demostrando con esto una pequeña variación en los pesos moleculares obtenidos en cada estudio.

En el estudio realizado por Nerea P ⁸³, realizaron la detección de bases genéticas de beta-lactamasas y carbapenemasas en aislados clínicos de *Citrobacter spp*, en donde emplearon la técnica RAPD-PCR, obteniendo como resultado una banda de peso molecular de 450pb, con esto pudiendo relacionarle con las investigaciones realizadas por Praharaj A y Col ⁷⁷, endonde emplearon la misma técnica obteniendo resultados similares a diferencia del peso molecular de las bandas que fueron de 200pb.

CONCLUSIONES

La utilidad de estudio de los patrones de bandas genéticas facilita de gran manera la identificación molecular de los diferentes microorganismos, en este caso de *Pseudomona aeruginosa* y *Citrobacter diversus* aisladas en aguas de riego y productos agrícolas, la caracterización genética se obtiene por la amplificación con cebadores cortos arbitrarios o aleatorios diseñados al azar de ADN polimórfico, de acuerdo a las diferentes técnicas moleculares como AP-PCR / RAPD-PCR, las bandas múltiples de diferentes tamaños producidas a partir del mismo ADN genómico constituyen una "huella dactilar". Los patrones de diferentes individuos y especies varían en función de cuán similares sean las secuencias de ADN genómico entre muestras.

La caracterización molecular de aislamientos de *Pseudomona aeruginosa* mediante la técnica RAPD-PCR en diferentes tipos de muestras de agua, utilizando desde uno hasta diez cebadores aleatorios o arbitrarios permitió encontrar variabilidad genética en esta especie, basados en los patrones de bandas entre los aislados.

No fue posible encontrar trabajos de investigación relacionados patrones de bandas genéticas en cepas aisladas de aguas de riego y productos agrícolas para la especie *Citrobacter spp.*, sin embargo, si se encontró en muestras clínicas en la que RAPD-PCR distinguió de mejor manera los distintos clones comparado con otras técnicas moleculares semejantes.

BIBLIOGRAFIA

1. Romero Herazo Y, Díaz Caballero A, Arroyo Salgado B, Villalva Vizcaino V. Métodos de identificación bacteriana y sus aplicaciones en la investigación odontológica. Dialnet. 2011 Enero; VII(2).
2. Corrales Ramírez C, Sánchez Leal C, Quimbayo Salamanca M. Microorganismos potencialmente fitopatógenos en aguas de riego proveniente de la cuenca media del río Bogotá. Scielo. 2017 Agosto; XVI(29).
3. Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [Online].; 2019 [cited 2021 Febrero 26. Available from: <http://www.fao.org/news/story/es/item/1201025/icode/>.
4. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El estado de los recursos de tierras y aguas del mundo para la alimentación ya la agricultura Madrid: Mundi-Prensa; 2012.
5. Bonet Pérez C, Ricardo Calzadilla M. Calidad del agua de riego y su posible efecto en los rendimientos agrícolas en la Empresa de Cultivos Varios Sierra de Cubitas. Scielo. 2011 Julio; XX(3).
6. Alpucho Pilahuisín LM. La comercialización de los productos agrícolas y niveles de ingresos en las familias de la comunidad de Calguasig Grande en el período 2008- 2010. Tesis. Amabato: Universidad Técnica de Ambato, Departamento de Economía; 2011.
7. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. iagua. [Online].; 2018 [cited 2021 Febrero 27. Available from: <https://www.iagua.es/noticias/fao/contaminantes-agricolas-grave-amenaza-agua-planeta>.

