



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE
CUANTIFICACIÓN DE GENOTECAS PARA LA
PLATAFORMA DE SECUENCIACIÓN MASIVA
PGM ION TORRENT, APLICABLE EN LA
IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN
ALIMENTOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

ADAN VÁZQUEZ MARTÍNEZ

ASESORES:

**M en C. Hugo Gildardo Castelán Sánchez
M en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva
Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Centro Nacional de Detección de Organismos Genéticamente Modificados en la Subdirección de Secuenciación y Bioinformática bajo la dirección de los M en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva y Hugo Gildardo Castelán Sánchez

Revisado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM por la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

Dedicatoria:

A MIS PADRES, por brindarme su apoyo en cada etapa de mi vida hasta alcanzar este objetivo, por sus consejos, enseñanzas por ese amor incondicional, por la vida.

A MIS HERMANOS, por sus consejos, palabras de ánimo, su apoyo en todo momento así como por estar ahí cuando los necesite.

A MIS AMIGOS, por comprender mis estados de ánimo, por esas desveladas incansables, por brindarme su apoyo y amistad.

A MIS COMPAÑEROS Y PROFESORES, por todas sus enseñanzas.

A Mario Ordoñez Pasaran, por tu apoyo incondicional.

Agradecimiento:

A los M en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva y Hugo Gildardo Castelán Sánchez, por el apoyo para llevar a cabo este proyecto, por sus enseñanzas y por brindarme de su valioso tiempo.

A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, por todas las enseñanzas, por su apoyo así como el tiempo y dedicación brindados durante la elaboración del presente.

Al Centro Nacional en Detección de Organismos Genéticamente Modificados, a cada una de las personas que integran la subdirección de Secuenciación y Bioinformática, por sus enseñanzas, por su calidez, por ser lo que son, ¡Gracias!

A la FESC, por todo.

Contenido	Pág.
1.-Indice de figuras	7
2.-Indice de tablas	9
3.-Abreviaturas	10
4.-Resumen	12
5.- Introducción	13
5.1.-Inocuidad alimentaria	15
5.2.-Enfermedades transmitidas por alimentos	16
5.3.-Microorganismos patógenos	19
5.4.- Epidemiología de las ETAS en México	20
5.5.- Características de Gram positivas y Gram Negativas	27
5.6.-Características generales del género Salmonella	29
5.7.- Tipificación de Bacterias Patógenas	33
5.7.1.-Fragmentos de restricción de longitud polimórfica RFLP	35
5.7.2.- Tipificación multilocus de secuencias MLST	36
5.8.- Secuenciación de nueva Generación	37
5.8.1.-Epigenómica	39
5.8.2.-Transcriptómica	40
5.8.3.-Metagenómica	41
5.9.- Genotecas	42
5.9.1.-Tipos de Genotecas	
5.10.-Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	44
5.11.-Electroforesis de microfluidos	48
5.12.-Evaluación de métodos cuantitativos	50
6.- Planteamiento del Problema	
6.1 Justificación	54
7.- Objetivos	
7.1.-Objetivo General	55
7.2.-Objetivos Particulares	55

8.-Estrategia experimental	56
9.-Materiales y métodos	57
9.1.- Extracción de ADN	57
9.1.1.-Cuantificación y Pureza del ADN	58
9.2.-Fragmentación del ADN (400pb)	58
9.2.1.- Método enzimático	58
9.2.2.- Fragmentación mecánica (Sonicación)	58
9.3.-Ligación de de adaptadores reparación de extremos cohesivos	59
9.4.-Selección de tamaño	
9.4.1.-Pippin Prep	60
9.5.-Amplificación	60
9.6.-Verificación de tamaño de fragmentos	62
9.6.1.-Bioanalizador	62
9.6.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real	
qPCR	63
9.8.-Bioanalizador	65
9.7.-Análisis estadístico	65
10.-Resultados	66
10.1.-Extracción de ADN de muestras de Salmonella.	66
10.2.-Estandarización de la fragmentación de ADN.	67
10.3.-Elaboración de genotecas para la plataforma de secuenciación Ion Torrent.	69
10.4.-Cuantificación de las genotecas.	71
10.5.-Pruebas intra e inter ensayo.	76
11.-Discusión	79
12.-Conclusiones	84
13.-Glosario	85
14.-Referencias bibliográficas	87

1.-Índice de Figuras	Pág.
Fig. 1 Estructura de bacterias Gram positivas y Gram negativas.	29
Fig. 2 Cromosoma y plásmido de Salmonella.	32
Fig. 3 Genotecas “Paired-end” y “Mate pair”.	44
Fig. 4 Descripción del proceso de una PCR en los primeros ciclos de reacción.	47
Fig. 5 Preparación de la curva estándar.	48
Fig. 6 Flujo de trabajo.	59
Fig. 7 Estación de carga del “chip” en el instrumento Bioanalizador.	63
Fig. 8 Fragmentación por sonicación por triplicado de una sola muestra de Salmonella.	68
Fig. 9 Fragmentación enzimática por triplicado de una sola muestra de Salmonella.	68
Fig. 10 Genoteca fragmentada por sonicación con un tamaño promedio de 481 pb y electroferograma.	70
Fig. 11 Genoteca fragmentada enzimáticamente con un tamaño promedio de 478 pb y electroferograma.	71
Fig. 12 Curva de cuantificación obtenida de la electroforesis de microfluidos.	72
Fig. 13 Curva de cuantificación obtenida de la reacción de cadena de la polimerasa en tiempo real.	72
Fig. 14 Cuantificación por electroforesis de microfluidos (enzimática) intra e inter ensayo.	77

