BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"DESARROLLO DE CONTROLES POSITIVOS PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS DE TRANSMISIÓN SEXUAL DE DIFÍCIL CRECIMIENTO IN VITRO"

Para obtener el grado de:

Licenciado en Biotecnología

Presenta:

Victor Alfonso Díaz Hernández

Directora:

D. en Cs. María Lilia Cedillo Ramírez

Asesor:

M. en Cs. José Sergio Tecpanecatl Xihuitl

Puebla, Pue., Agosto 2020

AGRADECIMIENTOS

A la D. C. María Lilia Cedillo Ramírez por abrirme las puertas del Centro de Detección Biomolecular y permitirme realizar mi trabajo de tesis bajo su dirección.

Al M. C. José Sergio Tecpanécatl Xihuitl por guiarme en la realización de este trabajo con paciencia y esfuerzo. Sin su tutela habría sido imposible alcanzar los objetivos planteados.

A la M.C. Elda Carreón Moreno por recibirme e instruirme de la forma más amable posible en su lugar de trabajo.

Al Dr. Ricardo Carreño López por donar el plásmido con el que pude continuar mi trabajo de tesis de manera más efectiva.

DEDICATORIA

A Rosalba Hernández Rojas, mi madre.

Siempre trabajando, siempre velando por mí y por mis hermanas. Lo mínimo que podía hacer para retribuir todo su sacrificio era terminar la carrera universitaria que ella misma me regaló, y creo que lo conseguí. Sin ella nada habría sido posible. Todo lo que soy, y también lo que no soy, se lo debo a ella.

A mi familia y a mis amigos, por impulsarme siempre a completar mis objetivos.

Gracias.

ÍNDICE

Índice de Abreviaturas ……5

Resumen …….. 7

Introducción …….. 8

Antecedentes ……14

Justificación ……. 15

Hipótesis ……. 16

Objetivos ……. 17

Metodología ……. 18

Resultados ……. 29

Discusión de resultados…..…….. 50

Conclusiones y Perspectivas……55

Anexos…… 56

Bibliografía ……. 61

Índice de Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Amp: Ampicilina

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BUAP: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

CDB: Centro de Detección Biomolecular

dNTP: desoxinucleosido trifosfato

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido Etildiaminotetraacético)

Gv: *Gardnerella vaginalis*

HF: High- Fidelity

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

ITS: Infecciones de Transmisión Sexual

Kb: Kilobase

LB: Luria Bertani

MCS: Multiple Cloning Site (Sitio de Clonación Múltiple)

mPCR: multiplex Polymerase Chain Reaction (Reacción Múltiple en Cadena de la Polimerasa)

MPM: Marcador de Peso Molecular

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)

Ng: *Neisseria gonorrhoeae*

nm: nanómetros

NTC: Non Template Control (Control de No Templado)

Oligo: Oligonucleótido

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real)

SDS: Sodium dodecyl sulfate (Dodecilsulfato de sodio)

Tv: *Trichomonas vaginalis*

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida

VPH: Virus del Papiloma Humano

RESUMEN

Las infecciones de transmisión sexual están entre las afecciones más comunes para la salud de las personas en todo el mundo. Cada año se presentan millones de casos de infecciones de transmisión sexual (ITS) como sífilis, infecciones clamidiales, gonococicas, tricomoniasis, infecciones por el virus del papilloma humano. El diagnóstico y tratamiento oportuno para combatir estas ITS debe ser parte de una estrategia de prevención, no solo para evitarlas, sino para restringir la cadena de contagio y disminuir las consecuencias graves para la salud sexual y la reproducción. El estándar de oro para el diagnóstico de los principales agentes causales de estas infecciones es por métodos de cultivo in vitro; sin embargo, no todos los laboratorios de diagnóstico tienen la capacidad de acceder a los requisitos establecidos para poder cultivar estos microorganismos. El objetivo de este trabajo fue la construcción de controles positivos para el diagnóstico molecular de microorganismos causantes de infecciones de transmisión sexual a través de vectores de clonación como herramientas para superar la dificultad, elevado costo y problemática de crecimiento de agentes infecciosos intracelulares, además del tiempo de cultivo que rodea a los métodos de identificación convencionales.

INTRODUCCIÓN

Las ITS representan un importante índice de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, por lo que se han considerado como una de las mayores cargas económicas y problemas de salud de manera global (Holmes, K. et al., 2017). Todos los años se producen millones de casos de ITS como sífilis, infecciones clamidiales, gonococicas, tricomoniasis, infecciones por el virus del papilloma humano. Estas infecciones de transmisión sexual causan complicaciones urogenitales como cervicitis, uretritis, vaginitis y ulceración genital e incluso infectar el recto y el tracto faríngeo (Rowley, 2019),

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en 2016, se presentaron 376 millones de nuevas infecciones de transmisión sexual, de las cuales: 87 millones fueron casos de gonorrea, 127 millones de clamidiasis, 6.3 millones de sífilis y 156 millones de tricomoniasis; además, se estima que hay 300 millones de mujeres infectadas por VPH, la principal causa de cáncer cervicouterino (Organización Mundial de la Salud, 2019).

La identificación temprana del agente etiológico permite instaurar el tratamiento adecuado en la primera consulta, lo que lleva a tratar a más pacientes, tanto sintomáticos como asintomáticos, de forma más efectiva y, así, interrumpir sin demoras la cadena epidemiológica de transmisión (Organización Mundial de la Salud, 2019).

Más de 35 bacterias, virus y parásitos patógenos han sido identificados como transmisibles sexualmente (Holmes, K. et al., 2017). La OMS ha catalogado a los principales agentes causales de ITS a: *Candida albicans, Gardenerella vaginalis, Clamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae y Trichomonas.* El objetivo del presente trabajo fue la construcción de controles positivos para el diagnóstico molecular de microorganismos causantes de infecciones de transmisión sexual: *Gardnerella vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas vaginalis.*

Gardnerella vaginalis

Gardnerella vaginalis fue identificada por primera vez en 1953 (Gardner, H., et al., 1955). Inicialmente como *Haemophilus vaginalis*; posteriormente, luego de encontrar variaciones bioquímicas con dicho género se propuso nombrarla como *Corynebacterium vaginalis,* y fue hasta 1980 cuando se propuso colocarla en el género *Gardnerella* y la especie *vaginalis* (Catlin, 1992)

Gardnerella vaginalis es un bacilo inmóvil corto (0.5µm – 1.5µm), anaerobio, no capsulado. En medio de cultivo agar chocolate crece en colonias pequeñas circulares de color gris. Aunque está catalogada como una bacteria Gram positiva, ésta posee una pared celular muy delgada debido a las bajas concentraciones de peptidoglicano lo cual puede llegar a generar confusión con bacterias Gram negativas bajo el microscopio, por lo que se le reconoce como Gram Negativa variable (Harper and Davis, 1982). Para la identificación de *Gardnerella vaginalis* se emplean diversas pruebas bioquímicas (Tabla 1).

Tabla 1. Pruebas bioquímicas de *Gardnerella vaginalis*. (Okwoli, R., et. al, 2002).

Fermentación de carbohidratos	+	Prueba de catalasa	-
Prueba de oxidasa	-	Manitol	-

Gardnerella vaginalis crece predominantemente en tres tipos de medio de cultivo:

- Base agar sangre suplementado con almidón, peptona, y dextrosa para el cultivo primario.
- Base agar chocolate con infusión de cerebro-corazón y 5% de sangre.
- Cultivos líquidos: Caldo Infusión cerebro-sangre + 5% de suero humano; y caldo peptona + carne cocinada.

G. vaginalis está altamente relacionada con la vaginosis bacteriana debido a que produce una citolisina dependiente de colesterol llamada vaginolisina. Estas proteínas son un grupo de toxinas formadoras de poro cuyo blanco son las membranas de las células eucariotas, y son requeridas para la virulencia del microorganismo (Randis et al., 2013).

Se ha detectado la presencia de *G. vaginalis* en pacientes cuyo diagnóstico es negativo para vaginosis bacteriana y en pacientes cuyo diagnóstico es positivo pero son asintomáticas (Catlin, 1992), por lo que es necesario realizar pruebas de diagnóstico rápido para cortar la cadena epidemiológica de dicha infección.

Neisseria gonorrhoeae

Neisseria gonorrhoeae es un diplococo Gram negativo no capsulado cuyo tamaño oscila entre los 0.6 – 0.8 µm de diámetro. Su superficie carente de cápsula está cubierta por fimbrias que favorecen su virulencia. Debido a que es un patógeno humano estricto, puede crecer y multiplicarse en mucosas incluyendo cérvix, útero, trompas de Falopio y uretra, además de ser el agente etiológico del padecimiento mejor conocido como gonorrea. Alguno de estos padecimientos puede provocar en mujeres secuelas severas de enfermedades pélvicas inflamatorias, dolor crónico, embarazos ectópicos e infertilidad, mientras que los hombres pueden desarrollar epididimitis, prostatitis y estrechamiento uretral (Bollea-Garlatti, Vaglio-Giors, Guzzi-Maqueda, Volonteri, Galimberti, 2013).

Algunos individuos pueden presentar infecciones asintomáticas y transmitir los gonococos sin saberlo. Las infecciones causadas por este microorganismo pueden ser adquiridas por medio de secreciones cervicales; incluso, en adultos y neonatos expuestos a estas secreciones pueden llegar a presentar conjuntivitis (Ng and Martin, 2018)

El método de diagnóstico comúnmente empleado es la realización de una tinción de Gram a partir de exudado uretral, cervical o vaginal en el cual se observan diplococos Gram negativos con forma de riñón, frecuentemente encontrados dentro de los neutrófilos; sin embargo, todo diagnóstico debe ser confirmado por medio de cultivo.

Neisseria gonorrhoeae crece predominantemente en 3 tipos de cutivo:

- Thayer-Martin
- Martin Lewis
- New York city

Los cuales tienen su base en el agar chocolate y se suplementan con algunos antibióticos y otros reactivos como: vancomicina, colistina, trimetropina lactato, nistatina, anfotericina B, arginina, hipoxantina, o uracilo. Los cultivos se realizan a 35 - 37°C en una atmósfera enriquecida con 3 - 7% de CO_2 durante 18-24 horas (Ng and Martin, 2018).

Tabla 2. Pruebas bioquímicas de *Neisseria gonorrhoeae* (Bollea-Garlatti et al., 2013)

Fermentación de carbohidratos	+ (solo glucosa)
Prueba de oxidasa	+
Prueba de catalasa	+

Trichomonas vaginalis

Trichomonas vaginalis es un protozoario flagelado causante de la infección de transmisión sexual no viral más extendida en el mundo conocida como tricomoniasis (Edwards, Burke, Smalley, and Hobbs, 2014)(Bouchemal, Bories, and Loiseau, 2017).

T. vaginalis fue descrito por primera vez por Donné en 1836 (Petrin et al., 1998), es un protozoario que solo existe en un estado morfológico (como trofozoíto), cuenta con 5 flagelos que le confieren motilidad y adhesión al epitelio vaginal (Upcroft, 2001).

La OMS estima que hay 276.4 millones de nuevos casos de contagio por *Trichomonas* cada año en adultos cuya edad oscila entre 15 y 49 años, llegando a un registro de cerca de 3.7 millones de personas infectadas en 2012, en toda América del Norte (Masek, Dize, Jang, Li, and Chernesky, 2017).

La sintomatología de esta infección puede presentar flujo vaginal amarillo/verdoso y causar comezón vaginal y mal olor. Por otra parte, los hombres que han contraído la infección pueden desarrollar uretritis, aunque estos casos son poco frecuentes pues la mayoría de los casos son asintomáticos (Pol, 2016).

Los síntomas de una infección por *T. vaginalis* son similares a los causados por otros microorganismos como *N. gonorrhoeae* y *Mycoplasma genitalium* por lo que el diagnóstico basado en sintomatología sería, probablemente, incorrecto (Edwards, Burke, Smalley, and Hobbs, 2014). Un síntoma característico de tricomoniasis es la inflamación denominada “cérvix de fresa”, cuya particularidad más notoria es el patrón moteado que genera, y éste solo se presenta en el 2% de los casos (Fouts and Kraus, 1980). Es muy importante el diagnóstico de tricomoniasis para el subsecuente tratamiento ya que los antibióticos comúnmente recomendados para uretritis como la azitromicina o la doxiciclina no son efectivos contra esta infección (Abdolrasouli et al., 2007).

Los métodos convencionales para detectar *T. vaginalis* se basan en técnicas de microscopía y, aunque esta técnica es rápida y no tan cara, es solo 36 - 75% sensible comparado con el método de detección basado en cultivo (Bachmann et al., 2011). Es poco probable que utilizando la observación bajo microscopio se identifique a *T. vaginalis* en muestras donde la carga del organismo está por debajo de 10^4 células/mL y, por esta razón, la muestra corre el riesgo de no incluirse en los campos examinados en el portaobjetos (Garber, 2005). Además, la

sensibilidad de este método de detección decrece rápidamente si llega a haber retrasos entre la adquisición de la muestra y su procesamiento y examinación con una reducción del 20% cada 10 minutos aproximadamente ya que *T. vaginalis* va perdiendo motilidad con el tiempo (Kingston et al., 2003).

El uso de pruebas moleculares es más recomendado para la detección de este parásito en personas que presentan los síntomas de la infección, debido a su más alta sensibilidad y especificidad (Pol, 2016).

Dentro de las complicaciones relacionadas con mujeres embarazadas cuyo diagnóstico es positivo para tricomoniasis están el nacimiento prematuro del producto y un bajo peso al nacer. Además, también hay estudios que relacionan la infección por *T. vaginalis* con un incremento significativo en el riesgo a contraer el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el Virus del Papiloma Humano (VPH). Esta relación puede explicarse como una relación biológica, donde la infección por *T. vaginalis* induce una respuesta inflamatoria que recluta células susceptibles a infección por estos virus debido a las microabrasiones de la vagina causadas por la infección que permiten el acceso a otros patógenos (Codina, Martín, and Ibarra, 1983).

Al igual que la infección por *T. vaginalis,* el VPH incrementa el riesgo de transmisión de VIH, probablemente por la disrupción de la integridad de las mucosas promoviendo la adquisición, prevalencia y progresión de otras ITS (Dreyer, 2018). El VPH, el VIH y las bacterias asociadas a ITS comparten una relación bidireccional incrementando la proliferación de estos microorganismos en el tracto genital, resultando en un incremento en el riesgo de trasmitirlo (Lowe, S., Mandiriri, A., et al., 2019).

Antecedentes

En marzo de 2004, Juan Navarrete Castro y colaboradores del Centro Médico Nacional “La Raza”, del IMSS, clonaron una secuencia representativa de una región altamente conservada no traducible 5´ del virus de la hepatitis C para la obtención de un control positivo adecuado en la prueba cualitativa de RT-PCR. La importancia de estas regiones recae en su poca variación génica lo que las vuelve de gran utilidad como control positivo en pruebas diagnósticas (Castro et al., 2004)

En 2009, Ana María colaboradores del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, en La Habana, Cuba, desarrolló controles positivos para la detección y cuantificación por métodos moleculares del virus de influenza aviar. Estos controles se realizaron a partir de la clonación de dos productos de PCR, uno correspondiente a una región del gen de la hemaglutinina del subtipo H5 y el otro al gen de la matriz (M) para Influenza tipo A. (Acevedo et al., 2009)

En 2016, Camacho y colaboradores clonaron secuencias del virus de chikungunya, virus del Zika, y 4 serotipos del virus del dengue para la obtención de controles positivos para la validación de técnicas moleculares las cuales fueron utilizadas para el diagnóstico e investigación de estas infecciones virales. Secuencias de interés de estos virus fueron clonadas en el sistema pGEM®-T Easy. Los plásmidos recombinantes obtenidos con cada una de las secuencias especificas se utilizaron como controles positivos en técnicas moleculares, evitando el uso de cultivos celulares que pueden resultar costosos, laboriosos y potencialmente peligrosos (Camacho et al., 2016).

En el 2004, Remy Charrel y colaboradores diseñaron dos tipos de vectores para ser utilizados como controles positivos para la identificación por métodos moleculares de varios agentes biológicos relacionados con reportes sobre bioterrorismo en el año 2001 (Charrel, Scola, Raoult, 2004).

JUSTIFICACIÓN

El fortalecimiento de los sistemas de diagnóstico frente a probables brotes epidemiológicos es una prioridad a nivel mundial, de ahí la importancia de la detección por métodos moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes. Su elevada rapidez, sensibilidad y especificidad permiten tomar las medidas de control pertinentes para evitar la diseminación del agente infeccioso, en el menor tiempo posible.

Es por esta razón que en el Centro de Detección Biomolecular (CDB) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) surge la necesidad de desarrollar controles positivos para la identificación de agentes causales de infecciones de transmisión sexual como *Neisseria gonorrhoeae, Gardnerella vaginalis y Trichomonas vaginalis* ya que su identificación por los métodos convencionales es tardada, laboriosa y, en algunas ocasiones, llega a requerir métodos de cultivo cuyos costos se elevan excesivamente debido a que algunos de estos microorganismos tienen requerimientos nutricionales exigentes como el uso de cisteína, glucosa, piruvato o lactato como fuente de carbono, factores de crecimiento como aminoácido, purinas y pirimidinas.

La obtención de plásmidos recombinantes como controles positivos para la identificación de cada uno de estos microorganismos por métodos moleculares permitirá al Centro de Detección Biomolecular la entrega de resultados más rápidos.

