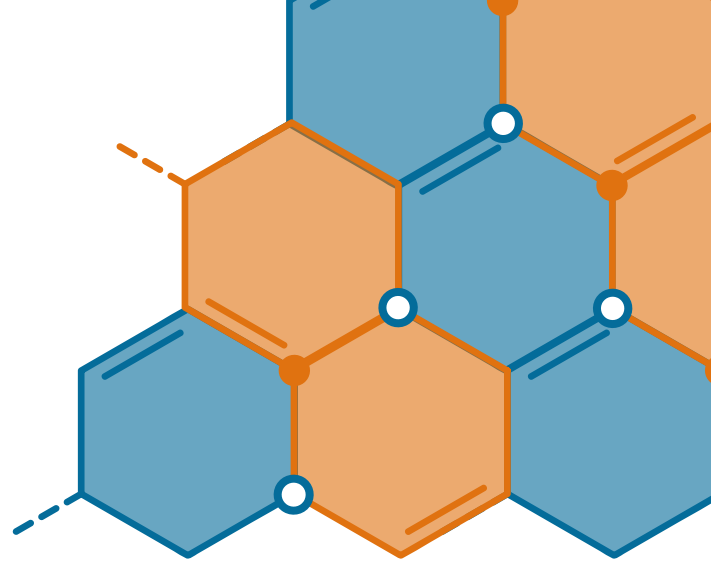


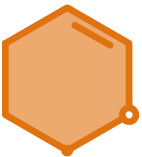


PABLO



Generación de sistema de diagnóstico por I.A. para las enfermedades de

- **Ciclosporosis**
- **Cólera**
- **Escherichia coli**
- **Listeriosis**



1. Generación de sistema de diagnóstico por I.A.

El sistema de diagnóstico por I.A. desarrollado por PABLO está diseñado para la identificación de uno o varios patógenos causantes de (Ciclosporosis, Cólera, *Escherichia coli*, Listeriosis), en muestras de ácidos nucleicos recolectados conforme a los lineamientos establecidos por el sistema de salud pública o la autoridad competente en cada país. Los ácidos nucleicos se amplifican mediante RT-qPCR en el caso de ARN y mediante qPCR en el caso de ADN. La detección de los blancos específicos se realiza mediante la lectura de fluorescencia de sondas diseñadas de forma específica: Fam-BHQ1, Tex-red-BHQ2, Hex-BHQ1, Cy5-BHQ2. El propósito de esta prueba es servir como herramienta auxiliar en el diagnóstico, complementando la interpretación con factores clínicos y epidemiológicos.

Diagnóstico: Ciclosporosis

Organismo: Cyclospora cayetanensis

Cyclospora spp. son parásitos protozoarios del filo Apicomplexa, clase Sporozoasida, subclase Coccidiasina, orden Eimeriorina, familia Eimeriidae. *Cyclospora cayetanensis* es la única especie del género *Cyclospora* que se sabe que infecta a los humanos, esta se transmite generalmente a través de los alimentos o el agua a un huésped humano por vía fecal-oral y puede causar la enfermedad gastrointestinal ciclosporosis, que puede complicarse con trastornos extraintestinales. Los principales síntomas son diarrea acuosa voluminosa, calambres abdominales, náuseas, fiebre baja, fatiga y pérdida de peso. *C. cayetanensis* fue descrita y nombrada por primera vez hace 25 años, difiere en forma de las otras especies de *Cyclospora* en la morfología de sus ooquistes, que son más pequeños y esféricos en lugar de la forma subesférica que tienen los ooquistes de las otras especies conocidas. El ooquiste esporulado posee una doble pared con 63 y 50 nm de grosor rodeando dos esporoquistes; cada uno tiene una pared de 62 nm de grosor que rodea la membrana plasmática, un residuo con glóbulos y cuerpos de Stieda y substieda. Los métodos moleculares como la PCR, tienen varias ventajas para el diagnóstico de la ciclosporosis, incluida la capacidad de detectar simultáneamente varios patógenos utilizando plataformas multiplex, evaluación rápida y alta sensibilidad. De acuerdo con las diversas publicaciones científicas, las pruebas se realizan con los genes: 18S rRNA y HSP70; siendo estos los más mencionados.