8. Soto Varela Z, Pérez Lavalle L, Estrada Alvarado D. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. Scielo. 2016 Octubre; XXXII(1).
9. Estupiñán Torres S, Ávila de Navia S, López Orozco Y, Martínez Méndez S, Miranda Marín Y, Ortégón Puentes A. Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* sp. y *Aeromonas* sp. en aguas de piscinas públicas de Bogotá - Colombia. Scielo. 2016 Diciembre; XV(27).
10. Montero MM. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos. Tesis Doctoral. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Medicina; 2012.
11. Martínez Ramos I. Papel de EF-Tu en la interacción de *Pseudomonas aeruginosa* con los queratinocitos humanos. Tesis Doctoral. Islas Baleares: Universitat de les Illes Balears, Departamento de Microbiologia; 2014.
12. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. DATABIO. [Online].; 2016 [cited 2016 Marzo 16. Available from: <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Pseudomonas+aeruginosa+2017.pdf/7e1ed73b-eca5-4578-a4f7-1c8847e6a799#:~:text=Pseudomonas%20aeruginosa%20pertenece%20a%20la,prese ncia%20de%20un%20flagelo%20polar>.
13. Paz Zarza V, Mangwani Mordani S, Martínez Maldonado A, Álvarez Hernández D, Solano Gálvez S, Vázquez López R. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Scielo. 2019 Enero; XXXVI(2).
14. Molina Ortiz JP, Orozco Pilco JA. Detección de resistencia antimicrobiana en bacterias de interés clínico aisladas en el Río Chambo. Noviembre 2018 - Enero 2019. Tesis. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Departamento de Laboratorio Clínico; 2019.

15. Suzuki Y, Kajii S, Nishiyama M, Iguchi A. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agents. ELSEVIER. 2013 Marzo.
16. Acosta Rodríguez I, Moctezuma Zárate M, Tovar Oviedo J, Cárdenas González J. Aislamiento e Identificación de Bacterias y Levaduras Resistentes a Petróleo. Scielo. 2011 Mayo; XXII(6).
17. Sabathier L. Estudio de resistencia a antibióticos del género *Pseudomonas* en muestras de agua del río Limay. Tesis. Neuquén: Universidad Nacional del Comahue, Departamento de Ciencias del Ambiente y la Salud; 2019.
18. Lara Guarnizo ID. Identificación de bacterias de importancia clínica en productos agrícolas de la cuenca del río Guamate. Tesis. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Departamento de Laboratorio Clínico; 2019.
19. Kashina Allydice F, Brown P. Diversity of Antimicrobial Resistance and Virulence Determinants in *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Fresh Vegetables. Hindawi. 2012 Noviembre.
20. Cabay Asadobay M. Caracterización bacteriológica de frutas expandidas en supermercados de Riobamba. Tesis. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Departamento de Laboratorio Clínico; 2020.
21. Daza Hernández A, Arroyo Escalante S, Bravo Escobar G. Identificación de *Citrobacter koseri* como nuevo patógeno en pacientes con rinitis crónica. Medigraphic. 2014 Febrero; LIX(1).
22. Ullauri González C. *Citrobacter freundii* multirresistente como agente etiológico de infección de vías urinarias. Caso Clínico. Loja: Universidad Nacional de Loja, Departamento de Microbiología; 2019.
23. Cajal Bravo M, Cobos Argudo JG. "Prevalencia de Enterobacterias Productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) provenientes de urocultivos de

- pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital José Carrasco Artega. Tesis. Cuenca: Universidad de Cuenca, Departamento de Bioquímica; 2015.
24. Nogales Quishpe E, Vela Padilla J. Caracterización bacteriológica del agua del río Guano, 2019. Tesis. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Departamento de Laboratorio Clínico; 2019.
 25. Castañeda Y, López Guaimacuto P, Figueroa Y, Fuentes JL. Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la isla Margarita, Venezuela. Redalyc. 2011 Enero-Abril; XXI(1).
 26. Akua Obeng F, Pokuaa B, Olu M, Ayeh P. Microbial Assessment of Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) Sold at Some Central Markets in Ghana. Hindawi. 2018 Noviembre.
 27. López Cuaran AY. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del río Chanchán, 2019. Tesis. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Departamento de Laboratorio Clínico; 2019.
 28. Cazares Silva M. Bacterias patógenas para el hombre aisladas en productos agrícolas provenientes de la cuenca del Río Guano. Tesis. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo, Departamento de Laboratorio Clínico; 2019.
 29. Kapeleka J, Sauli E, Sadik O, Ndakidemi P. Co-exposure risks of pesticides residues and bacterial contamination in fresh fruits and vegetables under smallholder horticultural production systems in Tanzania. PLOS ONE. 2020 July; XV(7).
 30. Angarita Merchán M, Torres Caicedo M, Díaz Torres A. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Scielo. 2017 Sep - Oct; XVI(5).
 31. Morales Parra G, Garcia Cuan A. Comparacion de metodos fenotípicos y moleculares para la detección a reasistencia a meticilina en *Staphilococcus aerus*. MEDICINA & LABORATORIO. 2015 Agosto; XXI(7-8).