HIPÓTESIS

Es posible la obtención de controles positivos para pruebas de diagnóstico molecular a través de plásmidos recombinantes que contengan fragmentos de genes conservados de agentes infecciosos de difícil crecimiento en sistemas in vitro en el Centro de Detección Biomolecular.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar controles positivos para la detección molecular de microorganismos de transmisión sexual de difícil crecimiento in vitro mediante la clonación de fragmentos conservados en vectores de clonación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar las secuencias de los genes de interés para seleccionar el tamaño del fragmento a amplificar de los agentes causales: *Neisseria gonorrhoeae, Gardnerella vaginalis y Trichomonas vaginalis.*
- Diseñar oligonucleótidos que amplifiquen las secuencias de interés.
- Amplificar la secuencia blanco de cada agente etiológico.
- Insertar en un vector de clonación el fragmento amplificado utilizando enzimas de restricción y ligación.

METODOLOGÍA

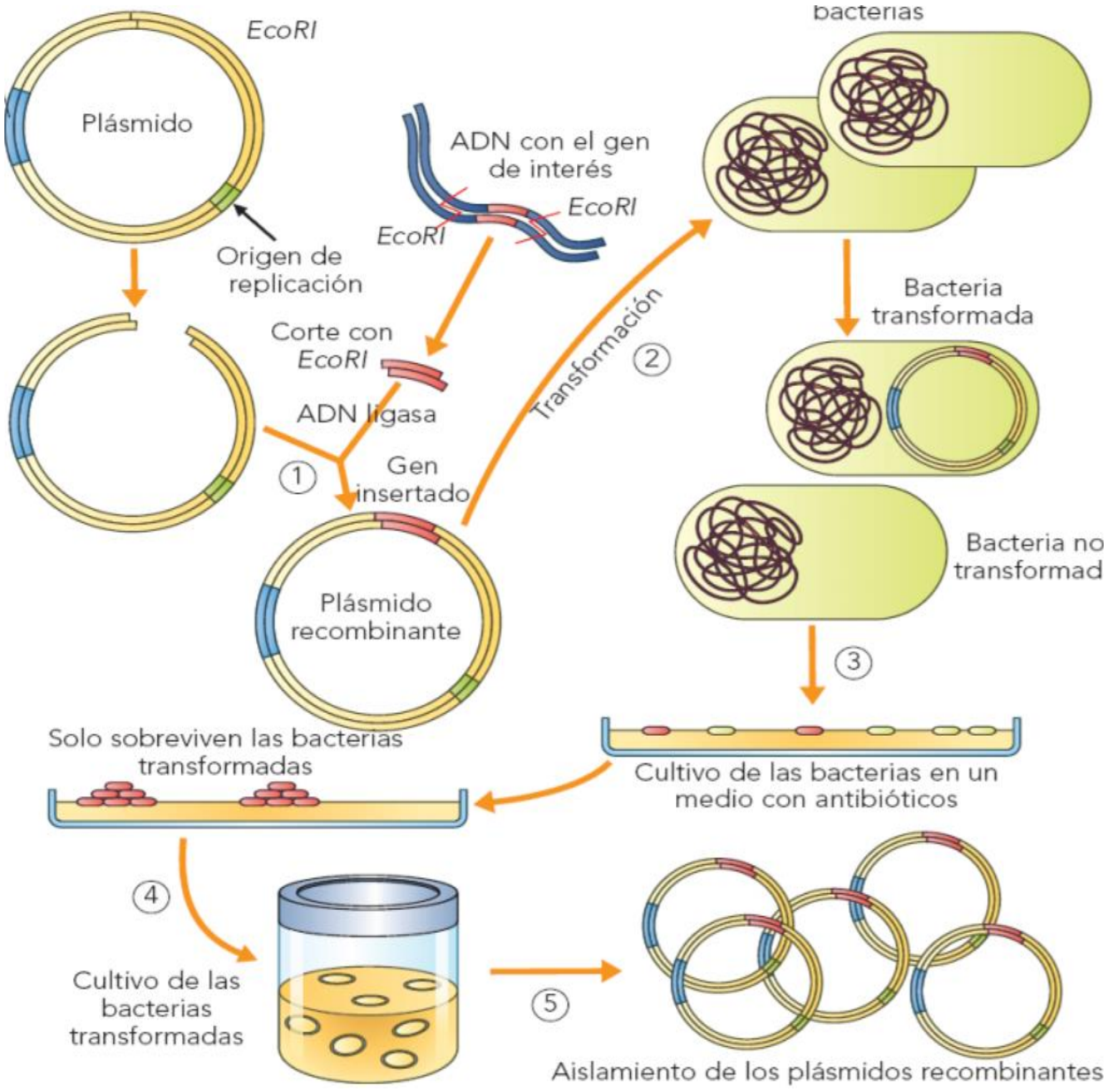
Obtención de Secuencias a clonar

- **A1** • Desarrollo de análisis *in silico.*
- **A2** • Diseño de oligonucleótidos por medio del software Snapgene.
- **A3** • Amplificación y restricción de secuencias de interés.

Obtención del plásmido de clonación

- **B1** • Preparación de células *E.coli* TOP10 competentes y Transformación.
- **B2** • Extracción de ADN plasmídico.
  • Visualización de ADN plasmídico.
- **B3** • Restricción de ADN plasmídico.
  • Conservación a -80°C.

C1. Ligación y Transformación del Plásmido Recombinante



A1.

Desarrollo de análisis *in silico*.

El primer paso de esta metodología fue la identificación de las secuencias de los genes utilizadas en este trabajo, empleando el software de alineamiento de bases BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que permitió la búsqueda de secuencias a partir de oligonucleótidos para detección de microorganismos causantes de infecciones de transmisión sexual utilizados en el Centro de Detección Biomolecular de la BUAP.

Se seleccionó el plásmido pBluescript II SK(+) de 2961 pb (pares de bases) como vector de clonación debido a que contiene dos marcadores de selección (Figura 1): un gen de resistencia a ampicilina y el gen LacZ, el cual nos permite diferenciar entre colonias azules y blancas para la identificación del plásmido recombinante permitiendo la selección de bacterias modificadas en un tiempo más corto.

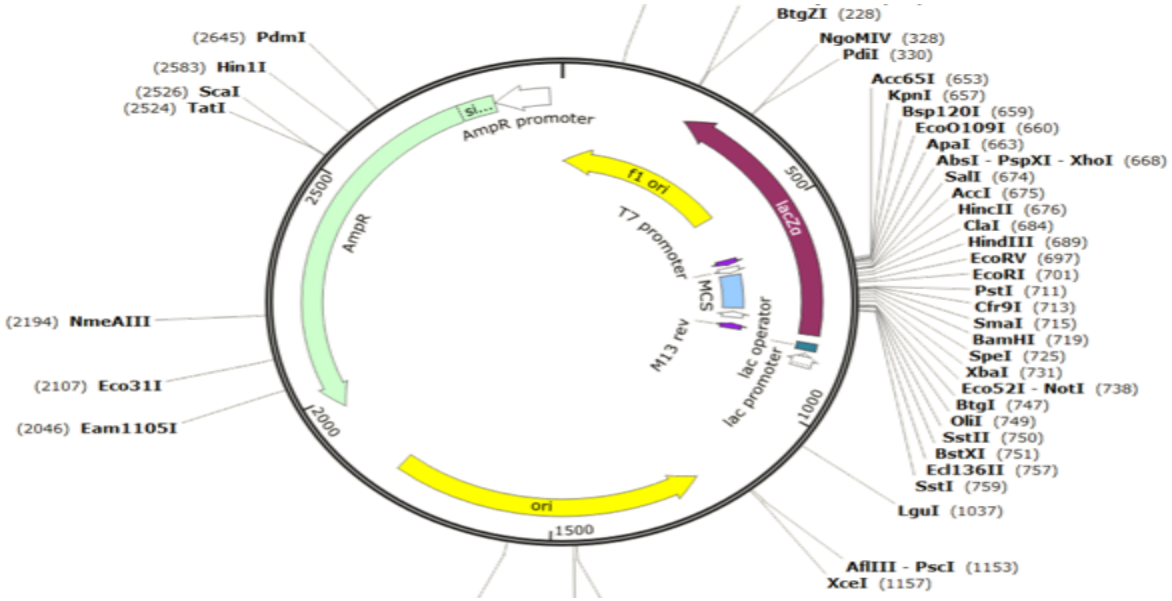


Figura 1.- Representación esquemática del plásmido pBluescriptIISK(+).

Gen Lac Z:
Dos sitios de origen de replicación.
Gen de Resistencia a Ampicilina.
Sitio de Multiclonación.
Oligonucleótidos para amplificación del Sitio de Multiclonación..

Mediante el software Snapgene se ubicaron los sitios de restricción contenidos en el Sitio de Clonación Múltiple (MCS) del plásmido pBluescript (Figura 5) para determinar las enzimas de restricción que presentaran la mejor compatibilidad con el plásmido y las secuencias de interés.

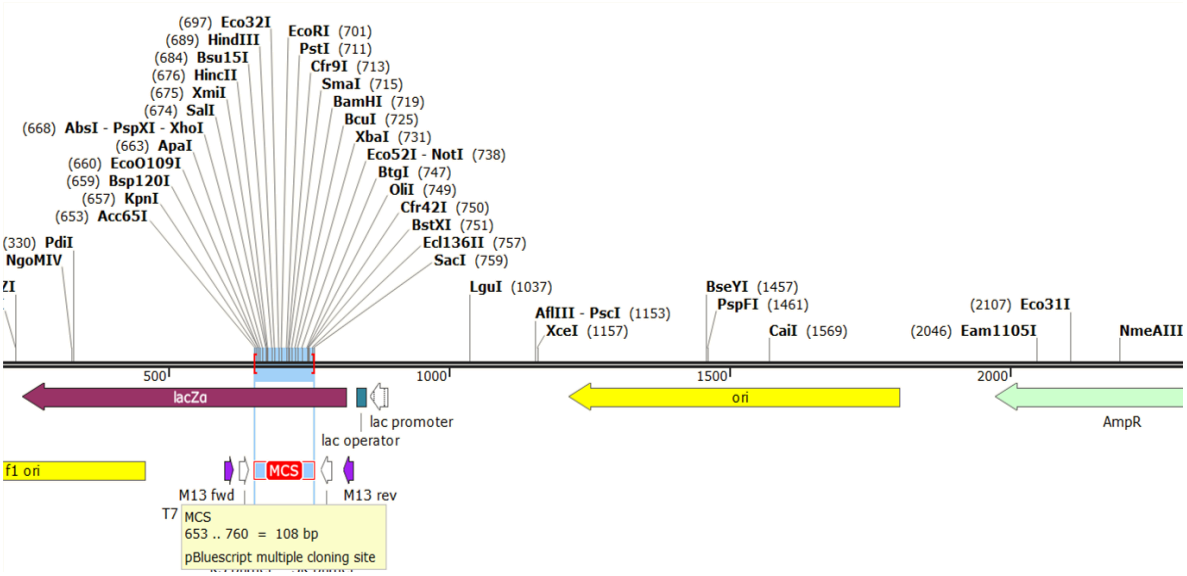


Figura 2. Mapa lineal del plásmido pBluescript II SK{(+). En azul y rojo se delimita el MCS donde se identifican los sitios de reconocimiento a enzimas de restricción que posee el plásmido.
Gen Lac Z. Dos sitios de origen de replicación. Gen de Resistencia a Ampicilina.

Tabla 3. Enzimas de restricción utilizadas para generar cortes específicos para cada fragmento.

Microorganismo	Corte 5´	Corte 3´
Gardnerella vaginalis	XbaI	EcoRI
Neisseria gonorrhoeae	XbaI	BamHI
Trichomonas vaginalis	XhoI	BamHI

A2.

Diseño de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos diseñados para este trabajo (Tabla 4) se basaron en los oligonucleótidos utilizados en el CDB para la detección de microorganismos causantes de ITS, priorizando la presencia de regiones amplias en ambos extremos de las secuencias (5' y 3'). Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por T4 Oligo de Ampli Bio.

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los fragmentos de interés.

Microorganismo	Nombre	Oligonucleótido 5' – 3'	Longitud (pb)	Tm (°C)	Amplificado (pb)
Gardnerella vaginalis	NvoGvFw	TTGTGTTCTTGGTGTTTGGT	20	55	643
	NvoGvRv	GCGCTACTTGGGAATAAACAT	21	55	
Neisseria gonorrhoeae	NvoNgFw	CTCAAATCTTAATTCTTCTAGAAACAAACC	29	52	934
	NvoNgRv	GTACTTCAGTTGTGGATCCGACAAAC	26	54	
Trcihomonas vaginalis	NvoTvFw	CAACAGGTTCATACCACGG	19	53	1162
	NvoTvRv	GGATATCGCAGATAGCGGA	19	55	

A3.

Amplificación de fragmentos a clonar.

Todas las PCR fueron realizadas en un termociclador MultiGene Optimax Gradient de Labnet International con las condiciones mostradas en la tabla 5.

Tabla 5. Protocolo de amplificación de fragmentos a clonar.

Proceso		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	2 minutos
Repetir x38 ciclos	Desnaturalización	95°C	1 minuto
	Alineamiento	56°C	1 minuto
	Elongación	72°C	1 minuto
Elongación Final		72°C	5 minutos

Las condiciones de PCR para la amplificación de las secuencias a clonar se estandarizaron utilizando la DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µL) de ThermoFisher. Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación, se empleó la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µL) de ThermoFisher, utilizando las concentraciones ideales (Tabla 6) en un volumen final de 25 µL.

Tabla 6. Protocolo de amplificación para las secuencias a clonar de los 3 microorganismos seleccionados.

	Concentración Incial	Concentración Final	1Rx
HF Buffer	5X	1x	5 µL
Oligonucleótido Fw	10 µM	1 µM	2.5 µL
Oligonucleótido Rv	10 µM	1 µM	2.5 µL
dNTPs	10 mM	200 µM	1 µL
ADN	-	0.2 – 2 ng	1 µL
Enzima	2 U/ µL	1 U	0.5 µL
Agua	-	-	12.5 µL
Volumen final			**25 µL**

Las amplificaciones se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se fotografiaron en un fotodocumentador 212 Pro de Carestream.

Digestión de los productos de amplificación con enzimas de restricción.

Las digestiones de las amplificaciones fueron realizadas con las enzimas elegidas en el análisis *in silico* para cada secuencia (Tabla 3), utilizando el FastDigest Value Pack de ThermoFisher y siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor:

Tabla 7. Protocolo de restricción de las secuencias a clonar.

	Concentración Incial	Concentración final	1Rx
ADN	-	0.2 – 2 ng	5 µL
Buffer de restricción	10X	1X	2 µL
Enzima de Restricción	1 U/µL	0.2 U	0.2 µL
Agua	-	-	12.8 µL
Volumen final			**20 µL**

Las restricciones se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y se fotografiaron en un fotodocumentador 212 Pro de Carestream.

B1.

Preparación de células *E. coli* TOP 10 competentes y Transformación

Para almacenar los plásmidos recombinantes resultantes de la clonación de secuencias se utilizaron bacterias One shot TOP10 Chemically Competent *E.coli* de ThermoFisher, las cuales permiten la propagación de plásmidos al tener una mayor eficiencia de transformación que otras cepas.

Se utilizó el protocolo descrito por Hanahan en 1983 (Hanahan, 1983) como guía para preparar nuevos cultivos de células *E. coli* TOP10 químicamente competentes utilizando una mezcla de $CaCl_2$ 80mM y $MgCl_2$ 50mM para modificar la membrana de las células en lugar de utilizar solo el $CaCl_2$ (ver Anexos B1).

Transformación de las células competentes.

El protocolo de transformación de células competentes se realizó basado en lo descrito por Hanahan en 1985 (Hanahan, 1985), el cual establece que al poner en contacto a las bacterias competentes con el ADN exógeno y provocar un cambio de temperatura brusco se altera la permeabilidad de la membrana celular lo que permite a la bacteria tomar el ADN del medio en el que se encuentran y luego cerrar su membrana para no expulsar el ADN exógeno.

En este protocolo se modificaron los tiempos de incubación en hielo y choque térmico a 30 minutos y 45 segundos, respectivamente, manteniendo las mismas temperaturas que el protocolo original (ver Anexo B1).

B2.

Extracción de ADN plasmídico.

Una vez transformadas las células competentes se seleccionaron las colonias azules que no presentaron crecimiento satélite para cultivarlas en 5 mL de medio LB con ampicilina [100 mg/mL] y se incubaron en agitación a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se realizó la extracción del plásmido mediante una lisis alcalina basada en la descrita por por Birnboim en 1973 y Sambrook en 1989 (ver anexo B2).

Visualización de ADN plasmídico.

Para comprobar la extracción de plásmido, se realizó una electroforesis de las muestras extraídas en un gel de agarosa al 0.8%.

B3.

Digestión con enzimas de restricción del ADN plasmídico.

El plásmido se cortó con la enzima de restricción Eco32I, del FastDigest Value Pack de ThermoFisher mediante el protocolo recomendado por el fabricante.

Las restricciones de ADN plasmídico se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio y se fotografiaron con un fotodocumentador 212 Pro de Carestream.

C1.

Ligación

Para determinar la concentración óptima del inserto utilizamos la Ecuación del radio molar vector : inserto utilizando una relación entre 1:3 y 1:5.

$$\frac{(ng\ vector)(Kb\ inserto)}{Kb\ vector}\ x\ Relación\ molar\ Vector{:}\ Inserto = ng\ del\ inserto$$

Para cuantificar los nanogramos de los productos digeridos fue necesario medir la concentración del plásmido y del fragmento de interés utilizando un nanofotómetro de la marca IMPLEN.

Para la ligación se empleó la enzima T4 DNA Ligase de ThermoFisher con el protocolo sugerido por el fabricante, incubando a 8°C durante toda la noche.

Tabla 7. Protocolo de ligación de las secuencias a clonar y el plásmido pBluescript. Todas las reacciones varían en volumen de plásmido e inserto debido a que no todas las concentraciones son iguales.