Diagnóstico: Cólera

Organismo: Vibrio cholerae

El cólera es causado por *Vibrio cholerae*, persiste en los países en desarrollo debido al acceso inadecuado al agua potable, el saneamiento y la higiene. Hay aproximadamente 4 millones de casos y 143.000 muertes cada año debido al cólera. La enfermedad se transmite por vía fecal-oral a través de alimentos o agua contaminados. La infección de cólera puede ser asintomática, leve, moderada o grave. Los signos de deshidratación (por ejemplo, ojos hundidos, lágrimas, boca seca, sed, pulso rápido, letargo, piel fría, pérdida de elasticidad de la piel o manos y pies arrugados) están presentes debido a una diarrea acuosa profusa. *V. cholerae* es una bacteria gramnegativa, con forma de coma, que se clasifica serológicamente en más de 200 serogrupos. De ellos, *V. cholerae* O1 y O139 han causado epidemias de cólera recientes. Un foco del análisis epidemiológico molecular de *V. cholerae* es el fago CTX, que contiene los genes CT. Los genes codificadores de la toxina del cólera *ctxAB* transportados por *V. cholerae* toxigénico han sufrido numerosas mutaciones genéticas, que incluyen dos componentes principales del fago CTX (CTX *cla* y CTX-1) y la secuencia de repetición 1 (RS1), junto con mutaciones puntuales en *ctxB*. Los métodos basados en cultivos o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son los estándares de oro para confirmar el cólera en muestras clínicas y generalmente tienen una alta especificidad.

Diagnóstico: Escherichia coli

Organismo: Escherichia coli

Escherichia coli, una bacteria gramnegativa, coloniza el tracto gastrointestinal poco después del nacimiento. Filogenéticamente, es un miembro de las Enterobacteriaceae, y está estrechamente relacionado con patógenos como *Salmonella*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Yersinia pestis*. *E. coli* es una de las principales causas de enfermedades diarreicas, peritonitis, colitis, bacteriemia, mortalidad infantil e infecciones del tracto urinario. La más notoria de ellas es la *E. coli* O157:H7, una cepa enterohemorrágica que produce una toxina similar a la de Shiga. O157:H7 es particularmente peligroso porque puede contaminar fácilmente los suministros de alimentos humanos. La infección humana se produce principalmente por el consumo de productos alimenticios contaminados de origen animal o crudos, como ensaladas, agua potable contaminada con desechos animales o humanos, o por propagación directa de persona a persona debido a la mala higiene, pero también por contacto directo con animales infectados. El método de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) es de los principales para el análisis de aguas recreativas y/o detección del patógeno en los pacientes. La principal ventaja de usar métodos de qPCR sobre los métodos tradicionales es su capacidad para proporcionar información sobre la calidad del agua en varias horas, en lugar de al día siguiente. De acuerdo con las diversas publicaciones científicas, las pruebas de diagnóstico PCR se realizan con los genes: 16S, VT2, RPLQ, entre otras; siendo estos los más mencionados.



Diagnóstico: Listeriosis

Organismo: Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes es un patógeno intracelular facultativo grampositivo que puede causar infecciones invasivas graves. La listeriosis invasiva es potencialmente mortal y una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos que conducen a admisiones hospitalarias en los países occidentales. Se transmite principalmente por los alimentos y se contrae a través de la ingestión de productos alimenticios contaminados, como carne procesada, productos lácteos, sándwiches envasados, pescado ahumado en frío, verduras preparadas, ensaladas y frutas. *L. monocytogenes* es la única especie de *Listeria* que se reconoce como patógeno humano. Filogenéticamente pertenece a la división *Listeria sensu strictu*. La adhesión a las células del hospedero es una etapa fundamental en la patogenicidad bacteriana. Para *L. monocytogenes* se ha descrito la participación de varios factores que permiten establecer un contacto íntimo con las células del hospedero, destacándose las proteínas Lap, Ami, FbpA, LapB e InlJ. La PCR es un método preferido por el cultivo debido a su rapidez, y a que es un método sensible y específico para el diagnóstico de listeriosis, específicamente para la detección simultánea del género *Listeria* y la especie *Monocytogenes*. De acuerdo con las diversas publicaciones científicas, las pruebas de diagnóstico PCR se realizan con los genes: 16S rRNA, 23S rRNA y HLY, entre otros; siendo estos los más mencionados.



3. Características de los oligonucleótidos y sondas, y protocolo para el ensayo experimental.

El sistema de diagnóstico basado en I.A. está diseñado específicamente para la detección de uno o varios patógenos, mediante el uso de oligonucleótidos y sondas dirigidos a las secuencias genéticas particulares de cada patógeno de interés. Dichos elementos fueron seleccionados considerando su especificidad y exclusividad, con el propósito de garantizar la precisión del ensayo y minimizar la ocurrencia de falsos positivos. En la Tabla 1 se presenta un resumen de las características de los oligonucleótidos y sondas empleados en el análisis.