32. León I. ¿Cuales son las diferencias entre PCR, RT PCR, Q PCR y RTQPCR? AllScience. 2017 Mayo.
33. Arciniega de los Santos A. Uso, Mnejo y Preservacion de los Recursos Naturales. Tesis. California: Centro de Investigaciones Biologicas del Noreste S,C., Departamento de Ciencias; 2012.
34. Pulgarin Rocha JA. Impacto de la retrotransposición del elemento line-1 en genomas pluripotentes. Tesis doctoral. Granada: Universidad de Granada, Departamento de medicina; 2015.
35. Saavedra Olivos Y. Identificación molecular por PCR y nested PCR de rickettsias en *Crassostrea gigas*. Tesis. Peru: UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES, FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA; 2012.
36. Armendariz Toral F, Barreiro Zambrano E. Deteccion de Salmonella spp. Mediante PCR en muestras de embutidos, cereales y superficies inertes. Tesis de Grado. Guayaquil : Escuela Superior Politecnica del Litoral, Departamento de Ingenieria; 2013.
37. Delgado Calderón S, Morales Torres F. Detección de pseudomona aeruginosa y bacterias heterótrofas de aguas envasadas en botellas y bolsas destinadas al consumo humano, comercializadas en la ciudad de Managua. Tesis. Managua: Instituto Politécnico de la Salud, Bioanálisis Clínico; 2015.
38. François Prère M, Fayet A O. A specific polymerase chain reaction test for the identification of *Streptococcus pneumoniae*. ELSEVIER. 2011 May PrèreabcOlivier A.Fayetab; LXX(1).
39. Senthil Kumar N, Gurusubramanian G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. ResearchGate. 2011 Enero; XI(3).

40. Babu Kantipudi N, Rajesh Mulyar K, Samsudeen K, Minoos D, Suraby J, Anupama K, et al. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques. *Pub Med*. 2014 December; XI(15).
41. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Pub Med*. 2011 Jun; XVIII(6).
42. Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández Á. Molecular typing methods for infection monitoring and control. *ELSEVIER*. 2013 February; XXXI(1).
43. Kumari N, Kumar Thakur S. RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA-A BRIEF REVIEW. *SCIENCE Publications*. 2014 January; IX(1).
44. Krawczyk B, Kur J. Chapter 16 - Molecular Identification and Genotyping of Staphylococci: Genus, Species, Strains, Clones, Lineages, and Interspecies Exchanges. *ScienceDirect*. 2018 March.
45. Askar N, Ramasubburayan R, Palavesam A, Immanuel G. RAPD analysis of dominant denitrifying bacterial species in the estuarine environment of south west coast of India. *Scopus, Indian Journal of Geo Marine Sciences*. 2016 December; XLV(12).
46. Thangaraj M, Prem V, Ramesh T, Lipton A. RAPD Fingerprinting and Demonstration of Genetic Variation in Three Pathogens Isolated from Mangrove Environment. *Science Alert*. 2011 April; III(269-274).
47. Pappa O, Mandilara G, Vatopoulos A, Mavridou A. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Greek water samples by three typing methods: serotyping, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). *Scopus*. 2013; LXVII(6).
48. Rademaker L, Jan Hoste B, Louws F, Kersters K, Swings J, Vauterin L, et al. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA

- homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol, Microbiol.* 2011 50; 2(665-677).
49. Amagliani G, Parlani M, Brandi G, Sebastianelli G, Vilberto S, Schiavano F. Molecular detection of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational water. *Scopus, International Journal of Environmental Health Research.* 2014 August; XXII(60-70).
 50. Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar -Lari A, Goudeau A, et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol.* 2014; 53(73-81).
 51. Oluborode O, Smith S, Seriki T, Fowora M, Ajayi A, Coker A. Antibiotic Susceptibility Pattern and Molecular Typing By PCR-RAPD Analysis of Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scopus, Microbiology and Biotechnology Letters.* 2018 September; XLVI(4).
 52. Ochoa S, Lopez F, Escalona G, Cruz A, Dávila L. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Scielo.* 2013 Mayo; LXX(2).
 53. Huseyin T, Canan K, Ihsan Hakki C. The effects of active efflux pumps on antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014 Octubre; XXX(10).
 54. Gulxah M, Elif A, Banu B, Baris O, Mehmet E. VIM-1, VIM-2, and GES-5 Carbapenemases Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. *PubMed.* 2017 Abril; XXIII(3).
 55. Schäfer E, Malecki M, Tellez Castillo C, Pfennigwerth N, Marlinghaus , Higgins P, et al. Molecular surveillance of carbapenemaseproducing *Pseudomonas aeruginosa* at three medical centres in Cologne, Germany. *PubMed.* 2019; VIII(208).

56. Vaez , Moghim , Esfahani , Safaei H. Clonal Relatedness among Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from ICU-Hospitalized Patients. Hindawi. 2015 Diciembre.
57. Vanerková M, Malisová , Kotáskova , Holá , Ruzicka F, Freiburger T. Biofilm formation, antibiotic susceptibility and RAPD genotypes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from single centre intensive care unit patients. PubMed. 2017 Marzo; LXII(6).
58. Sharifi , Gholamreza P, Shakibaie , Pourabbas. Prevalence of β -lactamase genes, class 1 integrons, major virulence factors and clonal relationships of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in southeast of Iran. PubMed. 2019 Julio; XXII(7).
59. Pozuelo , Jiménez P, Valderrey A, Fernández Olmos , Cantón , Rotger. Polimorfismo de los genes *mucA* y *fpvA* en *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística: coexistencia de variantes genéticas en el mismo paciente. ELSEVIER. 2011 Enero; XXIX(1).
60. Hafiane A, Ravaoarinaro M. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients by different typing methods. PubMed. 2011; VIX(1).
61. Kalferstova L, Dedeckova K, Antuskova M, Melter O, Drevinek P. How and why to monitor *Pseudomonas aeruginosa* infections in the long term at a cystic fibrosis centre. ELSEVIER. 2015 Septiembre; LXL(1).
62. Anusree V, Neetha J, Krishna , Sneha KG, Neenu T, Kamlesh J, et al. A comparative study of coastal and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. PubMed. 2015 Enero; XVII(3).
63. Ghadban , Israa M, Kadmy A, Mohammed. RAPD- and ERIC-Based Typing of Clinical and Environmental *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. PubMed. 2017 Agosto; C(2).