	1Rx
Plásmido lineal	0.5 – 1ng
Inserto de interés	Ajustado a radio molar 1:3 – 1:5
Buffer de reacción 10X	2 µL
Enzima Ligasa	1 U
Agua	para volumen final de 20 µL

Transformación de la construcción plásmido – inserto.

El protocolo de transformación de células competentes con la ligación inserto:vector se realizó de la misma manera que la transformación de plásmido vacío utilizando las mismas modificaciones explicadas anteriormente.

Extracción de ADN plasmídico.

Luego de transformar las células competentes con la construcción del plásmido – inserto, se seleccionaron las colonias que crecieron de color blanco y una de color azul como control. Posteriormente, se realizaron las extracciones del plásmido por lisis alcalina utilizando el método antes descrito y se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Los plásmidos recombinantes extraídos se trataron con dos enzimas de restricción diferentes (por separado) para poder revisar el perfil de restricción de acuerdo con el peso de los fragmentos esperados.

RESULTADOS

Análisis de las secuencias de los genes de interés de los agentes causales: *Neisseria gonorrhoeae, Gardnerella vaginalis y Trichomonas vaginalis*.

La identificación de las secuencias utilizadas en este trabajo se realizó a partir de análisis de alineamiento de bases con la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
Gardnerella vaginalis 3' end of 16S ribosomal RNA, internal transcribed sp	44.1	64.4	100%	7e-06	100.00%
Gardnerella vaginalis strain FDAARGOS_568 chromosome, complete gen	34.2	1842	100%	0.007	100.00%
Gardnerella vaginalis strain DSM 4944 genome assembly, chromosome: I	34.2	2009	100%	0.007	100.00%
Gardnerella vaginalis ATCC 14018 = JCM 11026 DNA, complete genome	34.2	1990	100%	0.007	100.00%
Gardnerella vaginalis genes for 16S rRNA, ITS, 23S rRNA, strain: ATCC 1	34.2	54.5	77%	0.007	100.00%
Gardnerella vaginalis HMP9231, complete genome	34.2	1989	100%	0.007	100.00%
Gardnerella vaginalis ATCC 14019, complete genome	34.2	2009	100%	0.007	100.00%
Gardnerella vaginalis strain NCTC10287 genome assembly, chromosome:	34.2	2009	100%	0.007	100.00%

Figura 3. Resultados del alineamiento de la secuencia de *Gardnerella vaginalis*.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
Neisseria gonorrhoeae SS3160 DNA, complete genome	36.2	1153	100%	0.006	100.00%
Neisseria gonorrhoeae strain AUSMDU00010541 chromosome, complete g	36.2	1132	100%	0.006	100.00%
Neisseria gonorrhoeae strain TFG-B2 chromosome, complete genome	36.2	1132	100%	0.006	100.00%
Neisseria gonorrhoeae strain TFG-A2 chromosome, complete genome	36.2	1132	100%	0.006	100.00%
Neisseria gonorrhoeae strain NJ189125 chromosome, complete genome	36.2	1132	100%	0.006	100.00%
Neisseria gonorrhoeae FC498 DNA, complete genome	36.2	1153	100%	0.006	100.00%
Neisseria gonorrhoeae FC460 DNA, complete genome	36.2	1153	100%	0.006	100.00%
Neisseria gonorrhoeae FC428 DNA, complete genome	36.2	1153	100%	0.006	100.00%
Neisseria gonorrhoeae strain FQ01 chromosome, complete genome	36.2	1153	100%	0.006	100.00%
Neisseria gonorrhoeae strain FQ82 chromosome, complete genome	36.2	1153	100%	0.006	100.00%

Figura 4. Resultados del alineamiento de la secuencia de *Neisseria gonorrhoeae*.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
Trichomonas vaginalis G3 beta-tubulin, putative (TVAG_456920) parti	46.1	46.1	100%	7e-06	100.00%
Trichomonas vaginalis G3 beta-tubulin, putative (TVAG_062880) parti	46.1	46.1	100%	7e-06	100.00%
Trichomonas vaginalis G3 beta-tubulin, putative (TVAG_073810) parti	46.1	46.1	100%	7e-06	100.00%
Trichomonas vaginalis G3 beta-tubulin, putative (TVAG_008680) parti	46.1	46.1	100%	7e-06	100.00%
Trichomonas vaginalis G3 beta-tubulin, putative (TVAG_200200) parti	46.1	46.1	100%	7e-06	100.00%
Trichomonas vaginalis G3 beta-tubulin, putative (TVAG_525430) parti	46.1	46.1	100%	7e-06	100.00%

Figura 5. Resultados del alineamiento de la secuencia de *Trichomonas vaginalis*.

Diseño de oligonucleótidos para las secuencias de interés.

Los oligonucleótidos de diagnóstico de ITS y de clonación con sus respectivos amplificados fueron delimitados para cada microorganismo del presente trabajo en las figuras 6, 7 y 8. Los mapas de las secuencias fueron diseñados por medio del software Snapgene.

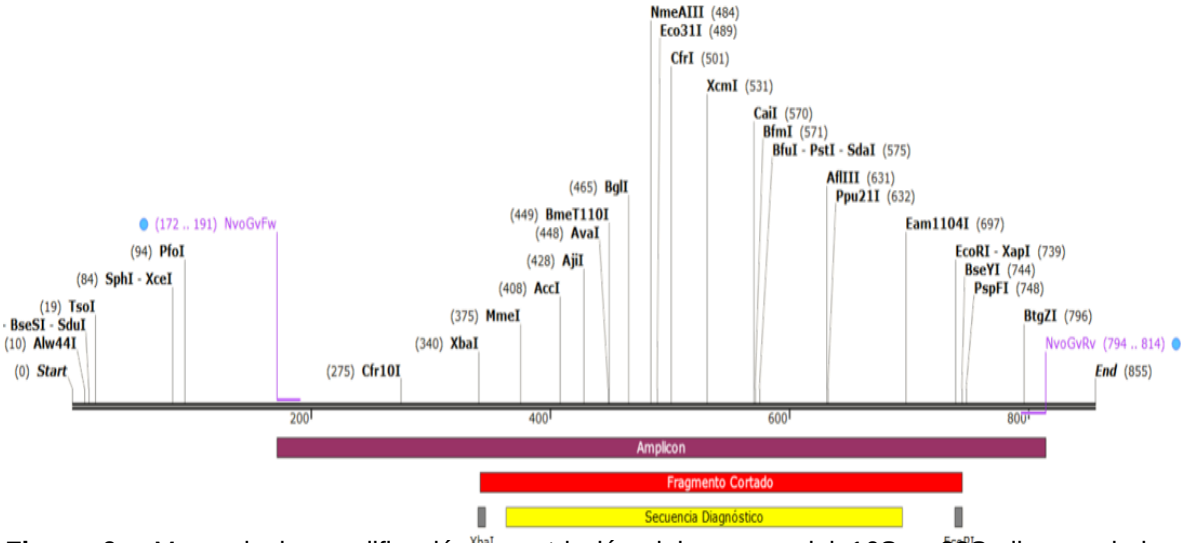


Figura 6. Mapa de la amplificación y restricción del gen parcial 16S y 23S ribosomal de *Gardnerella vaginalis.*

Oligos Fw: 55°C
Amplificado sin cortar: 643 pb
Amplificado cortado: 399 pb

Oligo Rv: 55°C
Amplicado de Diagnóstico: 330 pb
Sitios de corte: XbaI – TCTAGA / EcoRI – GAATTC

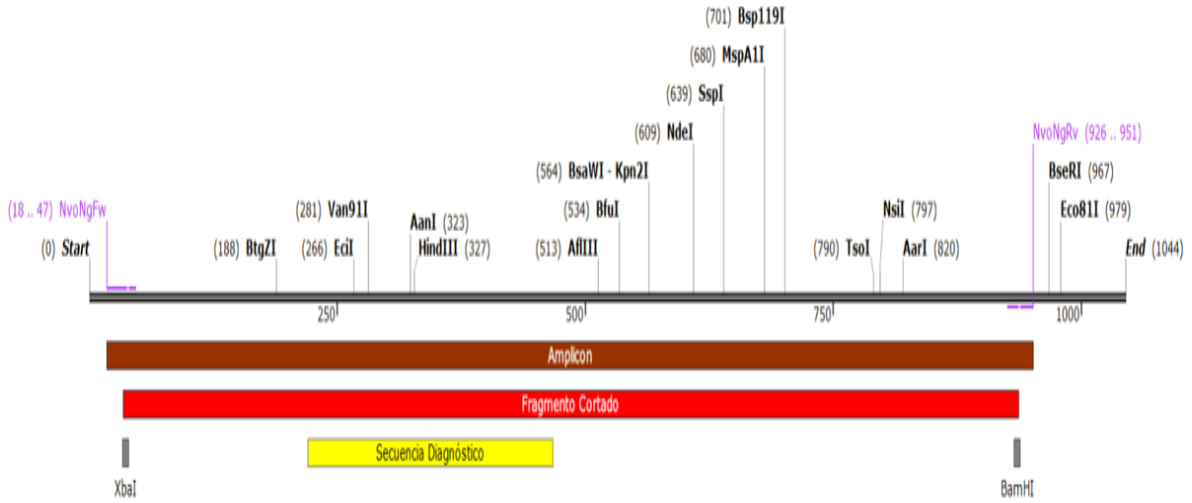


Figura 7. Mapa de la amplificación y restricción de la secuencia correspondiente al marco de lectura abierto (ORF) 1 del cromosoma de *Neisseria gonorrhoeae.*

Oligos Fw: 52°C
Amplificado sin cortar: 934 pb
Amplificado cortado: 903 pb

Oligo Rv: 54°C
Amplificado de Diagnóstico: 247 pb
Sitios de corte: XbaI – TCTAGA / BamHI – GGATCC

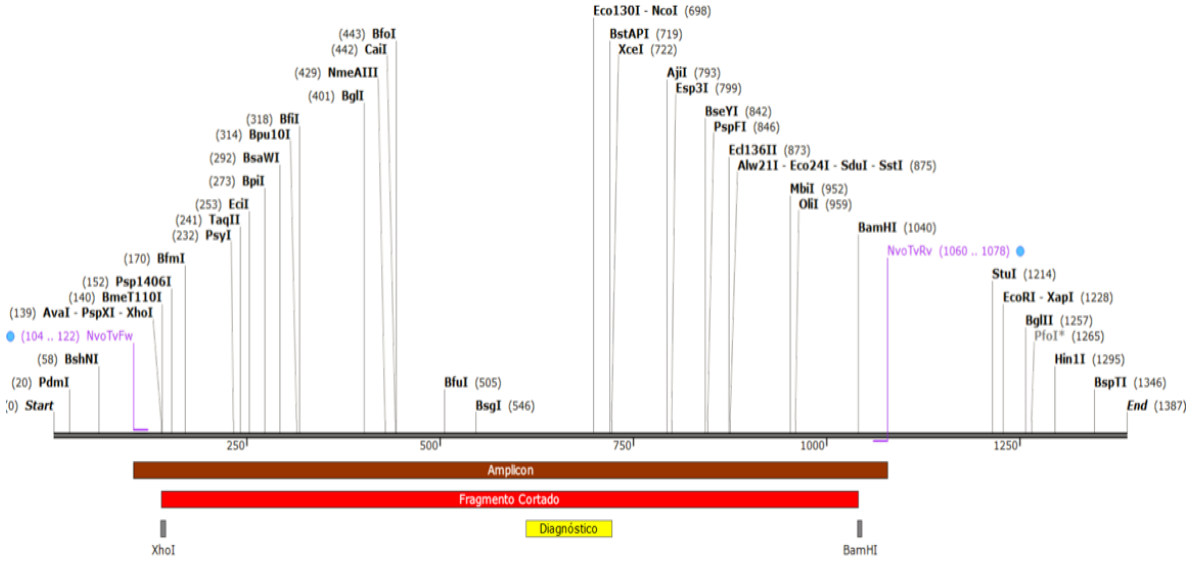


Figura 8. Mapa de la amplificación y restricción de la secuencia correspondiente al gen de la beta-tubulina de *Trichomonas vaginalis.*

Oligos Fw: 53°C
Amplificado sin cortar: 1162 pb
Amplificado cortado: 901 pb

Oligo Rv: 55°C
Amplificado de Diagnóstico: 107 pb
Sitios de corte: XhoI – CTCGAG / BamHI – GGATCC

Amplificación de las secuencias blanco de cada agente etiológico.

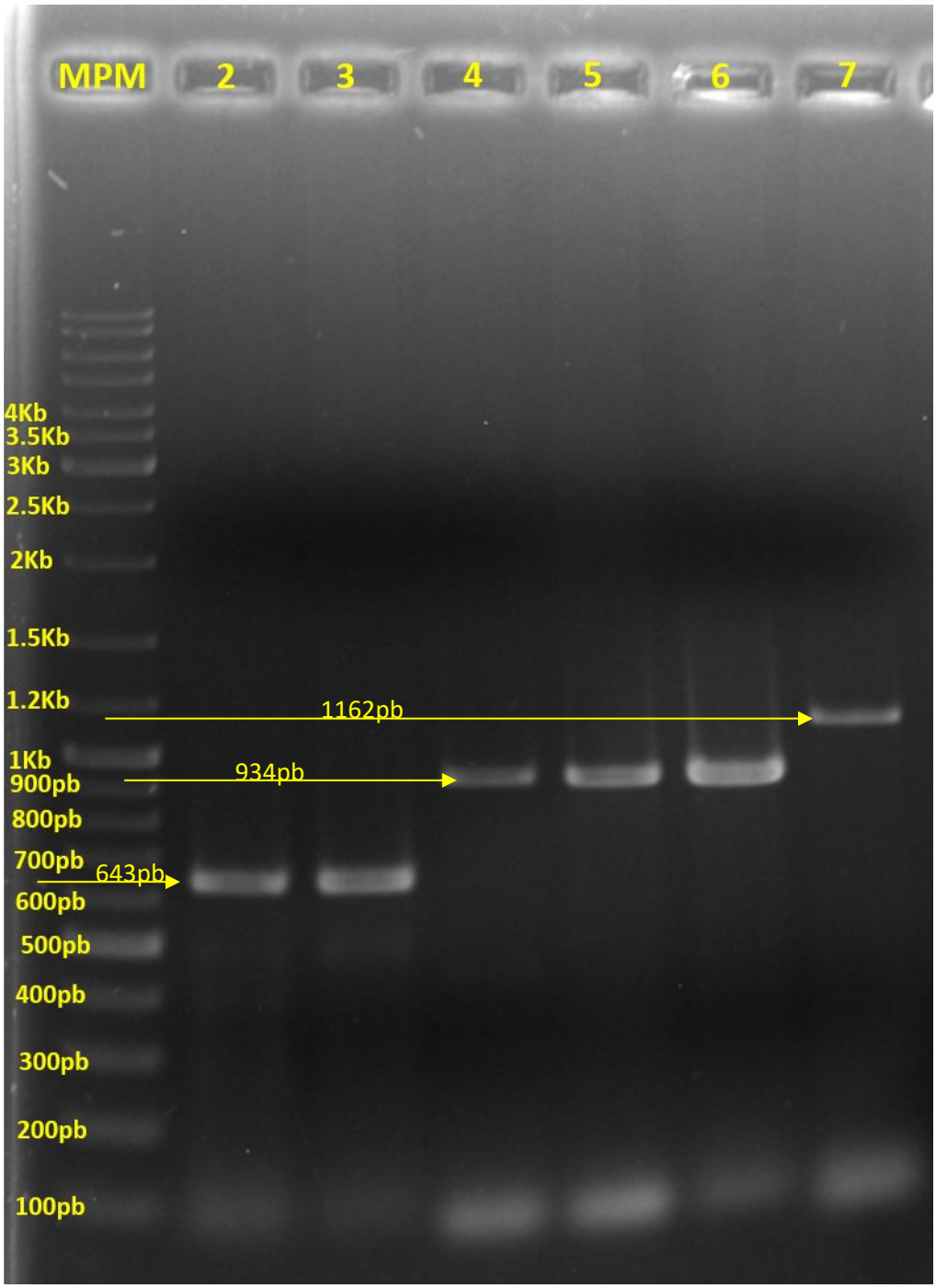


Figura 9. Gel de estandarización de amplificación de los fragmentos de cada microorganismo utilizado en este trabajo.

Carril 1.- MPM, Carril 2.- Gv (cultivo), Carril 3.- Gv (muestra), Carril 4.- Ng (muestra), Carril 5.- Ng (muestra), Carril 6.- Ng (cultivo), Carril 7.- Tv (muestra).

Inserción del fragmento amplificado en un vector de clonación el fragmento.

Para poder insertar los fragmentos de interés en el plásmido pBluescript primero se cultivó el plásmido vacío en las células E.coli TOP10 y se conservó a -20°C hasta que se llevó a cabo la clonación de los fragmentos.