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos y sondas y protocolo para el ensayo.

Blanco	Gen	Fluoróforo	Nombre	Secuencia	Tm	GC(%)	Pmol/rxn
Ciclosporosis	HSP70	-	FWD	CTATGTCGCATTACCGACACA	59.75	50.0	10.0
			REV	ATCGAACTTCCGTCGAATGAGAC	59.2	47.83	10.0
		Fam-BHQ1	PROBE	TGGCGAGGAACCCCGAAAACACCGTTTT	67.7	53.57	3.0
Cólera	CTXA	-	FWD	TTATAGCCACTGCACCCAAC	57.1	50.0	10.0
			REV	AGTATGGAATCCACCTAAAGCAG	58.42	45.83	10.0
		Tex-red-BHQ2	PROBE	AGGGGCATACAGTCCTCATCCAGATGAACA	65.0	50.0	3.0
Escherichia coli	RPLQ	-	FWD	CCATCGTAAGAGTGGTCGT	56.11	52.63	10.0
			REV	CTTTAGGCAGAGTCGTCTTGATGA	58.7	45.83	10.0
		Hex-BHQ1	PROBE	CGCAATATGGCAGGTTCACTGGTTCGTC	65.0	53.57	3.0
Listeriosis	HLY	-	FWD	TGAACCTACAAGACCTTCCAGA	57.11	45.45	10.0
			REV	CCACACTTGAGATATATGCAGGAGGA	59.85	46.15	10.0
		Cy5-BHQ2	PROBE	AAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGGAGT	64.98	50.0	3.0

Tabla 2. Protocolo de qPCR

Además, en la Tabla 2 se presenta un protocolo sugerido de qPCR, que incluye los pasos a seguir, así como el tiempo y la temperatura correspondientes a cada etapa. Cabe señalar que la fase de retrotranscripción se aplica únicamente cuando la muestra analizada corresponde a ácidos nucleicos de tipo RNA.

Pasos	Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
0	1	Retrotranscripción	10 minutos	50.00°C
1	1	Desnaturalización inicial	2 minutos	95.00°C
2	45	Desnaturalización	10 segundos	95.00°C
3		Alineamiento y Extensión	30 segundos	60.74°C

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de las posibles interacciones entre los oligonucleótidos y las sondas, con el objetivo de seleccionar el sistema de diagnóstico más eficiente. Este procedimiento permitió descartar la formación de estructuras no deseadas, como interacciones homodiméricas y heterodiméricas, que podrían comprometer el rendimiento de la reacción. En la Figura 1 se presenta un mapa de calor que muestra el porcentaje resultante de la relación entre el ΔG total de la secuencia y el ΔG de la estructura más estable, multiplicado por 100. Un porcentaje menor indica una menor probabilidad de formación de estructuras secundarias indeseadas.