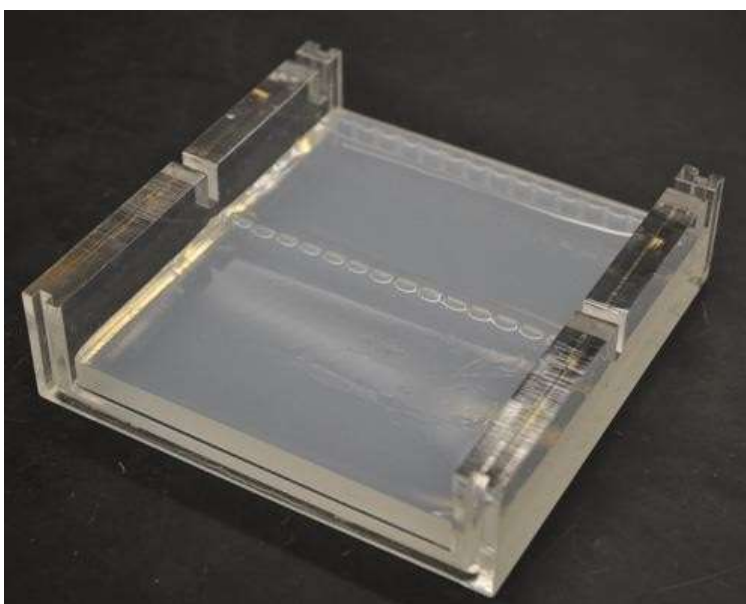
64. Mesquita C, Soares Castro , Faustino , Santos H, Capelo , Santos P. Identification of genomic loci associated with genotypic and phenotypic variation among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from pneumonia. *ELSEVIER*. 2019 Agosto;(136).
65. Nanvazadeh , Khosravi , Zolfaghari , Parhizgari. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by RAPD-PCR. *PubMed*. 2013 Marzo; XXXIX(7).
66. Silva , Galdino C, Nunes , Moreira M. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *ELSEVIER*. 2014 Febrero.
67. Xiaobing Z, Siqiang N, Liping Z. Antimicrobial Susceptibilities and Clinical Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Urinary Tract Infections. *PubMed*. 2014 Marzo; XXXIX(4).
68. Hanoch I, França R, Bomfim MR, Farias , Carvalho MA, Serufo JC, et al. Phenotypic and Genotypic Diversity of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bloodstream Infections Recovered in the Hospitals of Belo Horizonte, Brazil. *PubMed*. 2014 March; LX(54-62).
69. Kumar , Baliyan , Prasad , Jawai. RAPD Characterization of *Pseudomonas* species identified from clinical samples. *ReseachGate*. 2018 April; X(11-15).
70. Akanji B, Ajele J, Onasanya A, Oyelak O. Genetic Fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* Involved in Nosocomial Infection as Revealed by RAPD-PCR Markers. *Science Alert*. 2011 January; X(70-77).
71. Guevaraa A, Sahaia JM, Maiullaria RT. Persistencia clonal de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- β -lactamasas en un hospital de Ciudad Bolívar, Venezuela. *Scielo*. 2015 Diciembre; XXXV(2).
72. Deveci A, Coban AY. Optimum management of *Citrobacter koseri* infection. *Expert Rev Anti Infect*. 2014 Septiembre; XII(9).

73. González Díaz RL, Mercado Silva N, Reynaga Delgado E, Martínez Rivera LM. Bacterial microbiota from wild freshwater fish utilized for subsistence in western México. *Int Contam Ambie.* 2020; XXXVI(1).
74. Suzuki Y, Niina K, Matsuwaki K, Iguchi A, Nukazawa K. Bacterial flora analysis of coliforms in sewage, river water, and ground water using MALDI-TOF mass spectrometry. *Sci Health a Tox Hazard.* 2018 Enero; XXVIII(2).
75. Tafoukt R, Touati A, Leangapichart T, Bakour S, Rolain JM. Characterization of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae isolated from river water in Algeria. *Water Res.* 2017 Septiembre; I(12).
76. Chen H, Wang Y, Zhang J, Chen J, Wu M. Isolation and identification of *Citrobacter* spp. from the intestine of *Procambarus clarkii*. *J Fish Res.* 2017; II(1).
77. Praharaj AK, Khajuria A, Kumar M, Grover N. Phenotypic detection and molecular characterization of beta-lactamase genes among *Citrobacter* species in a tertiary care hospital. *Avicenna J Med.* 2016 Enero-Marzo; VI(1).
78. Palomino C, González Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Scielo.* 2014 Julio; XXXI(3).
79. Pérez H. Establishment of a polymerase chain reaction for detection of bacteria and fungi. Importance for the diagnosis of ocular infectious diseases. *ScienceDirect.* 2014 April; LXXXVIII(2 67-72).
80. Harrif H, Arpin C, Benliman S, Quentin C. Epidemiología molecular del brote nasocomial debido a SHV-4 que producen cepas de *Citrobacter diversus*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2017 Octubre; XXXV(10).
81. Shahid M. *Citrobacter* spp. Simultaneously Harboring blaCTX-M, blaTEM, blaSHV, blaampC, and Insertion Sequences IS26 and orf513: an Evolutionary Phenomenon of Recent Concern for Antibiotic Resistance. *Jornal of Clinical Microbiology.* 2010 May; XLVIII(5).