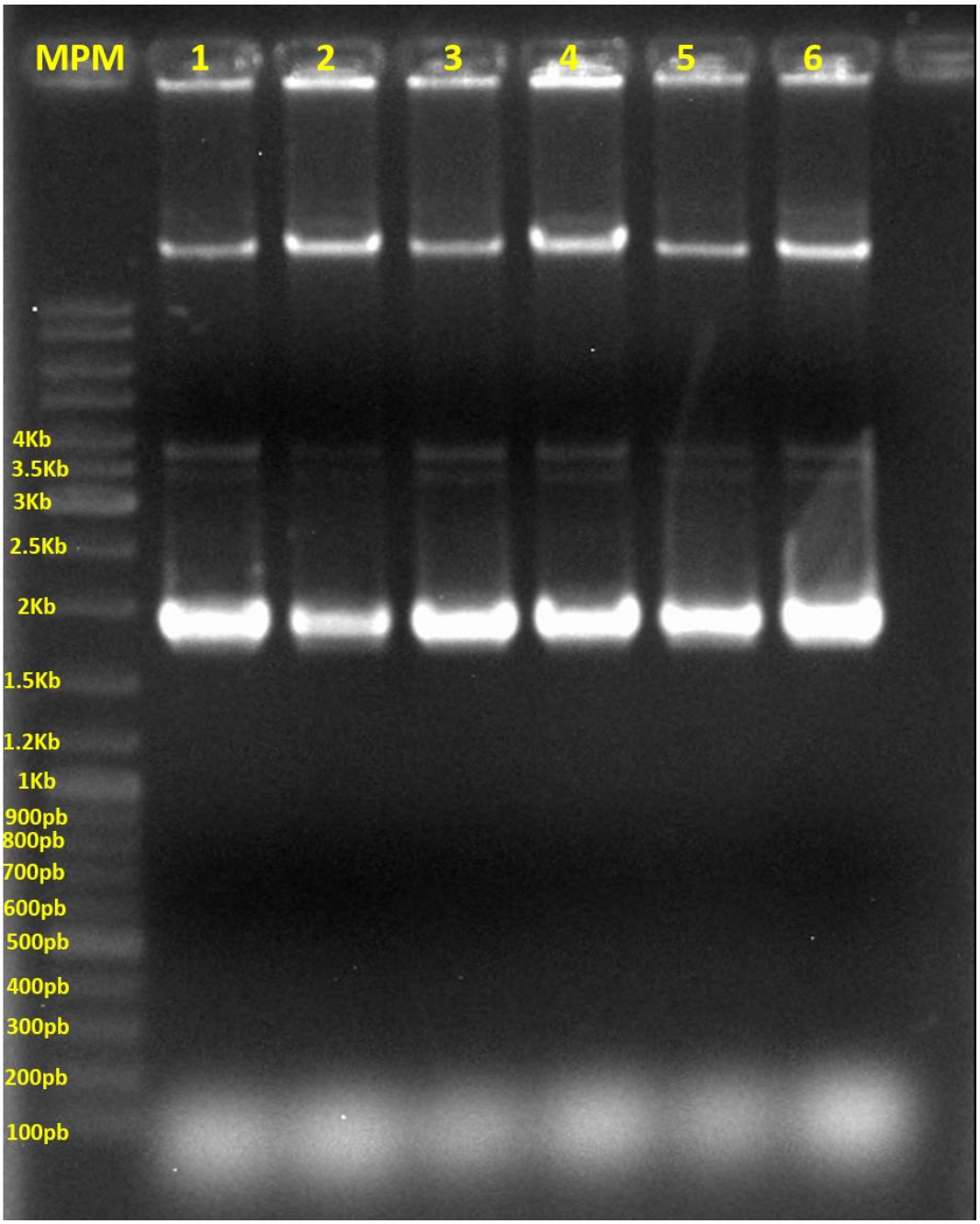


Figura 10.- Gel de agarosa al 1% de las extracciones de plásmido pBluescript KS II (+).

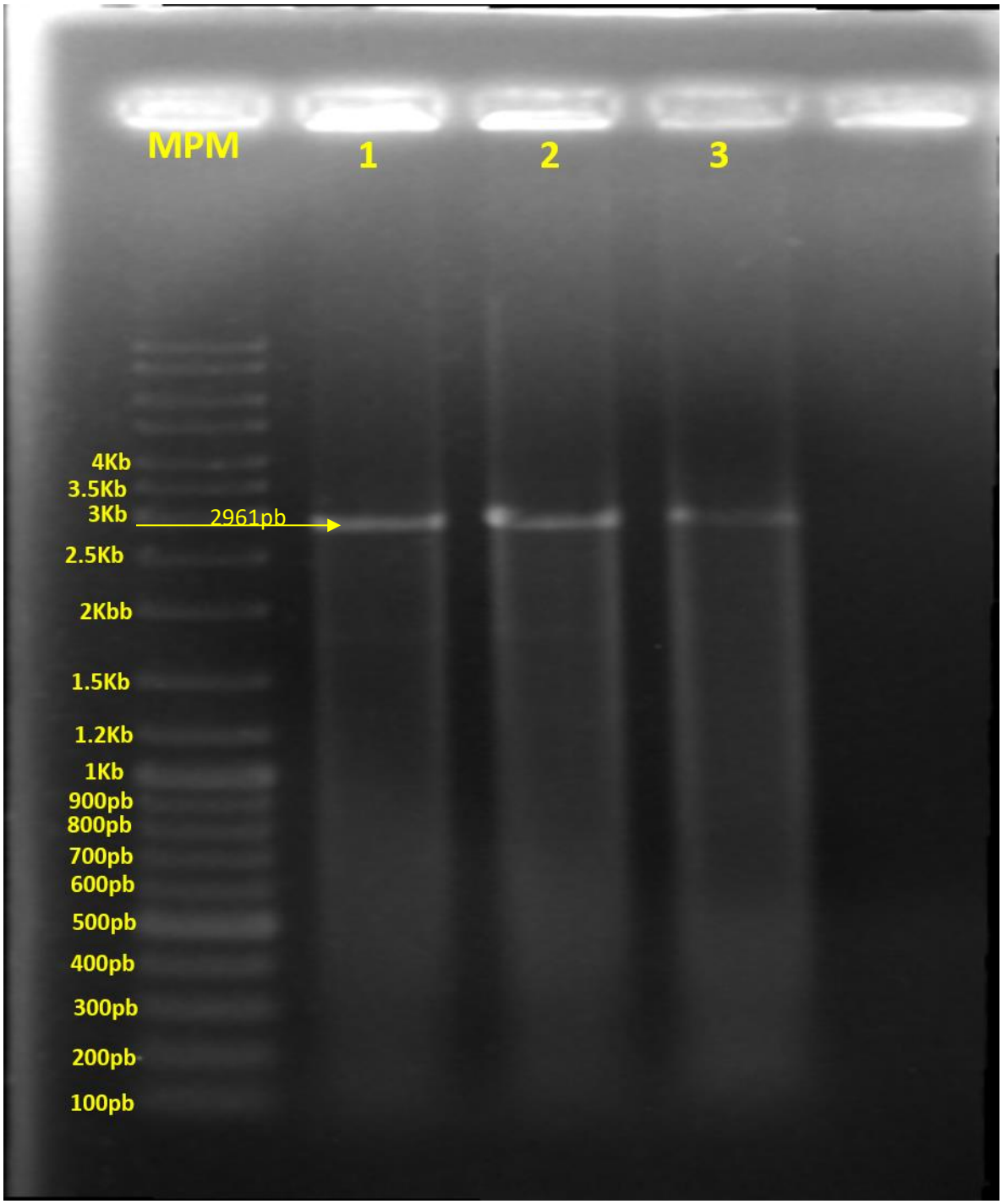


Figura 11.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las extracciones de plásmido restringidas con la enzima EcoRI, una enzima con un solo sitio de corte dentro del plásmido que vuelve lineal al plásmido.

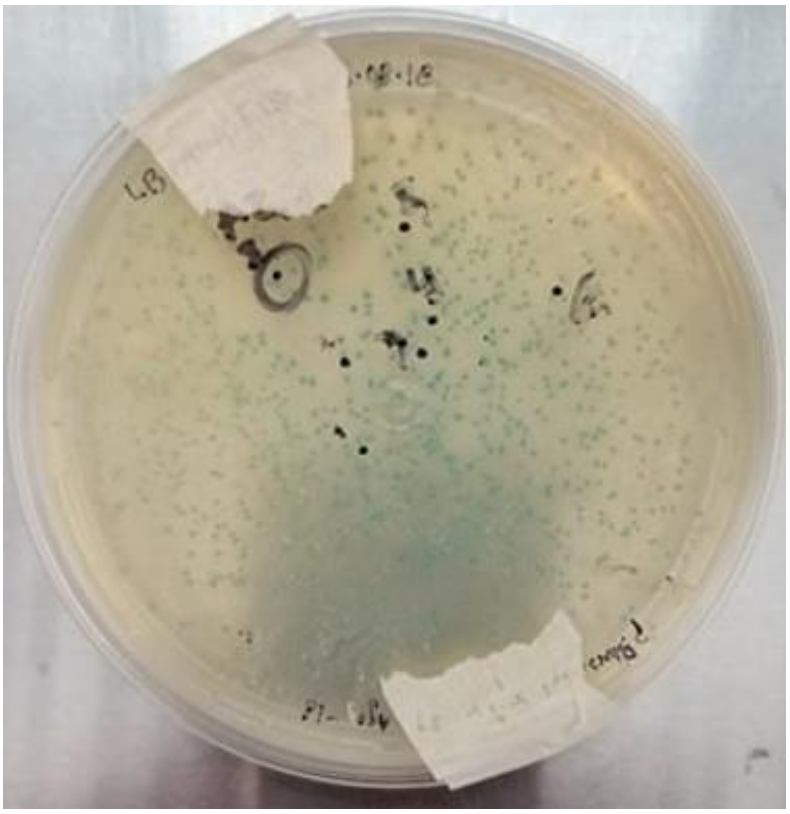


Figura 12. Transformación de células TOP10 + producto de ligación Gv – pBluescript.

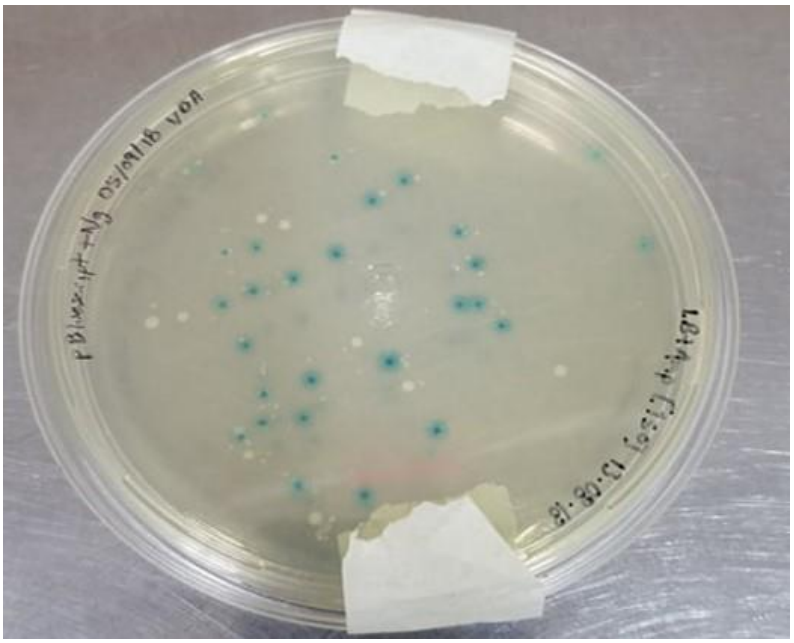


Figura 13. Transformación de células TOP10 + producto de ligación Ng – pBluescript.

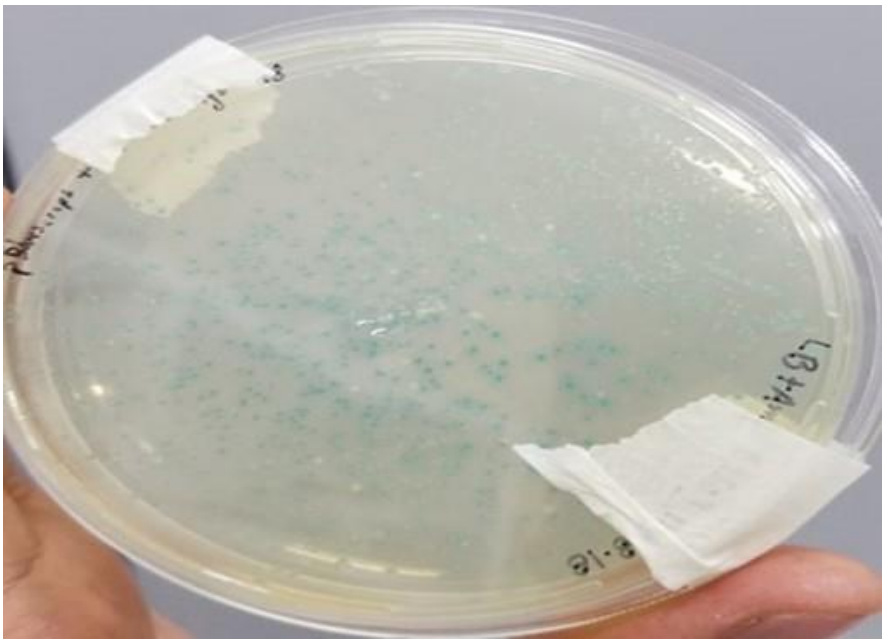


Figura 14. Transformación de células TOP10 + producto de ligación Tv – pBluescript.

Se seleccionaron algunas colonias blancas y otras azules de cada una de las placas para comprobar la clonación de los fragmentos, pero ninguno de los plásmidos mostró diferencia de tamaño (Figura 15).

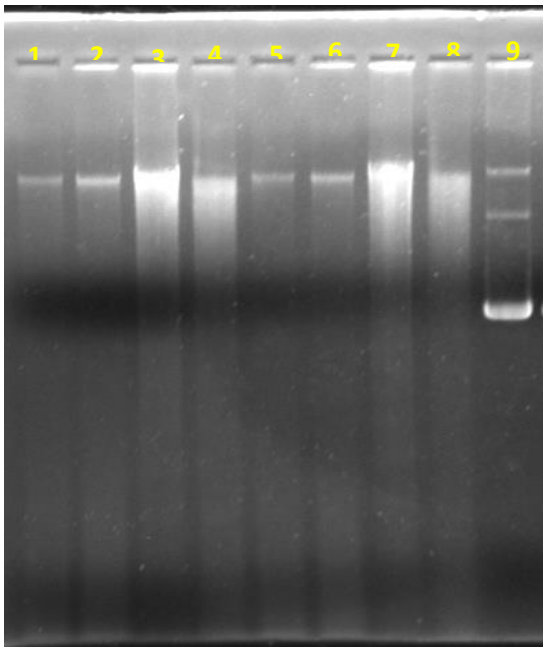


Figura 15. Gel de agarosa de las extracciones plasmídicas de colonias blancas y azules.

Carril 1.- Colonia blanca Gv, Carril 2.- Colonia blanca Gv, Carril 3.- Colonia azul Gv, Carril 4.- Colonia blanca Ng, Carril 5.- Colonia blanca Ng, Carril 6.- Colonia azul Ng, Carril 7.- Colonia blanca Tv, Carril 8.- Colonia blanca Tv, Carril 9.- Colonia azul Tv.

Se realizó una nueva ligación utilizando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase para amplificar los mismos fragmentos de interés directamente como extremos romos (tabla 6).

En el caso del plásmido, fue digerido con la enzima Eco32I dado que tiene un solo sitio de corte (Figura 2) y dicho corte genera extremos romos.

Se llevaron a cabo las ligaciones y las transformaciones de éstas utilizando las metodologías ya descritas. Se sembraron en placa de Agar LB - Amp [100mg/mL] – Xgal [50mg/mL], obteniendo los siguientes resultados:

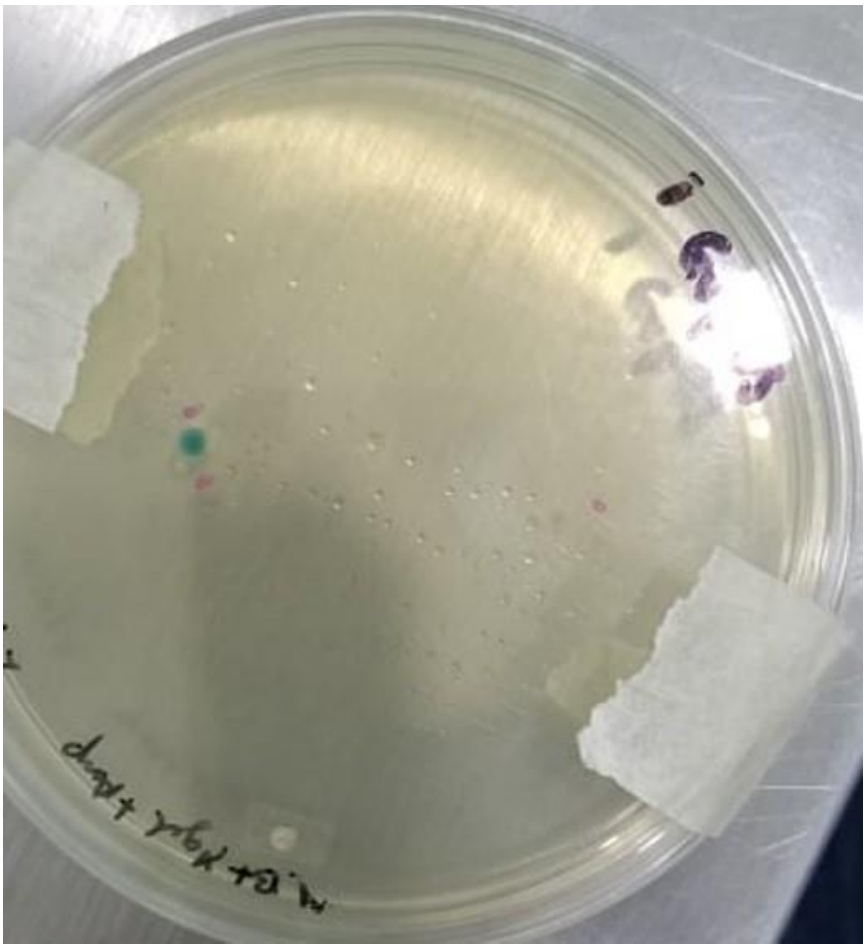


Figura 16. Transformación de células TOP10 + producto de ligación con extremos romos Gv – pBluescript.