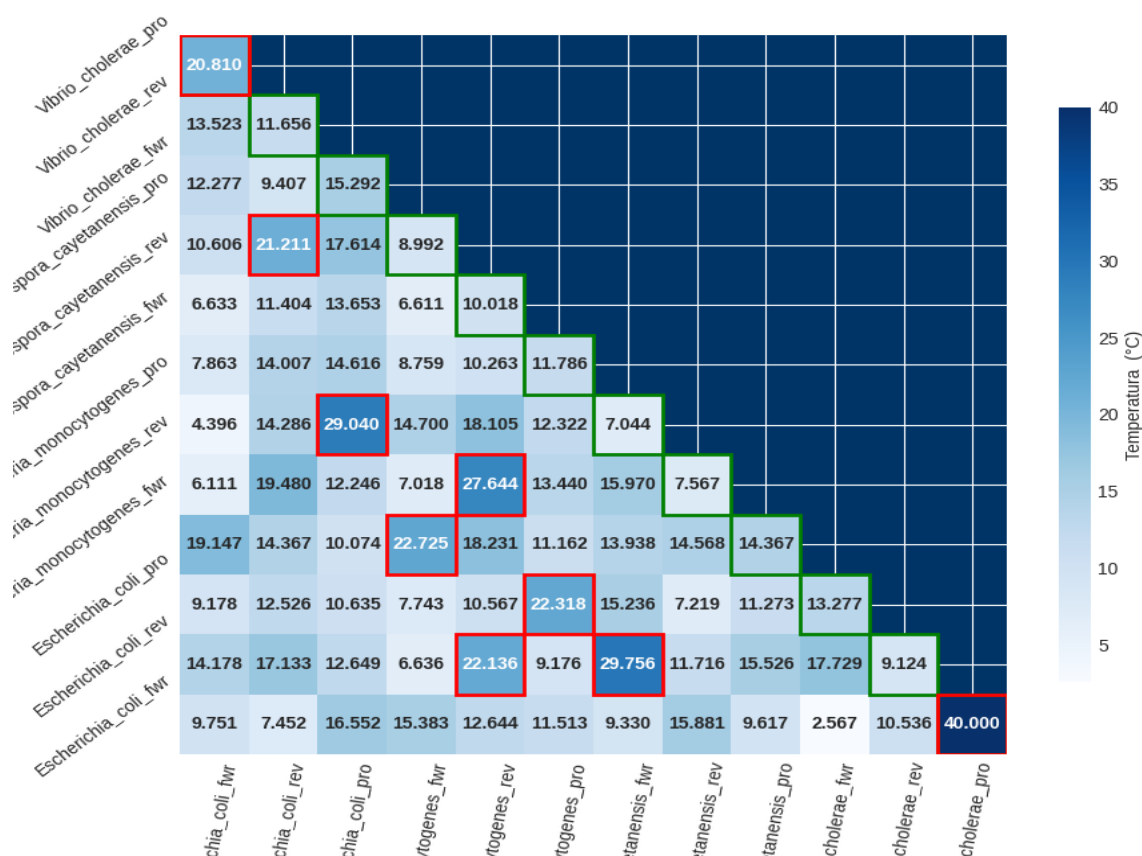
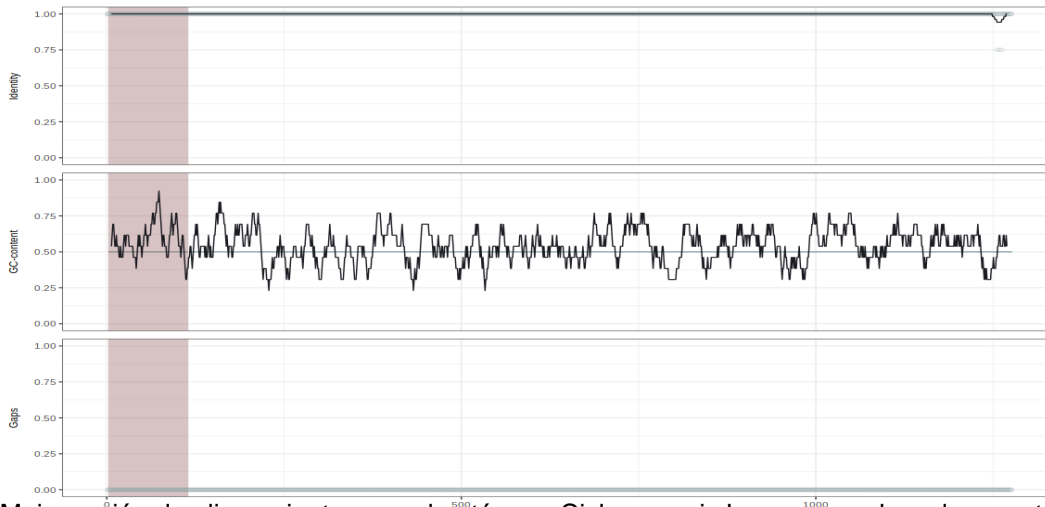


Figura 1. Mapa de calor de las interacciones entre oligonucleótidos y sondas. Se muestra la matriz de interacciones con los valores en porcentaje. Los valores dentro del cuadro con borde verde corresponden a las interacciones homodiméricas. Los valores dentro del cuadro rojo indican un porcentaje mayor al 20% y una un triangulo rojo indica la formación de estructuras con cuatro o más enlaces en los extremos 3'.