82. Mayada D. Molecular detection of virulence and antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from diseased tilapia fish. ResearchGate. 2019 Diciembre; VII(2).
83. Nerea Porres O. Detección y bases genéticas de beta-lactamasas AmpC y carbapenemasas en aislados clínicos y comensales de enterobacterias. Tesis Doctoral. Logroño: Universidad de la Rioja, Departamento de Agricultura y Alimentacion; 2015. Report No.: ISBN.

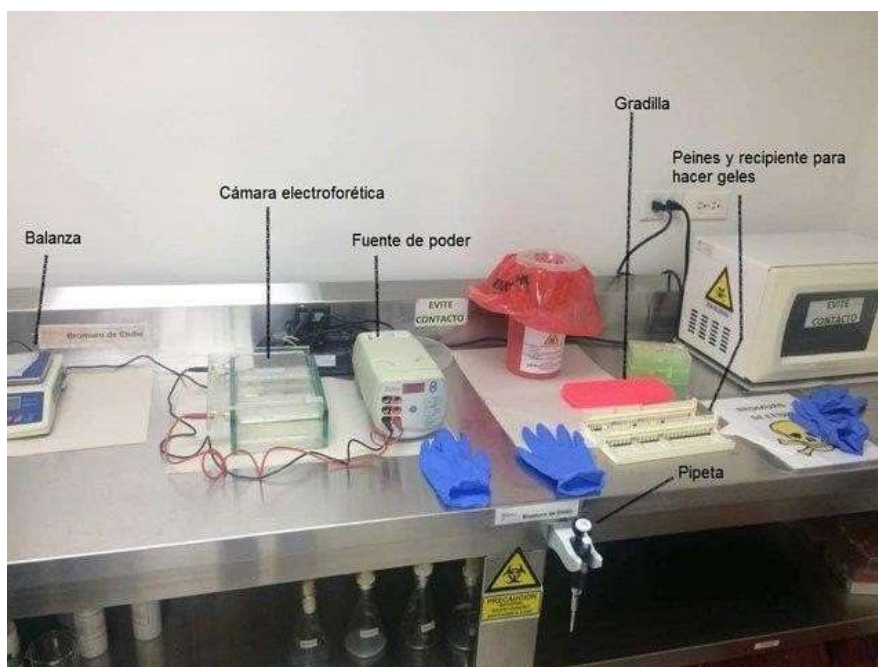
ANEXOS

Anexo 1. Gel de Agarosa al 1,5 %



Fuente: Lee P, et al. gel de agarosa para la electroforesis de los productos PCR, 2012