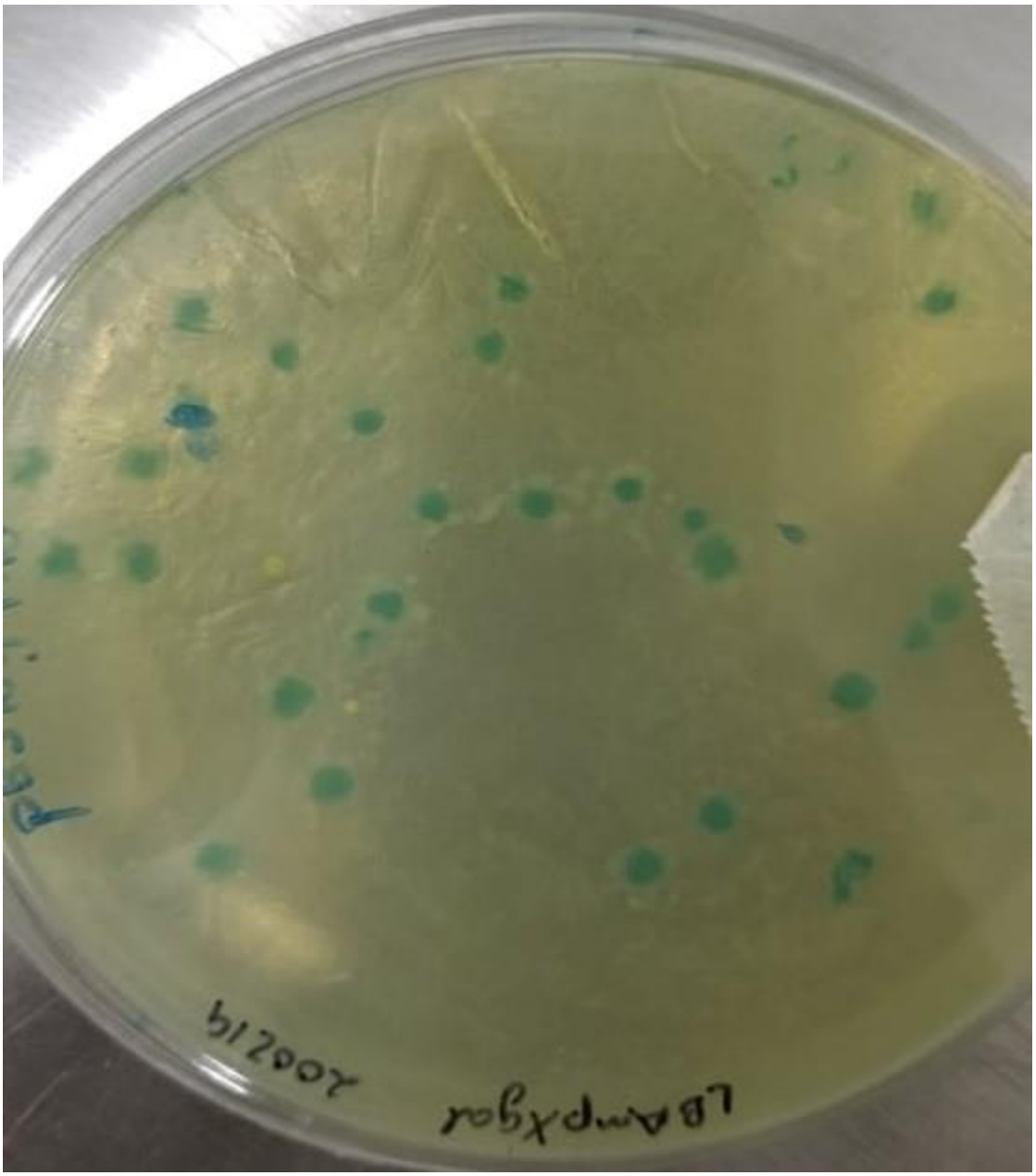


Figura 17. Transformación de células TOP10 + ligación de extremos romos Ng – pBlueScript.

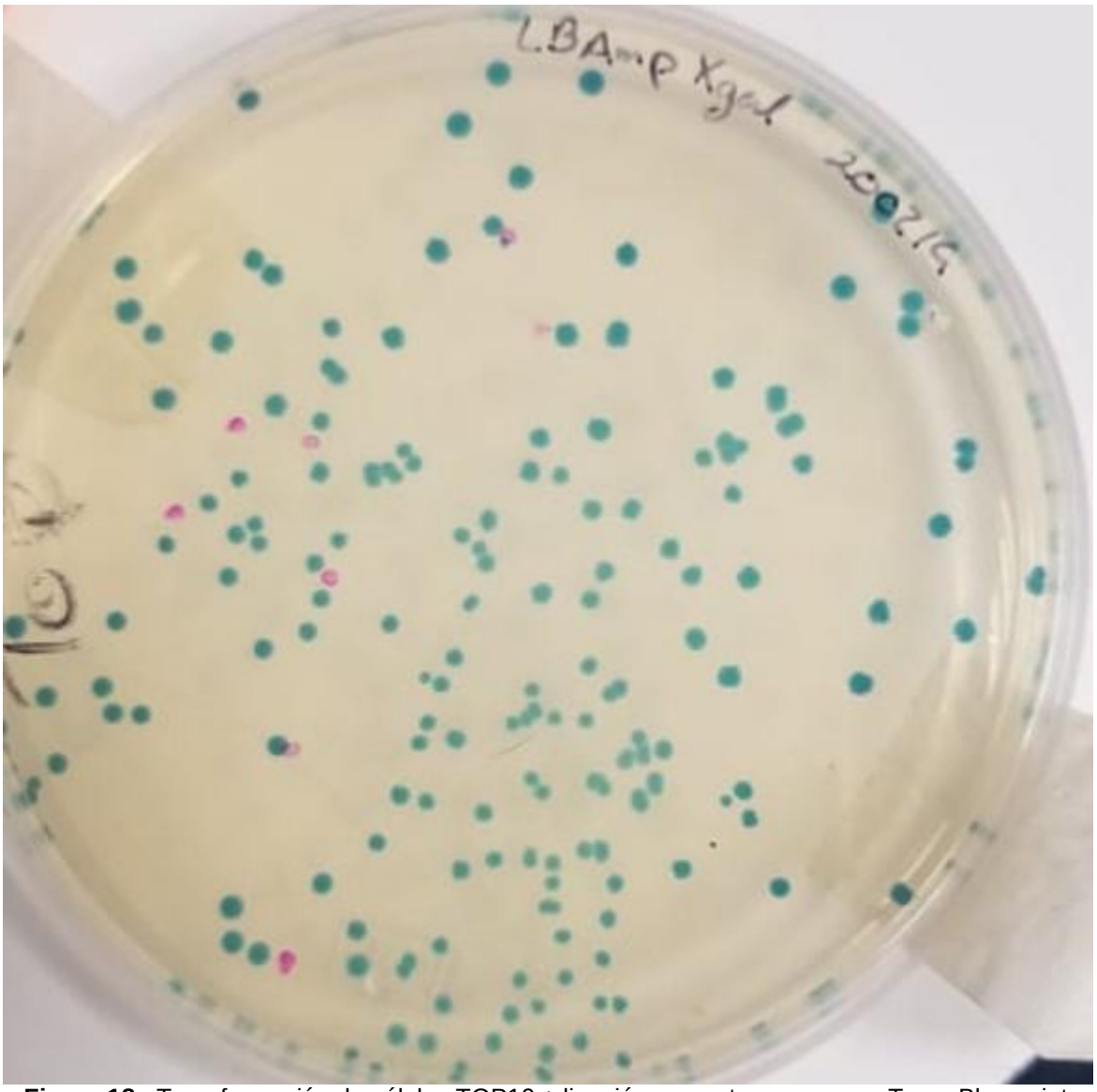


Figura 18. Transformación de células TOP10 + ligación con extremos romos Tv – pBluescript.

Se seleccionaron algunas colonias blancas y se tomaron otras azules de cada placa para comparar el perfil del plásmido mediante electroforesis; sin embargo, solo se evaluó la colonia de la placa Ng – pBluescript (Figura 17) debido a que su crecimiento no era en forma de satélite como las colonias blancas de las otras dos placas (Figuras 16 y 18).

Se realizó una resiembra en placa de la colonia blanca de la placa Ng – pBluescript para conservarla antes de realizar la extracción de plásmido Figura.

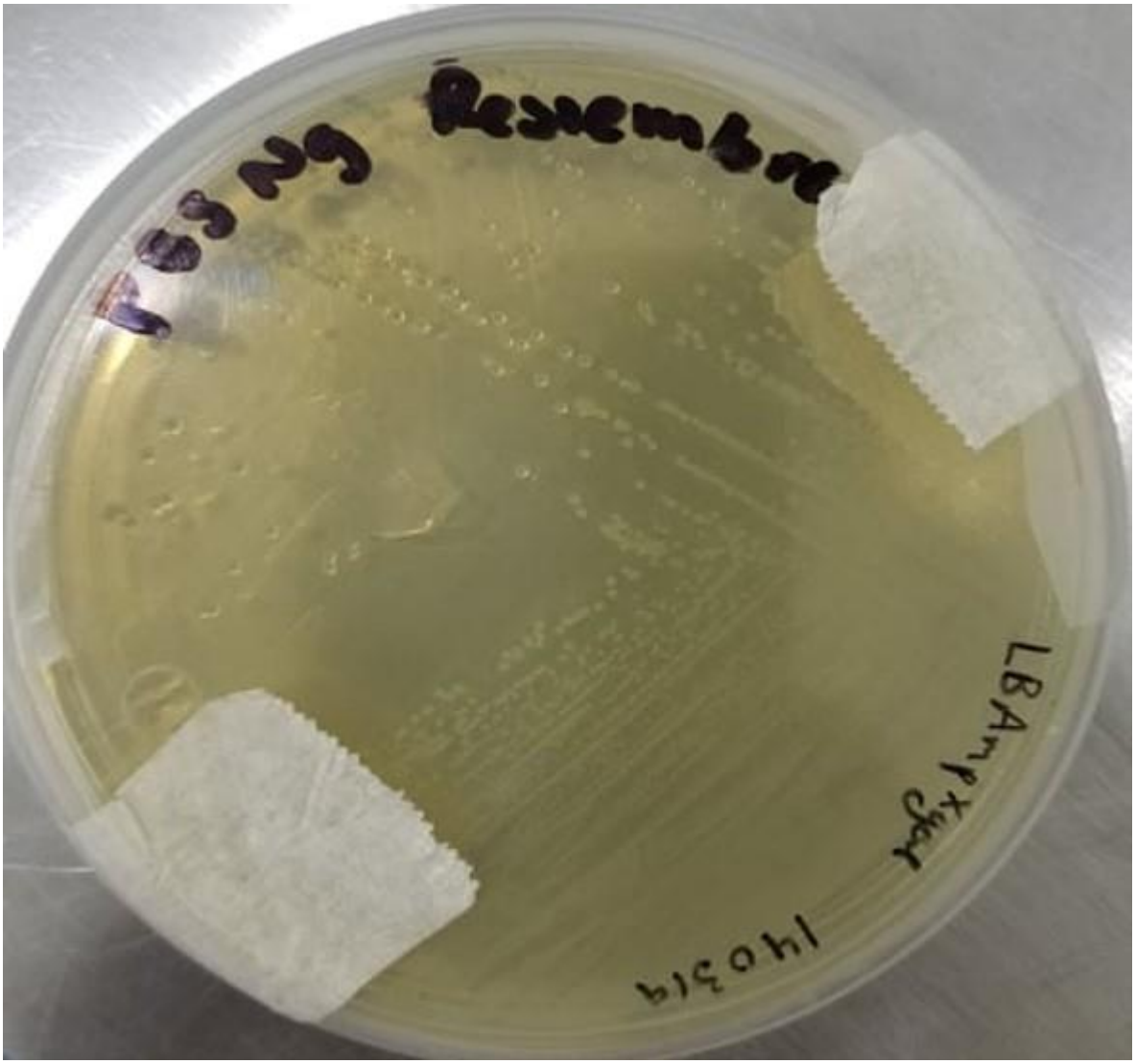


Figura 19. Resiembra de la colonia blanca crecida en la placa utilizada para sembrar la transformación de células TOP10 + producto de ligación con extremos romos Ng – pBluescript.

Luego de visualizar mediante electroforesis las extracciones de plásmido de la placa de *Neisseria*, se pudo observar un cambio en el tamaño del plásmido de la colonia blanca respecto al de las colonias azules (Figura 19).

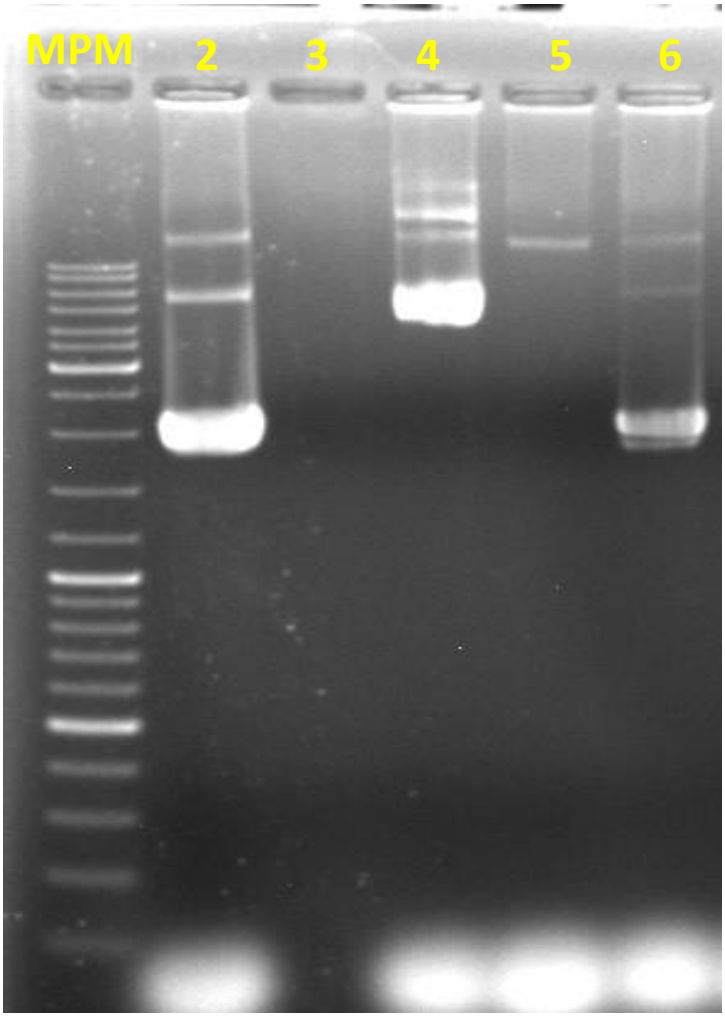


Figura 20. Gel de agarosa al 1% de las extracciones plasmídicas de la placa Ng – pBluescript.

Carril 1.- MPM, Carril 2.- Control de Extracción pBluescript, Carril 3.- Espacio, Carril 4.- Colonia blanca Ng, Carril 5.- Colonia azul Ng, Carril 6.- Colonia azul Ng.

Con este resultado se realizaron las pruebas de confirmación:

- Amplificación del sitio de multiclonación (MCS) utilizando los oligonucleótidos universales M13.
- Amplificación de la región utilizada en la mPCR desarrollada en el Centro de Detección Biomolecular.
- Restricción de los plásmidos con enzimas específicas.
- Secuenciación del fragmento amplificado con los oligonucleótidos universales M13.

Además, junto con las pruebas de confirmación de la clonación se realizó un modelamiento *in silico* del plásmido pBluescript con el fragmento insertado en el sitio de corte utilizado (Figura 21).

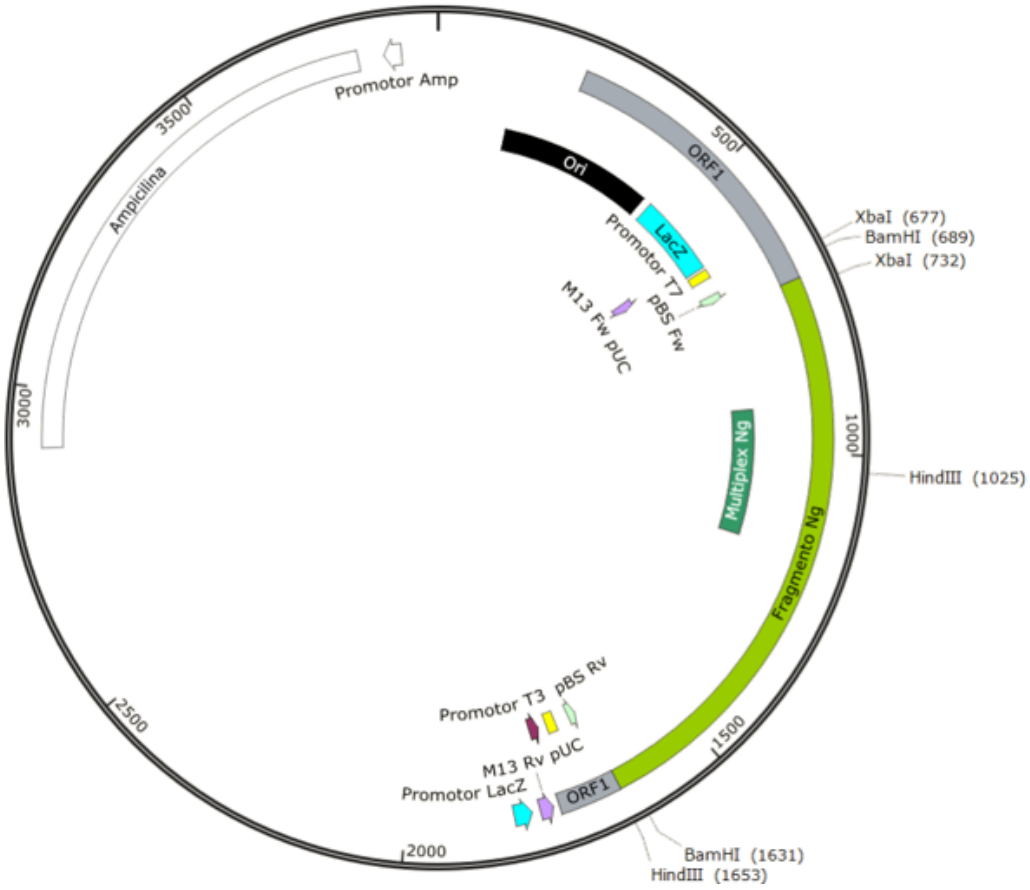


Figura 21. Modelo ideal i*n silico* del plásmido pBluescript con el fragmento de *Neisseria gonorrhoeae* clonado en el sitio de multiclonación por medio de extremos romos.