4. Regiones de alineamiento

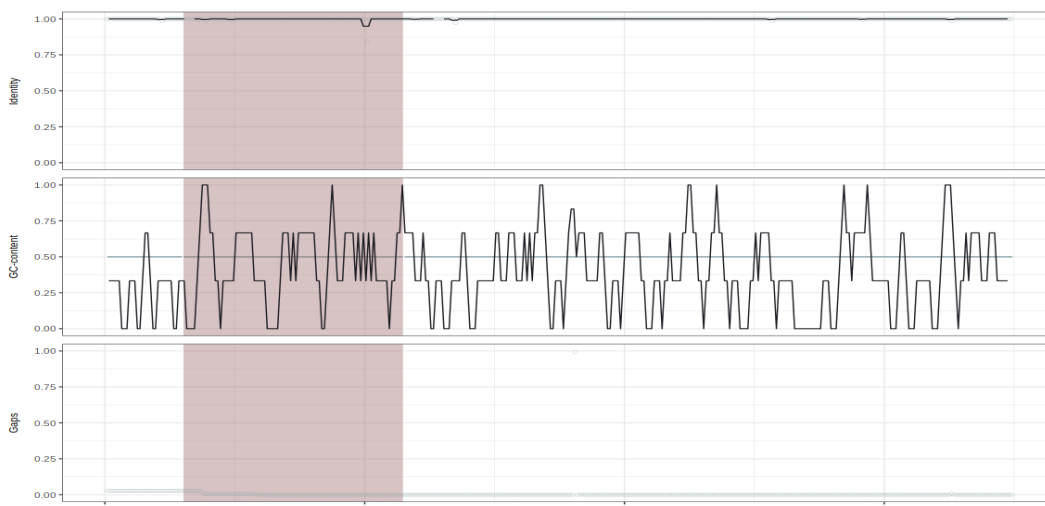
El sistema de diagnóstico por I.A. identifica el gen más adecuado para la detección del patógeno, busca la región más conservada a partir del alineamiento de secuencias. Con base en esta información, se diseñan oligonucleótidos y sondas específicas que permiten abarcar la mayor cantidad posible de variantes del patógeno en estudio. A continuación se muestran las regiones de alineamiento de cada patógeno.

Organismo: *Cyclospora cayetanensis*



Mejor región de alineamiento para el patógeno *Ciclosporiasis*. La zona sombreada muestra la mejor región del gen HSP70, para la identificación de *Ciclosporiasis*.

Organismo: *Vibrio cholerae*



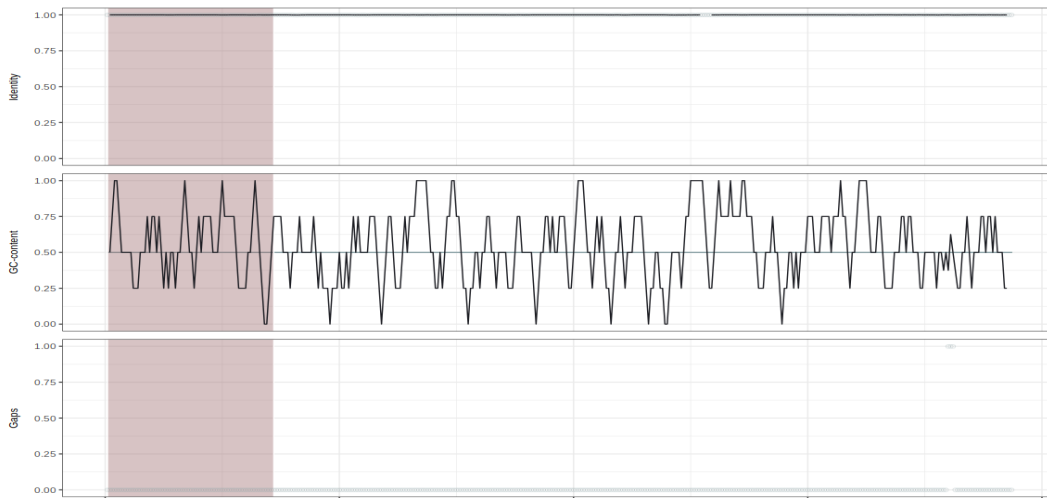
Mejor región de alineamiento para el patógeno *Cólera*. La zona sombreada muestra la mejor región del gen CTXA, para la identificación de *Cólera*.