Anexo 2. Materiales y Equipos para realizar técnicas moleculares AP-PCR



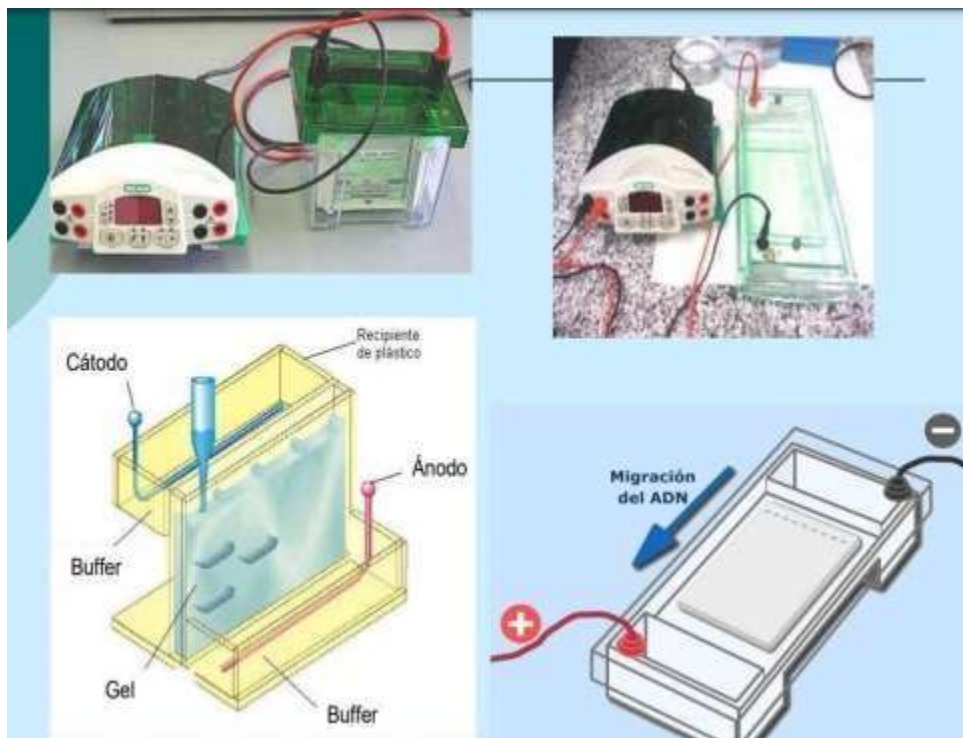
Fuente: Inadotana C, Materiales y Equipos para realizar técnicas moleculares AP-PCR, 2018

Anexo 3. Primers o Cebadores aleatorios



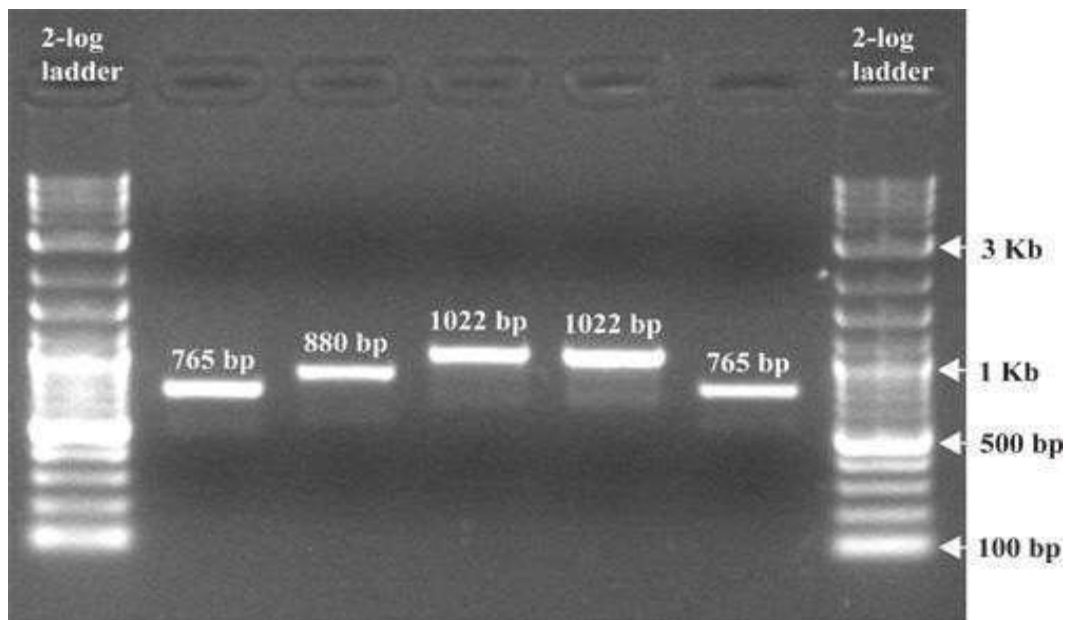
Fuente: ThermoFisher Scientific, Primers o Cebadores aleatorios utilizados en la técnica molecular PCR, 2014

Anexo 4. Cuba electroforética



Fuente: Universidad Nacional de la Plata, cubeta electroforética, 2017

Anexo 5. Separación de los fragmentos de ADN en el gel de agarosa debido a su peso molecular.



Fuente: Lee P, et al. Separación de los fragmentos de ADN en el gel de agarosa debido a su peso molecular, 2012