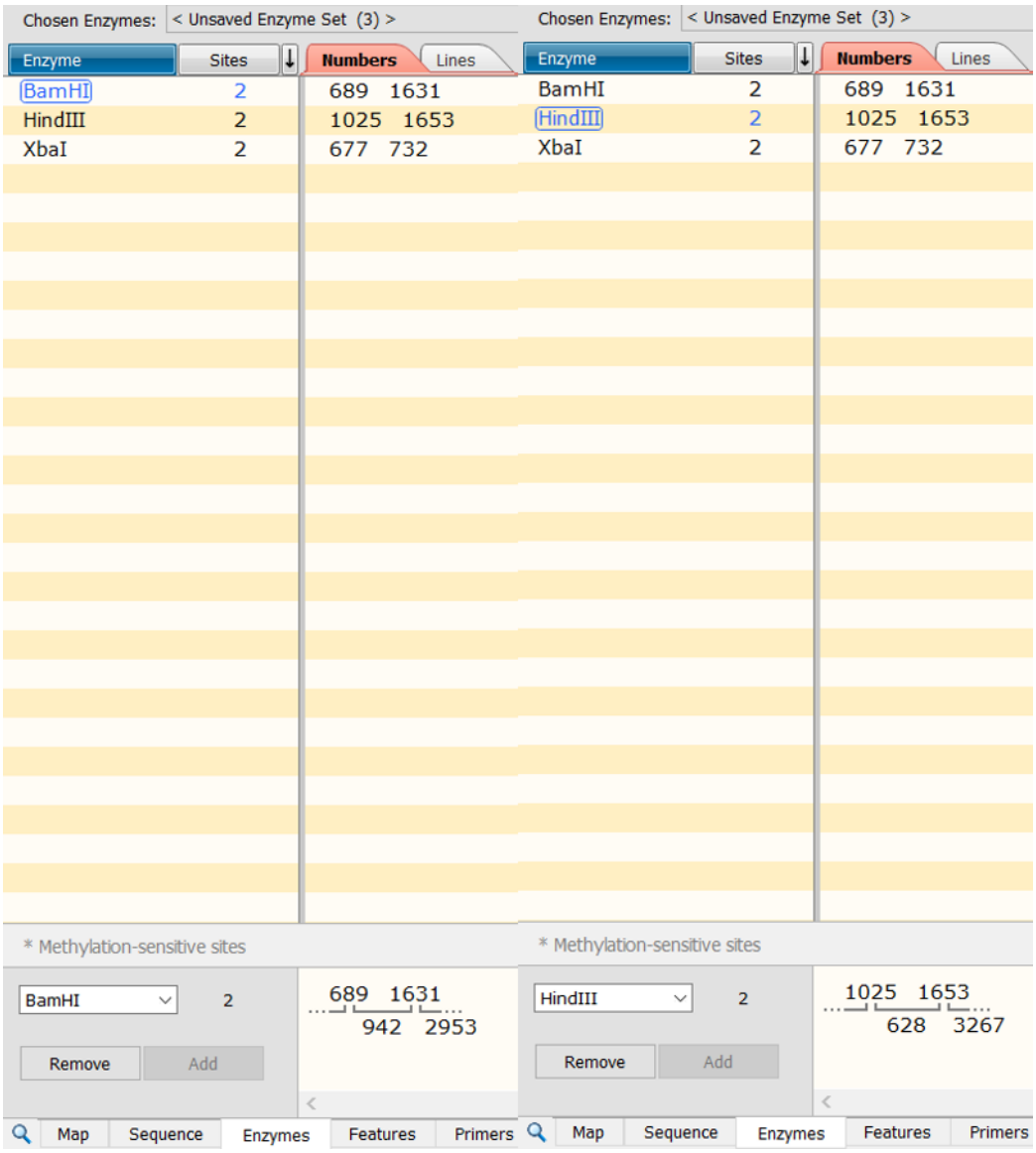


Figura 22. Análisis in silico de las enzimas de restricción óptimas para realizar la comprobación de la clonación del fragmento con base en el modelo in silico expuesto anteriormente. En la parte superior de la imagen se muestran en azul las enzimas que se utilizaron y, en seguida, las posiciones de los sitios de reconocimiento para cada una. En la parte inferior de la imagen, a la derecha y al centro, se muestran nuevamente los sitios de reconocimiento de cada una de las enzimas e inmediatamente debajo de las posiciones se muestra el tamaño del fragmento resultante luego de haber realizado los cortes.

.

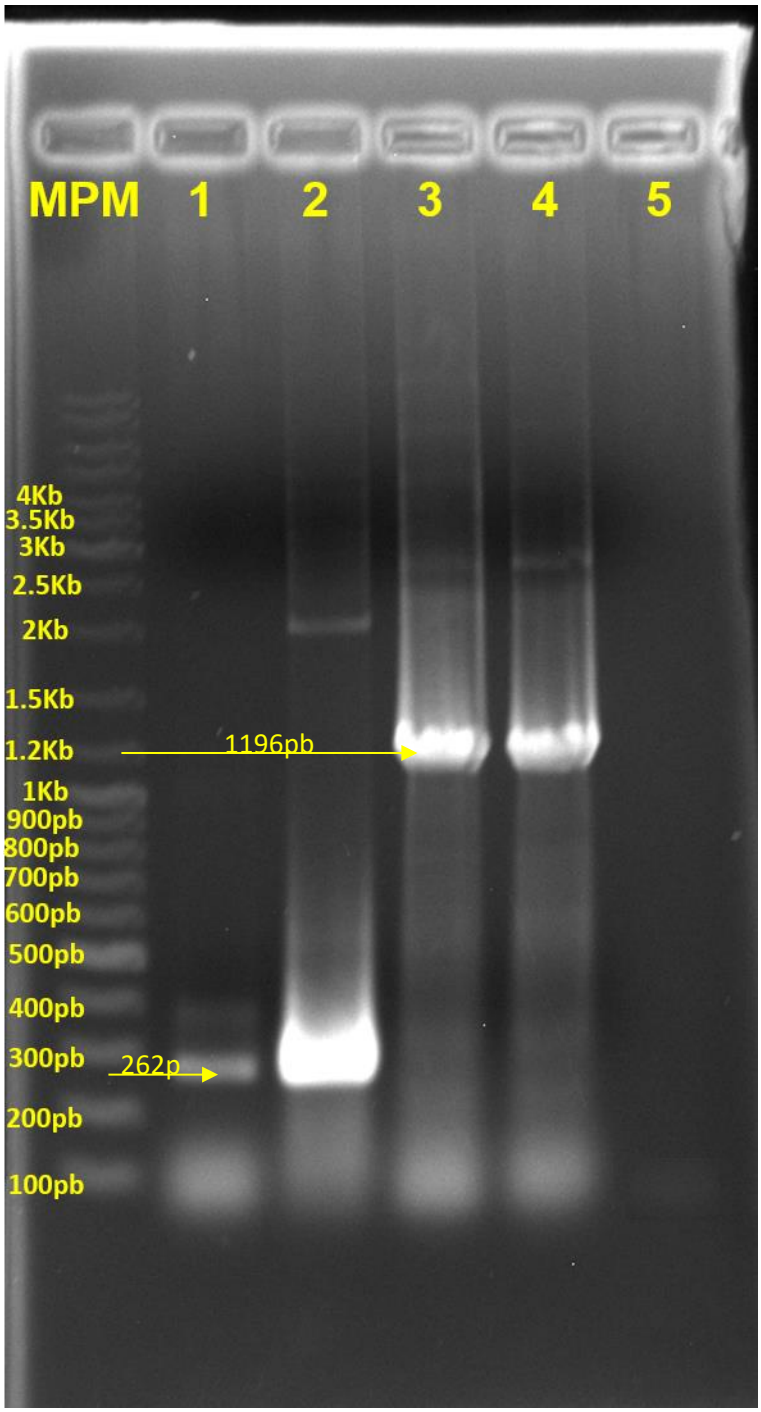


Figura 23. Gel de electroforesis para visualizar la amplificación del sitio de multiclonación (MCS) utilizando los oligonucleótidos universales M13.

MPM, Carril 1.- pBluescript control, Carril 2.- Ng - pBluescript (colonia azul), Carril 3.- Ng – pBluescript (colonia blanca 1), Carril 4.- Ng - pBluescript (colonia blanca 2), Carril 5.- NTC oligonucleótidos M13.

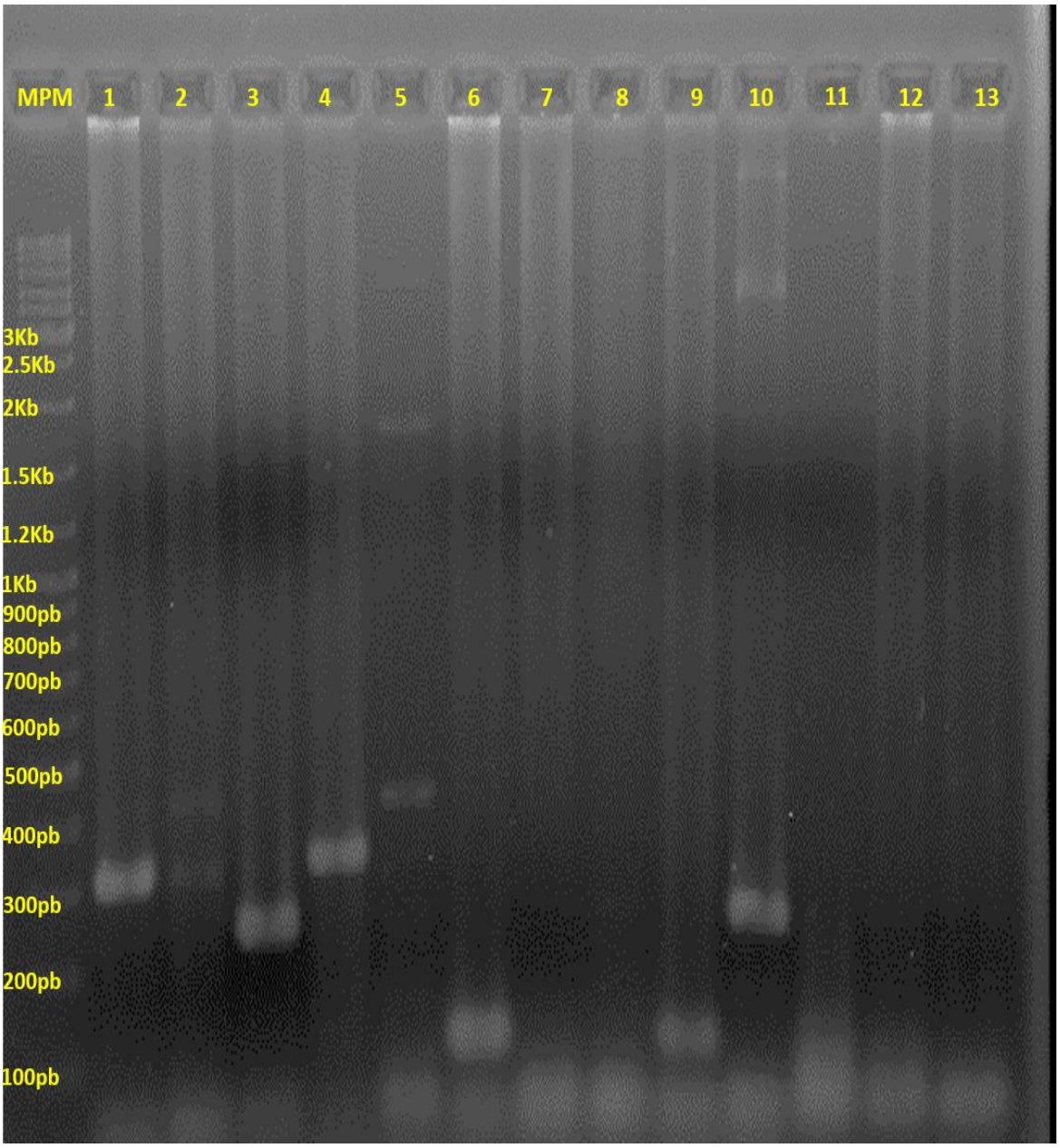


Figura 24. Gel de electroforesis para visualizar la amplificación del fragmento evaluado en la PCR Multiplex para la identificación de *Neisseria gonorrhoeae*. Carril 1- 9 se cargan muestras de VPH, en seguida:

Carril 10.- Control Positivo Ng (plásmido recombinante), Carril 11.- NTC Ng, Carril 12.- Muestra 125 (Negativa), Carril 13.- Muestra 126 (Negativa).

Banda esperada: 247pb.

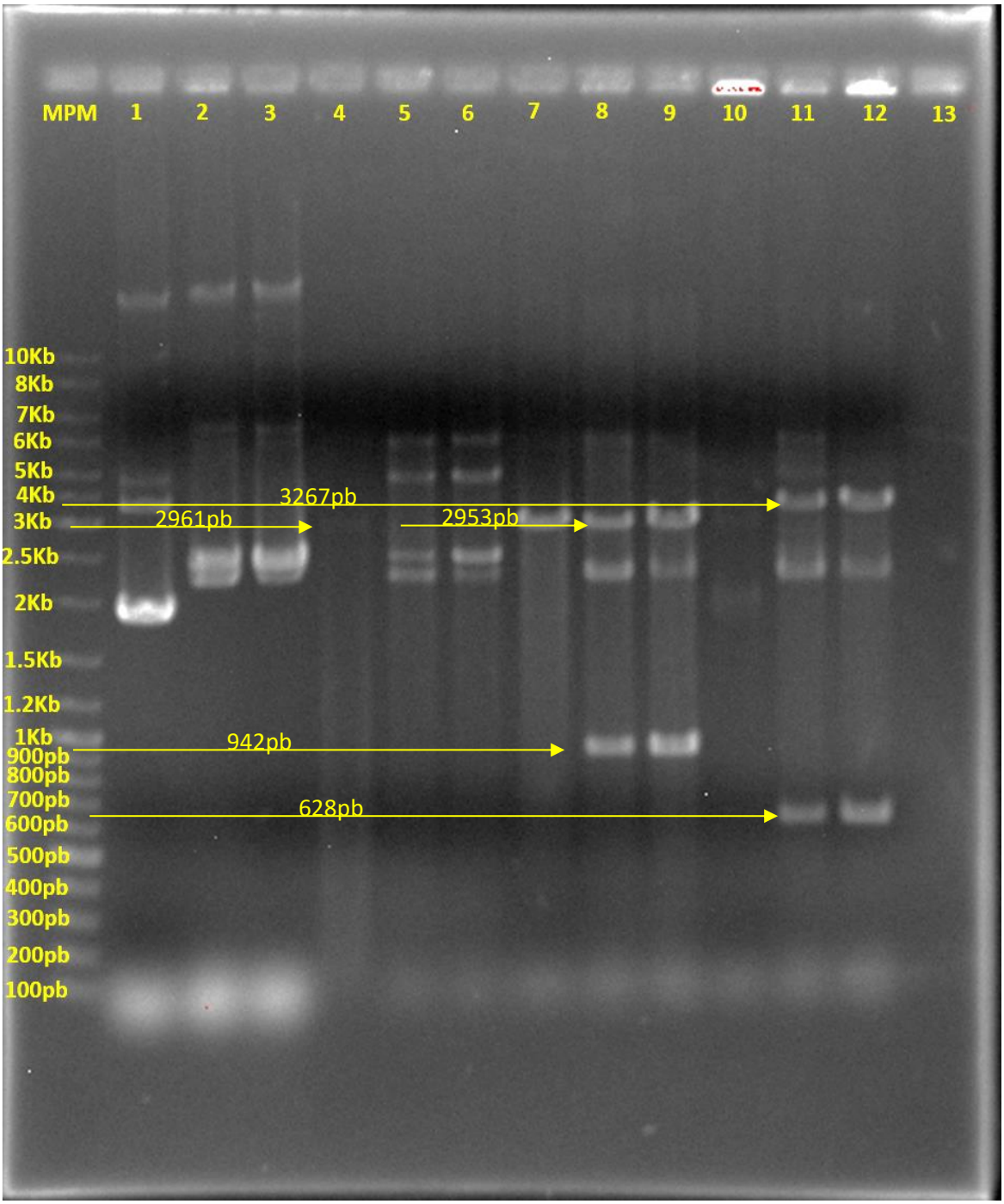


Figura 25. Gel de electroforesis de las diferentes restricciones de los plásmidos extraídos.