4. Regiones de alineamiento

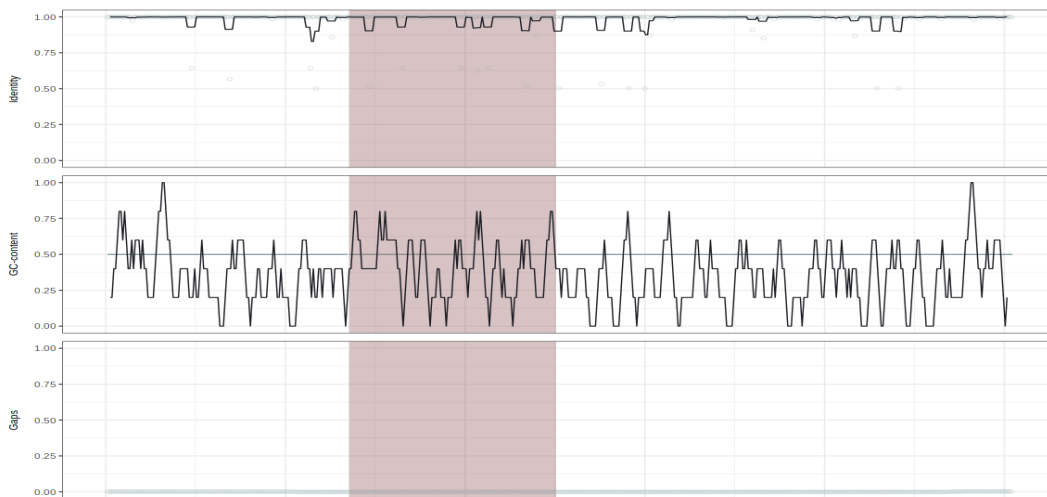
El sistema de diagnóstico por I.A. identifica el gen más adecuado para la detección del patógeno, busca la región más conservada a partir del alineamiento de secuencias. Con base en esta información, se diseñan oligonucleótidos y sondas específicas que permiten abarcar la mayor cantidad posible de variantes del patógeno en estudio. A continuación se muestran las regiones de alineamiento de cada patógeno.

Organismo: *Escherichia coli*



Mejor región de alineamiento para el patógeno *Escherichia coli*. La zona sombreada muestra la mejor región del gen RPLQ, para la identificación de *Escherichia coli*.