MPM
1.- Ng - pBluescript colonia azul
2.- Ng - pBluescript (colonia blanca 1)
3.- Ng – pBluescript (colonia blanca 2)
4.- Ng - pBluescript + Eco32I (colonia azul)
5.- Ng – pBluescript + Eco32I (colonia blanca 1)
6.- Ng – pBluescript + Eco32I (colonia blanca 1)
7.- Ng - pBluescript + BamHI(colonia azul)
8.- Ng - pBluescript + BamHI (colonia blanca1)
9.- Ng - pBluescript + BamHI (colonia blanca2)
10.- Ng - pBluescript + HindIII (colonia azul)
11.- Ng - pBluescript + HindIII (colonia blanca 1)
12.- Ng - pBluescript + HindIII (colonia blanca 2)

Validación de resultados por medio de secuenciación.

Figura 26. Resultados de la secuenciación del fragmento del gen de *Neisseria gonorrhoeae* clonado en el vector pBlueScript. En la esquina superior derecha de la imagen se muestra el número de bases que abarca la lectura de la secuenciación.

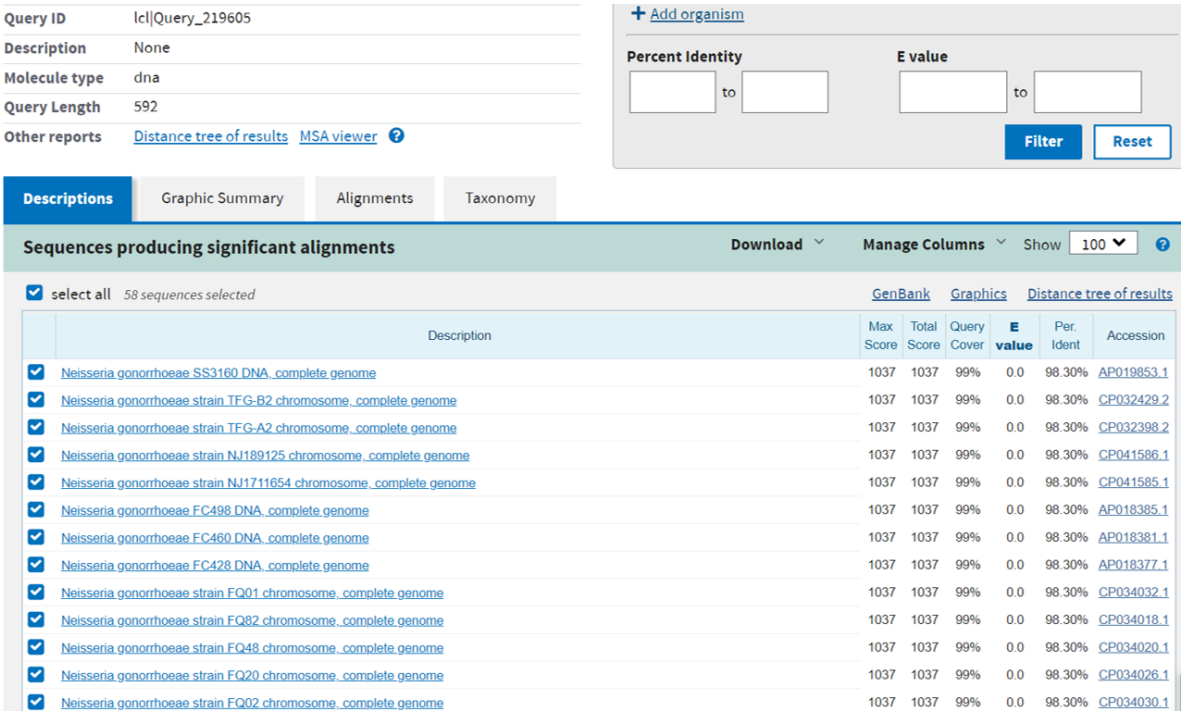


Figura 27. Resultados del alineamiento del fragmento de gen de *Neisseria gonorrhoeae* secuenciado utilizando la herramienta BLAST del NCBI.

Nueva transformación del fragmento de *Gardnerella vaginalis.*

Se realizó una nueva ligación y transformación con el fragmento de *Gardnerella vaginalis amplificado* con la enzima High – Fidelity Phusion Taq y el pBluescript utilizando la misma estrategia de clonación empleada para clonar el fragmento de *Neisseria gonorrhoeae.*

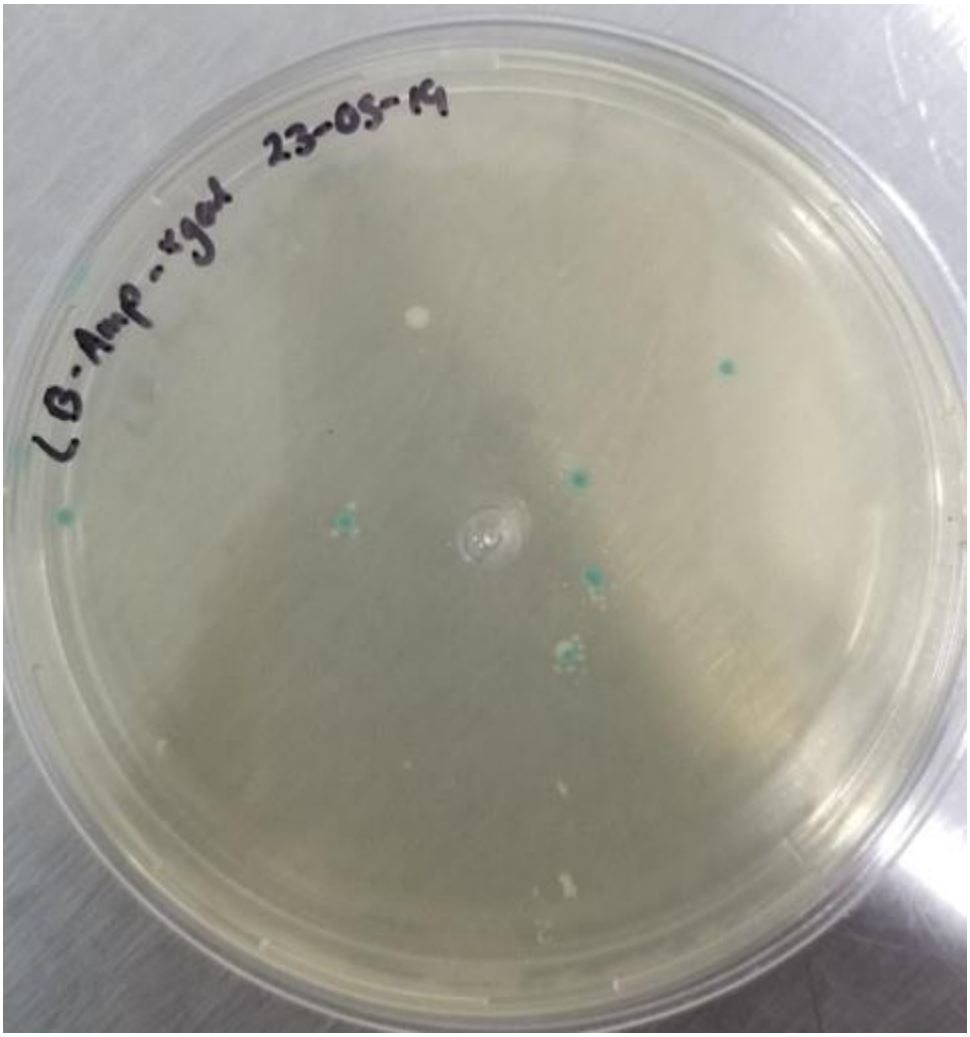


Figura 28. Nueva transformación de células TOP10 + producto de ligación Gv – pBluescript.

Se obtuvo una colonia blanca de la placa de Gv – pBluescript (Figura 28) la cual fue visualizada utilizando la misma estrategia empleada con la clona correspondiente a *Neisseria gonorrhoeae*.

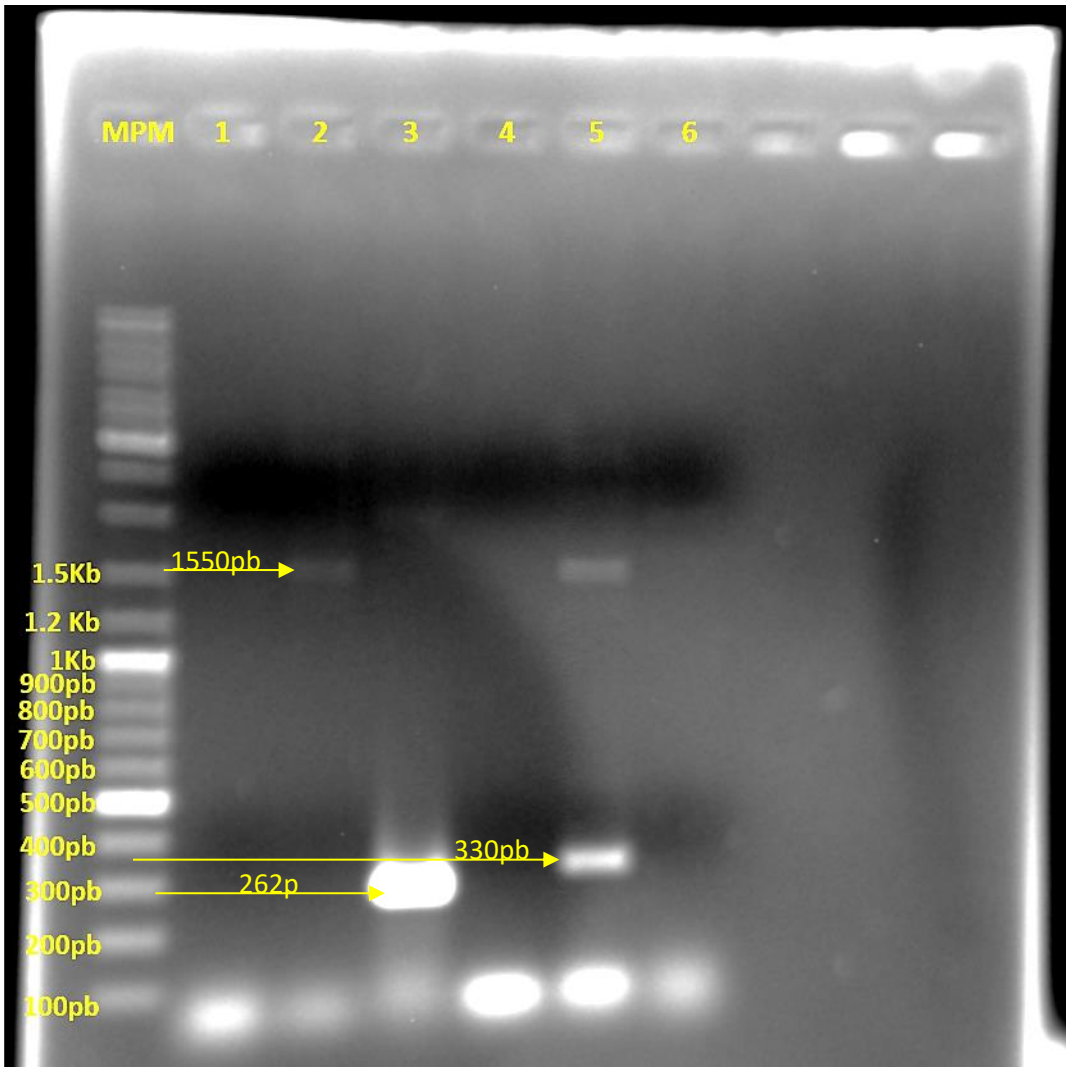


Figura 29. Gel de electroforesis del fragmento evaluado en la PCR Multiplex para la identificación de *Gardnerella vaginalis* y del MCS con oligonucleótidos M13.
MPM, Carril 1.- NTC M13, Carril 2.- M13 plásmido recombinante, Carril 3.- M13 plásmido sin modificar, Carril 4.- NTC oligonucleótidos de diagnóstico, Carril 5.- Diagnóstico plásmido recombinante, Carril 6.- Diagnóstico plásmido sin modificar.
Banda esperada oligonucleótidos M13: 900 pb.
Banda esperada oligonucleótidos diagnóstico: 330 pb.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Falsos positivos en las primeras placas.

Tomando en cuenta que las colonias azules representan indirectamente la producción de beta-galactosidasa y las colonias blancas la ausencia de ésta, podemos asegurar que las colonias blancas contienen plásmidos con la inserción del fragmento de interés; sin embargo, en los primeros intentos de clonación se registró la presencia de colonias blancas cuyo vector estaba vacío en las placas de las transformaciones de los 3 organismos (Figuras 12, 13 y 14).

Los plásmidos se extrajeron y se visualizaron por electroforesis para verificar algún cambio en sus tamaños, pero todos presentaron el mismo perfil que los plásmidos de las colonias azules utilizados como control (Figura 15).

Una posible explicación para estos resultados es que los fragmentos a clonar no se cortaron debido a la cercanía de los sitios de corte con los extremos de las secuencias. Las enzimas de restricción necesitan cierto número de bases en los extremos de las secuencias para que éstas puedan anclarse y realizar el corte necesario (New England BioLabs, 2018) y, al no cumplir con este requisito, se pudo haber favorecido la religación del vector lineal haciendo uso de sus extremos compatibles sin insertar la secuencia de interés; sin embargo, esta teoría no explica por qué las colonias resultantes eran de color blanco.

Otra posible explicación es que las secuencias se cortaran de manera efectiva, provocando la liberación de un fragmento pequeño (de unas 4-6 bases) complementario con los extremos abiertos del plásmido. Aun insertando esa cantidad tan pequeña de bases en el gen de la beta-galactosidasa es posible que el marco de lectura pueda verse alterado y provocar la supresión de la traducción de la proteína, resultando en la obtención de colonias blancas que, al ser evaluadas, no presentaban la inserción del fragmento de interés.

Clonación con extremos romos y no con cohesivos.

Luego de varios intentos de clonación fallidos utilizando los fragmentos y el plásmido restringidos con enzimas de corte cohesivo, se propuso la idea de clonar utilizando extremos romos.

La clonación por extremos romos tiene muchas desventajas a considerar, respecto a la clonación utilizando extremos cohesivos, tales como:

- Es de 10 a 100 veces menos eficiente que clonar por extremos cohesivos.
- Por probabilidad, el 50% de las clonas exitosas tienen el inserto incorporado en dirección opuesta.
- Se incrementa la probabilidad de obtener clonas con plásmido religado; es decir, plásmido vacío.

Sin embargo, este tipo de clonación también tiene sus ventajas ya que omitir el paso de restricción en los fragmentos se vuelve significativamente más rápida y, además, es menos probable disminuir la concentración de ADN de la muestra en todos los procesos de corte y purificación.

Se utilizó la misma técnica de amplificación con la que se hicieron los cortes cohesivos anteriormente; sin embargo, los amplificados no se cortaron para conservar los extremos romos y solo se pasaron por un proceso de purificación por columna.

De los 3 amplificados para trabajar solo se purificaron 2 (Gv y Tv) mientras que el amplificado de Ng se clonó directamente de la reacción de PCR. Se midió la concentración de ADN de los 3 fragmentos de clonación y se realizó una nueva ligación con una relación 3:1 inserto:vector, se dejaron incubando a 8°C toda la noche y transformaron al día siguiente. Se plaquearon en Agar LB - Amp [100mg/mL] – Xgal [50mg/mL].

Colonia blanca solo de *Neisseria gonorrhoeae*.

Luego de sembrar en placa las bacterias transformadas y dejar incubando a 37°C toda la noche, se registró crecimiento de bacterias en las tres placas. En la placa donde se sembró la transformación del fragmento de *G. vaginalis* solo creció una colonia azul y un par de colonias blancas (Figura 16), en la transformación del fragmento de *N. gonorrhoeae* crecieron colonias azules y una blanca (Figura 17), y en la de *T. vaginalis* la mayoría de las colonias fueron azules (Figura 18); sin embargo, aunque se logró el crecimiento de colonias blancas en las 3 placas se decidió descartar las colonias con características similares a las colonias satélites.

Las colonias satélites son colonias muy pequeñas de bacterias que no lograron tomar el plásmido en el proceso de transformación, y que crecen en un radio cercano a las colonias que sí lograron tomarlo. Estas colonias satélites se forman debido a que la beta-lactamasa liberada por las bacterias debidamente transformadas degradan la ampicilina que se encuentra a su alrededor. La ampicilina es comúnmente utilizada como un marcador de selección para plásmidos usados para clonación de genes y expresión de proteínas en algunas bacterias. La base de la selección por medio de ampicilina es la hidrólisis e inactivación del antibiótico por medio de la beta-lactamasa, la cual es secretada por la bacteria que ha ganado el plásmido que incluye la resistencia. El resultado es un conglomerado de beta-lactamasa extracelular y que inactiva el antibiótico presente en el medio de cultivo, removiendo la presión de selección por el mismo.

Tomando en cuenta estas consideraciones se evaluó la colonia blanca de la placa Ng – pBluescript (Figura 17), debido a que era una colonia grande aislada del resto de colonias azules a diferencia de las colonias blancas de las otras placas.

A pesar de que todas las ligaciones y transformaciones se hicieron siguiendo el mismo protocolo y utilizando los mismos materiales, consideramos que la razón por la cual en la de *Neisseria* creció y en las demás no, es por la concentración a la cual se encontraba el fragmento insertado.

Bandas extra en la comprobación por restricción

Luego de extraer el plásmido clonado exitosamente con el fragmento del gen de *Neisseria gonorrhoeae*, se sometió a algunas pruebas de restricción para poder comprobar por completo la presencia fragmento mediante perfiles de restricción; sin embargo, las bandas obtenidas en el corrimiento electroforético no coincidieron con el perfil esperado.

En las restricciones de los plásmidos realizadas con *BamHI* y con *HindIII* (Figura 25) podemos apreciar una banda a la altura de 2300 – 2500 pb que no debería aparecer ahí puesto que la suma de los pesos de cada una de las bandas dentro de un mismo carril sería de 6195pb; es decir, sobrepasaría el tamaño esperado del plásmido extraído (3895 pb) (Figuras 21 y 22). La razón por la cual suponemos que hay bandas no correspondientes al perfil de restricción es la concentración a la que está el plásmido extraído.

Las concentraciones de las extracciones por método casero son mayores a las realizadas por medio de kits de extracción, por lo que se necesita mayor cantidad de enzimas para poder procesar el ADN de interés; por lo tanto, nuestros plásmidos están tan concentrados que no fue suficiente la cantidad de enzima que se agregó en las reacciones de restricción que preparamos.

Comprobación de la clonación de *Gardnerella vaginalis*

Como podemos ver en el análisis *in silico* realizado para *Gardnerella vaginalis*, el fragmento amplificado por PCR para la clonación de éste es de 643 pb (Figura 6). Dicho número de bases, junto con las amplificadas por los oligonucleótidos M13 -correspondientes al MCS-, nos da un total de 875 pb; sin embargo, la banda que podemos observar en el gel de electroforesis de comprobación es de 1,500 pb aproximadamente (Figura 29).

Lo que nosotros proponemos como explicación a la obtención de una banda de tamaño superior al esperado es la unión de dos fragmentos de *Gardnerella vaginalis* al momento de realizar la ligación, resultado en una "doble" ligación. Teniendo dos fragmentos de Gv, nos daría un total de 1,286 pb (643x2) más las bases adicionales del MCS, un total de 1,548 pb (1286pb + 262pb).

Orientación de los fragmentos clonados para *G. vaginalis*

Dado que la estrategia de clonación seguida fue la clonación de fragmentos con extremos romos, la posibilidad de que el fragmento quede en sentido 3' → 5' es del 50%. Ahora bien, el hecho de que se hayan clonado dos fragmentos iguales en el caso de *Gardnerella vaginalis* implica que existen hasta 4 maneras diferentes de que los fragmentos hayan sido integrados al plásmido.

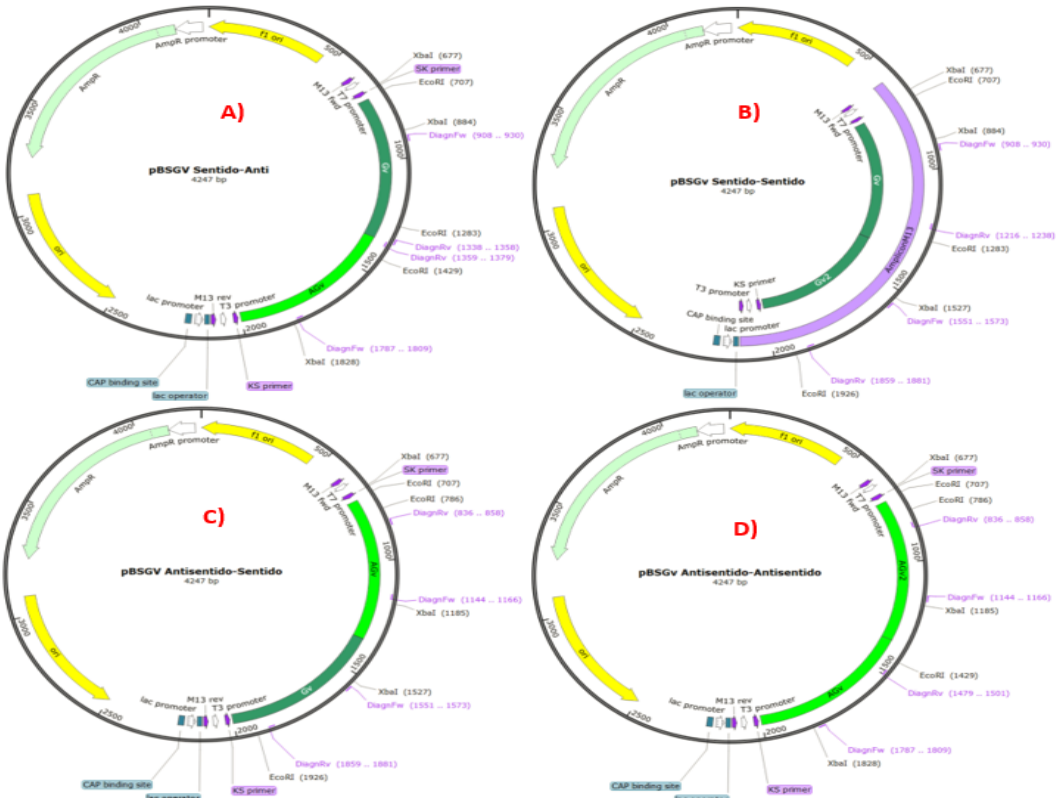


Figura 30. De izquierda a derecha: A) AntiGV – Gv; B) Gv – Gv; C) Gv – AntiGv; D) AntiGv – AntiGv. Análisis *in silico* de los mapas del vector pBluescript representando cada una de las 4 posibilidades de inserción del fragmento de *Gardnerella vaginalis.*
Fragmento orientado de 3' a 5'.
Fragmento orientado en "antisentido".

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se logró el diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de tres fragmentos de interés identificados con ayuda de la herramienta BLAST pertenecientes a tres diferentes organismos: *Gardnerella vaginalis, Neisseria gonorrhoeae y Trichomonas vaginalis*, lo que nos permitió realizar la clonación y alcanzar el objetivo de fabricar controles positivos para diagnóstico de dos de los tres microorganismo planteados al inicio de este trabajo: *Gardnerella vaginalis y Neisseria gonorrhoeae.*

Es importante remarcar que aún quedan tareas por realizar como la identificación del fragmento clonado para *Gardnerella vaginalis* por medio de secuenciación, esclarecer la orientación en la cual se ha clonado y la clonación de la secuencia faltante correspondiente a *Trichomonas vaginalis.*

En primer lugar, para poder realizar la secuenciación del fragmento clonado de *G. vaginalis,* proponemos partir de un producto de PCR utilizando los oligonucleótidos universales M13 para después realizar una extracción de banda desde un gel de agarosa al 0.8% utilizando algún kit comercial.

Para determinar la orientación de ambos fragmentos clonados podemos basarnos en el resultado de la secuenciación ya que el sitio de multiclonación del plásmido es una región conocida y puede ser utilizada como guía. Otra forma para determinar la orientación de los fragmentos clonados es utilizar oligonucleótidos internos que amplifiquen distintas bandas dependiendo de la región en la que hibriden. Una última estrategia es utilizar enzimas de restricción específicas para ciertas regiones de los fragmentos clonados y utilizar el patrón de bandeo resultante para determinar la ubicación del sitio de corte y la orientación.

Por otro lado, para la clonación del fragmento de *Trichomonas vaginalis* proponemos utilizar una muestra fresca que pueda ser recolectada y procesada el mismo día ya que su viabilidad disminuye con el tiempo (Kingston et al., 2003).

Anexos

B1.

Obtención del cultivo de bacterias competentes.

1.- Inocular una colonia de E.coli TOP10 en 5mL de medio LB en un tubo de 50 mL y crecer a 37°C.

2.- Usar 1 mL para inocular 100mL de LB en un matraz de 250mL al siguiente día.

3.- Agitar a 37°C por 1.5 – 3 horas.

Posteriormente, cuando la densidad óptica del cultivo a 600nm sea de 0.4 – 0.6:

4.- Poner las células en hielo por 10 minutos (mantener en frío).

5.- Colectar las células por centrifugación por 3 minutos a 6000 rpm.

6.- Decantar el sobrenadante y resuspender gentilmente en 10mL de una solución que contenga $CaCl_2$ 80mM y $MgCl_2$ 50mM.

7.- Incubar en hielo por 20 minutos.

8.- Centrifugar por 3 minutos a 6000 rpm.

9.- Descartar el sobrenadante y resuspender gentilmente en 5 mL de $CaCl_2$ 50mM.

10.- Repartir en microtubos de 1.5mL con 30% v/v de glicerol y almacenar a -80°C.

Transformación de las células competentes.

1.- Poner 10µL de una reacción de ligación en un microtubo. Adicionar aproximadamente 50µL de células competentes. Nota: En otro tubo, hacer un control negativo con 10µL de agua y 50µL de células competentes.

2.- Incubar 30 minutos en hielo.

3.- Dar un choque de calor por 45 segundos a 42°C.

4.- Poner de vuelta en hielo por 1 minuto.

5.- Agregar 440µL de LB al tubo (para un volumen final de 500µL) e incubar a 37°C por 1 hora.

5.- Plaquear 100 – 200 µL de suspensión celular en medio LB-Amp [100mg/mL].

B2.

Extracción de ADN plasmídico.

Este método propone el uso de 3 soluciones específicas para llevar a cabo la lisis celular, llamadas: solución 1, solución 2 y solución 3.

Tabla 8. Desglosamiento de los ingredientes de cada una de las soluciones utilizadas en el proceso de lisis alcalina y sus respectivas funciones.

Solución	Componentes	Función
Solución 1	50mM Tris pH 8.0, 50mM glucosa, 10mM EDTA, 100µg RNAasa	EDTA: Quelación de cationes divalentes necesarios para las DNAsas. Glucosa: Mantener la presión osmótica para no romper las células. Tris: Mantiene el pH estable en 8.0 RNAsa: Elimina contaminación por ARN.
Solución 2	0.2M NaOH, 1% SDS	NaOH: Desnaturaliza el ADN cromosmal y plasmídico. SDS: Rompe la membrana celular.
Solución 3	0.5M Acetato de potasio	Renaturaliza el ADN plasmídico y no el cromosomal. Elimina el detergente por precipitación.

Protocolo

1.- Crecer las bacterias seleccionadas de la placa de Transformación en un tubo de 15mL con 5mL medio LB-Amp [150mg/mL] durante toda la noche.

2.- Extraer el material celular centrifugando por 3 minutos a 12,000 rpm y resuspender con vórtex en 152µL de solución 1 y 8µL de RNAsa A [10mg/mL].

3.- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

4.- Agregar 300µL de solución 2 y mezclar por inversión.

5.- Incubar en hielo por 5 minutos.

6.- Agregar 420µL de acetato de sodio 3M y mezclar gentilmente.

7.- Incubar en hielo por 10 minutos. Nota: Si es necesario, seguir agitando mientras se realiza la incubación.

8.- Centrifugar 15 minutos a 12,000 rpm.

9.- Remover 800µL (aprox.) de sobrenadante claro y transferir a otro tubo.

10.- Agregar 700µL de etanol absoluto, mezclar por inversión e incubar a -80°C por 1 hora.

11.- Centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos. Decantar el sobrenadante.

12.- Lavar el pellet con 1mL de etanol al 70%. Centrifugar a 12,000 rpm por 1 min.

13.- Decantar el sobrenadante y dejar secando la pastilla a temperatura ambiente por 15 minutos colocando el tubo abierto boca abajo.

14.- Disolver la pastilla con 30-50µL de agua tridestilada estéril.

Transformación de la construcción plásmido – inserto.

1.- Poner 10µL de una reacción de ligación en un microtubo de 1.5mL. Adicionar 50µL de células competentes.

2.- Incubar 30 minutos en hielo.

3.- Dar un choque de calor por 45 segundos a 42°C.

4.- Poner de vuelta en hielo por 1 minuto.

5.- Agregar 440µL de LB al tubo (para un volumen final de 500µL) e incubar a 37°C por 1 hora.

6.- Concentrar las células centrifugando a 6000 rpm por 2 minutos hasta formar un paquete celular.

7.- Retirar 250µL de medio LB y resuspender la pastilla celular en los 250µL restantes.

8.- Plaquear la suspensión celular en una placa con 20mL de Agar LB - Amp [150mg/mL] – Xgal [50mg/mL].

9.- Incubar a 37°C toda la noche.

Bibliografía

Abdolrasouli, A., Amin, A., Baharsefat, M., Roushan, A., Mofidi, S. (2007). Persistent urethritis and prostatitis due to Trichomonas vaginalis: A case report. The Canadian journal of infectious diseases and medical microbiology. 18(5), 308–310.

Acevedo, A. M., Santana, E., Arce, H. D. De, Pérez, L. J., Caballero, A., Sánchez, L. S. O. (2009). Desarrollo de controles positivos para métodos moleculares de detección de virus de influenza aviar. Salud Animal. 31(1), 50–54.

Bollea-Garlatti, L. A., Vaglio-Giors, G., Guzzi-Maqueda, M., Volonteri, V., Galimberti, R. (2013). Infección gonocócica diseminada. Casos Clínicos. 292–295.

Bachmann, L. H., Hobbs, M. M., Seña, A. C., Sobel, J. D., Schwebke, J. R., Krieger, J. N., Workowski, K. A. (2011). Trichomonas vaginalis genital infections: progress and challenges. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 53 Suppl 3(Suppl 3), S160–S172.

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acids research. 7(6), 1513–1523.

Bouchemal, K., Bories, C., Loiseau, P. M. (2017). Strategies for Prevention and Treatment of Trichomonas vaginalis Infections. Clinical Microbiology Reviews. 30(3), 811–825.

Castro, N., Rodríguez, M., Luz, M. De, Torreblanca, S., María, G., Navarrete-castro, J., Calderón-rodríguez, G. M. (2004). Clonación de una secuencia representativa de la región no traducible 5 ´ (5 ´ -UTR) del virus de la de la hepatitis C. Bioquimia. 29, 11–17.

Catlin, B. W. (1992). Gardnerella vaginalis: Characteristics, clinical considerations, and controversies. Clinical Microbiology Reviews, 5(3), 213–237.

Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (2014). Las ETS y el VIH; hoja informativa de los CDC. Retrieved from www.cdc.gov/std/spanish/vih-STDS-HIV-FS-Sp-July-2017.pdf

Charrel, R. N., La Scola, B., & Raoult, D. (2004). Multi-pathogens sequence containing plasmids as positive controls for universal detection of potential agents of bioterrorism. BMC microbiology, 4, 21.

Codina, C., Martín, M., Ibarra, O. (1983). La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Farmacia Hospitalaria : Órgano Oficial de Expresión Científica de La Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, 1493–1516.

Daría Camacho, Jesús Reyes, Leticia Franco. Guillermo Comach, E. F. (2016). Clonación de secuencias de alfavirus y flavivirus para su uso como controles positivos en el diagnóstico molecular. 33(2), 269–273.

Dreyer, G. (2018). Clinical implications of the interaction between HPV and HIV infections. Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology. 47, 95–106.

Edwards, T., Burke, P., Smalley, H., Hobbs, G. (2014). Trichomonas vaginalis : Clinical relevance , pathogenicity and diagnosis. Critical Reviews in Microbiology, 7828, 1–12.

Fouts, A.C., Kraus, S.J. (1980). Trichomonas vaginalis: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. J Infects Dis 141:137-43.

Garber, G. (2005). The laboratory diagnosis of Trichomonas vaginalis. Can J Infect Dis Med Microbiol, 16:35-8.

Gardner, H. L., C. H. Dukes. 1955. Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classi- fied as "nonspecific" vaginitis. Am. J. Obstet. Gynecol. 69: 962-976.

Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of Escherichia coli with Plasmids D. Journal of Molecular Biology, 166(4), 557–580.

Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of E. coli. In: Glover D M, editor. DNA cloning: a practical approach. Vol. 1. Oxford, United Kingdom: IRL Press; 1985. pp. 109–135.

Harper, J. J., Davis, G. H. G. (1982). Cell Wall Analysis of Gardnerella vaginalis (Haemophilus vaginalis). International Journal of Systematic Bacteriology, 32(1), 48–50.

Holmes, K. K., S. Bertozzi, B. Bloom, P. Jha. Major Infectious Diseases. Disease Control Priorities, third edition, volume 6. Washington, DC: World Bank.

Kingston, M.A., Bansal, D., Carlin, E.M. (2003). “Shelf life” of Trichomonas vaginalis. Int J STD AIDS 14:28-9

Lowe, Sara; Mudzviti, Tinashe; Mandiriri, Ardele; Shamu, Tinei; Mudhokwani, Petronella; Chimbetete, Cleophas; Luethy, Ruedi; Pascoe, M. (2019). Sexually transmitted infections , the silent partner in HIV-infected women in Zimbabwe. Southern African Journal of HIV Medicine, 20, 1–6.

Masek, B., Dize, L., Jang, D., Li, J., & Chernesky, M. (2017). HHS Public Access. 43(6), 369–373.

New England BioLabs (2018). Cleavage Close to the End of DNA Fragments (Oligonucleotides). Retrieved from https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-dna-fragments

Ng, L.K., Martin, I. E. (2018). The laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae. 16(1), 15–25.

Okwoli, R.N., Adinma, J.L., Nnaeze, C.N. (2002). Labortory diagnosis of Gardnerella vaginalis vaginosis. West Afrikan Journal of Medicine, 21(3), 244.

Organización Mundial de la Salud (2019). Infecciones de transmisión sexual. Retrieved from https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)

Petrin, D., K. Delgaty, R. Bhatt, G. Garber. 1998. Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis. Clin. Microbiol. Rev. 11:300– 317.

Pol, B. Van Der. (2016). Clinical and Laboratory Testing for Trichomonas vaginalis Infection. Journal of Clinical Microbiology, 54(1), 7–12.

Randis, T. M., Zaklama, J., LaRocca, T. J., Los, F. C. O., Lewis, E. L., Desai, P., Ratner, A. J. (2013). Vaginolysin drives epithelial ultrastructural responses to gardnerella vaginalis. Infection and Immunity, 81(12), 4544–4550.

Rowley, J., Vander Hoorn, S., Korenromp, E., Low, N., Unemo, M., Abu-Raddad, L. J., Taylor, M. M. (2019). Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. Bulletin of the World Health Organization, 97(8), 548-562P.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., dan Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual 2nd edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Upcroft, P., and Upcroft, J. A. (2001). Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. Clinical microbiology reviews, 14(1), 150–164. doi:10.1128/CMR.14.1.150-164.2001