Organismo: *Listeria monocytogenes*

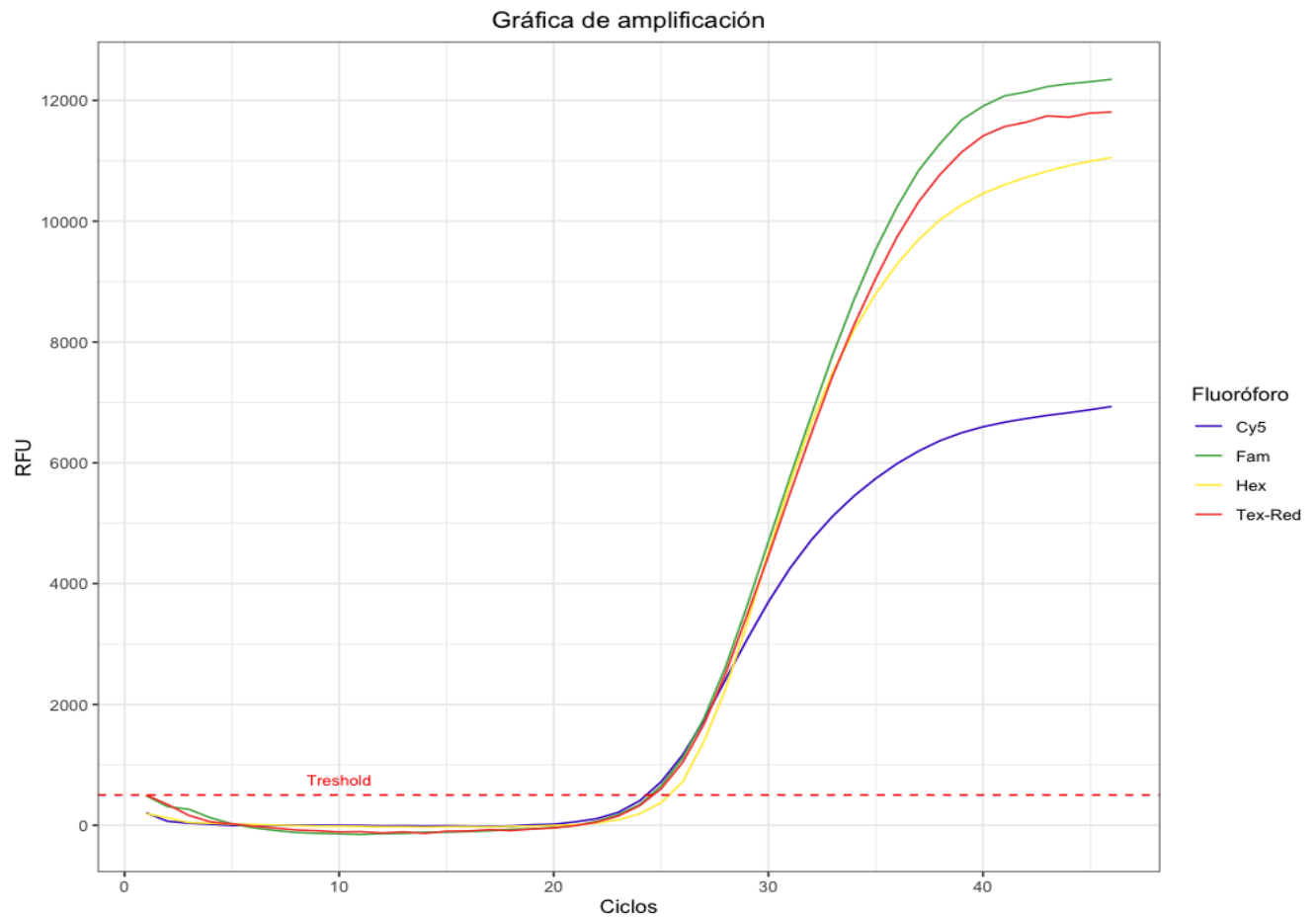


Mejor región de alineamiento para el patógeno *Listeria monocytogenes*. La zona sombreada muestra la mejor región del gen HLY, para la identificación de *Listeria monocytogenes*.



5. Resultados proyectados por Pablo.

PABLO mediante I.A. generó el resultado del diagnóstico molecular, simulando una curva de amplificación de qPCR. En la grafica 1. se presenta dicha curva, acompañada de las señales de fluorescencia correspondientes a cada fluoróforo.



Grafica 1. Gráfico de amplificación. Este análisis es una simulación de PABLO que ayuda a visualizar el posible resultado experimental de la reacción de qPCR.

6. Análisis e interpretación de resultados.

A = Ciclosporosis, B = Cólera, C = Escherichia coli, D = Listeriosis

El análisis e interpretación de los resultados de las muestras debe realizarse con el software correspondiente de cada equipo en conjunto con la tabla 3.

A	B	C	D	Control positivo	Control negativo	INTERPRETACIÓN
+	+	+	+	+	-	Positivo a A,B,C,D
+	+	+	-	+	-	Positivo a A,B,C
+	-	-	-	+	-	Positivo a A
+	+	-	+	+	-	Positivo a A,B,D
+	+	-	-	+	-	Positivo a A,B
+	-	+	+	+	-	Positivo a A,C,D
+	-	+	-	+	-	Positivo a A,C
+	-	-	+	+	-	Negativo a A,D
-	+	-	-	+	-	Positivo a B
-	+	+	+	+	-	Positivo a B,C,D
-	+	+	-	+	-	Positivo a B,C
-	-	+	-	+	-	Negativo a B,D
-	-	+	-	+	-	Negativo a C
-	-	+	+	+	-	Negativo a C,D
-	-	-	+	+	-	Negativo a D
-	-	-	-	+	-	Negativo
±	±	±	±	+	-	R. INVÁLIDO
±	±	±	±	-	-	R. INVÁLIDO
±	±	±	±	+	+	R. INVÁLIDO

(+) = amplificación detectada, (-) = amplificación no detectada, (±) = puede o no detectarse amplificación.

*Todo resultado se considera inválido cuando:

- Se observa amplificación en el control negativo
- Se observa amplificación en el control endógeno RNasa P con un Ct > 38 o ausencia de amplificación, este último únicamente para cuando se trabaja con muestras humanas.

Importante: La amplificación se considera positiva si el valor de Ct para los marcadores es ≤38. Como se ha mencionado anteriormente, el correcto funcionamiento de la prueba depende de la cantidad y calidad de la muestra extraída. Una forma inadecuada de recolección, transporte y/o almacenaje de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.

En algunos modelos de termociclador podría existir un traslape de la señal del canal verde (FAM) sobre el canal amarillo (HEX). Este traslape podría causar una interpretación.

7. Referencias

Se muestran las referencias en formato APA

1. Ciclosporiasis

1.1 Giangaspero A, Gasser RB (2019 Jul). Ciclosporiasis humana.. *The Lancet. Infectious diseases*. DOI: S1473-3099(18)30789-8.

1.2 Li J, Zhang K, Zhang L (2022 May). Cyclospora cayetanensis.. *Trends in parasitology*. DOI: S1471-4922(21)00283-X.

1.3 Zeidler H, Hudson AP (2021 Jul 1). Actualización sobre artritis reactiva: atención a agentes infecciosos nuevos y raros implicados como patógenos.. *Current rheumatology reports*. DOI: 10.1007/s11926-021-01018-6. PMCID: PMC8247622.

1.4 Almeria S, Cinar HN, Dubey JP (2019 Sep 4). Cyclospora cayetanensis y ciclosporiasis: una actualización.. *Microorganisms*. DOI: microorganisms7090317. PMCID: PMC6780905.

1.5 Bayot ML, Mirza TM, Sharma S (2024 Jan). Bacterias acidorresistentes... DOI: NBK537121.

2. Cólera

2.1 Chowdhury F, Ross AG, Islam MT, McMillan NAJ, Qadri F (2022 Sep 21). Diagnosis, Management, and Future Control of Cholera.. *Clinical microbiology reviews*. DOI: 00211-21. PMCID: PMC9491185.

2.2 Kanungo S, Azman AS, Ramamurthy T, Deen J, Dutta S (2022 Apr 9). Cholera.. *Lancet (London, England)*. DOI: S0140-6736(22)00330-0.

2.3 Clemens JD, Nair GB, Ahmed T, Qadri F, Holmgren J (2017 Sep 23). Cholera.. *Lancet (London, England)*. DOI: S0140-6736(17)30559-7.

2.4 Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB (2012 Jun 30). Cholera.. *Lancet (London, England)*. DOI: S0140-6736(12)60436-X. PMCID: PMC3761070.

3. Escherichia coli

3.1 Blount ZD. The unexhausted potential of E. coli. Elife. 2015 Mar 25;4:e05826. doi: 10.7554/eLife.05826. PMID: 25807083; PMCID: PMC4373459.

3.2 Haugland R, Oshima K, Sivaganesan M, Dufour A, Varma M, Siefring S, Nappier S, Schnitker B, Briggs S. Large-scale comparison of E. coli levels determined by culture and a qPCR method (EPA Draft Method C) in Michigan towards the implementation of rapid, multi-site beach testing. J Microbiol Methods. 2021 May;184:106186. doi: 10.1016/j.mimet.2021.106186. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33766609; PMCID: PMC8650687.

3.3 Barbau-Piednoir E, Denayer S, Botteldoorn N, Dierick K, De Keersmaecker SCJ, Roosens NH. Detection and discrimination of five E. coli pathotypes using a combinatory SYBR® Green qPCR screening system. Appl Microbiol Biotechnol. 2018 Apr;102(7):3267-3285. doi: 10.1007/s00253-018-8820-0. Epub 2018 Feb 20. PMID: 29460001; PMCID: PMC5852171.

7. Referencias

Se muestran las referencias en formato APA

3. Escherichia coli (cont.)

3.4 Botkin DJ, Galli L, Sankarapani V, Soler M, Rivas M, Torres AG. Development of a multiplex PCR assay for detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli, enterohemorrhagic E. coli, and enteropathogenic E. coli strains. Front Cell Infect Microbiol. 2012 Feb 14;2:8. doi: 10.3389/fcimb.2012.00008. PMID: 22919600; PMCID: PMC3417533.

4. Listeriosis

4.1 Koopmans MM, Brouwer MC, Vazquez-Boland JA, van de Beek D (2023 Mar 23). Human Listeriosis.. *Clinical microbiology reviews*. DOI: 00060-19. PMCID: PMC10035648.

4.2 Charlier C, Disson O, Lecuit M (2020 Dec). Maternal-neonatal listeriosis.. *Virulence*. DOI: 1759287. PMCID: PMC7199740.

4.3 Schlech WF (2019 May). Epidemiology and Clinical Manifestations of Listeria monocytogenes Infection.. *Microbiology spectrum*. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0014-2018. PMCID: PMC11026082.

4.4 Valenti M, Ranganathan N, Moore LS, Hughes S (2021 Oct 2). Listeria monocytogenes infections: presentation, diagnosis and treatment.. *British journal of hospital medicine (London, England : 2005)*. DOI: 10.12968/hmed.2021.0107.

4.5 Matle I, Mbatha KR, Madoroba E (2020 Oct 9). A review of Listeria monocytogenes from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis.. *The Onderstepoort journal of veterinary research*. DOI: OJVR-87-1869. PMCID: PMC7565150.