Fig. 15 Cuantificación por electroforesis de microfluidos (sonicación) intra e inter ensayo.	77
Fig. 16 Cuantificación por qPCR (enzimática) intra e inter ensayo.	78
Fig. 17 Cuantificación por qPCR (sonicación) intra e inter ensayo.	78

2.-Índice de Tablas	Pág.
Tabla 1 Principales enfermedades y sus riesgos.	24
Tabla 2 Reacción de ligación.	59
Tabla 3 Temperatura y tiempos en el termocicador para la reacción de ligación.	60
Tabla 4 Componentes de la reacción de amplificación.	61
Tabla 5 Temperatura y tiempos en el termociclador para la reacción de amplificación.	61
Tabla 6 Mezcla de reacción para cuantificación.	64
Tabla 7 Temperatura y tiempos en el termociclador para la cuantificación.	64
Tabla 8 Concentración de estándares.	65
Tabla 9 Concentración y pureza de ADN.	67
Tabla 10 Parámetros establecidos de la fragmentación mecánica.	67
Tabla 11 Estadística descriptiva de la cuantificación de las genotecas.	73
Tabla 12 Pruebas de normalidad.	74
Tabla 13 Análisis estadístico comparativo de los métodos de cuantificación.	76

3.-Abreviaturas

APPCC o HACCP: Análisis de peligro y puntos críticos de control

C: Citocinas

CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés Center of Disease Control)

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

CNRDOGM: Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP's: Dinucleótidos trifosfato

ETA: Enfermedad transmitida por alimentos

ESTs: marcadores de secuencias expresadas (del inglés Expressed Sequence Tags)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (por sus siglas en inglés Food and Agriculture Organization)

G: Guanina

MLST: Tipificación multilocus de secuencias (por sus siglas en inglés Multilocus sequence typing)

mRNA: ARN mensajero

NOM: Norma Oficial Mexicana

NSG: Secuenciación de Nueva Generación (por sus siglas en inglés Next-generation sequencing)

ONU: Organización de las Naciones Unidas

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés polymerase chain reaction)

PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsado (por sus siglas en inglés Pulsed field gel electrophoresis)

PGM: Máquina personal de genoma (por sus siglas en inglés Personal Genome Machine)

RFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism)

rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

SINAVE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

SSA: Secretaría de Salud

ST: Tipo de secuencia (por sus siglas en inglés Sequence Type)

TIF: Tipo de Inspección Federal

tRNA: RNA de transferencia

WGS: Secuenciación completa del genoma (por sus siglas en inglés Whole Genome Sequencing)

Cabe mencionar que para nombres de marcas, reactivos y/o equipos se respetó el idioma original del que provienen.

4.- RESUMEN

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías para la secuenciación de nueva generación (NSG por sus siglas en inglés), que tiene la capacidad de secuenciar genomas completos, y con la cual se puede realizar la tipificación de organismos patógenos como bacterias transmitidas por alimentos, entre otros.

En el Centro Nacional en Detección de Referencia de Organismos Genéticamente Modificados (CNDROGM), se emplea la NGS para la identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), las cuales constituyen un importante problema de salud pública, sin embargo, durante el proceso de secuenciación de estos microorganismos, uno de los puntos críticos de control es la cuantificación de las genotecas, para tener una adecuada secuencia de DNA del organismo de interés. Por lo tanto, en este trabajo se realizó una evaluación de los métodos de cuantificación desarrollados para las genotecas, determinando mediante la comparación estadística de estos resultados cual proporciona mejores resultados, para su utilización en la plataforma de secuenciación masiva PGM ION TORRENT.

Para la cuantificación de las genotecas se emplearon dos metodologías: la electroforesis de microfluidos y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

De acuerdo con los análisis estadísticos, se logró determinar con un nivel de significancia del 0.5 que la qPCR es el mejor método de cuantificación comparado con la electroforesis de microfluidos, debido a que al comparar estos datos, la r^2 es mucho mejor en la cuantificación realizada por qPCR ya que el valor se acerca mucho mas a 1 siendo este de 0.9990 en cambio la cuantificación que se realizó con Bioanalyzer 2100 presenta una r^2 más alejada de 1 dando como resultado 0.1617 indicando que en este tipo de cuantificaciones la correlación entre grupo de datos es más disperso y por lo tanto el modelo es poco confiable y los resultados que se van a obtener son más variados.

5.- INTRODUCCIÓN

Las bacterias presentes en los alimentos son un problema de salud pública (Berglund, 2011), de este modo, se han producido fenómenos mundiales tales como la reaparición del Cólera epidémico en las Américas, el aumento de la frecuencia de la *Salmonella enteritidis* vinculada al consumo de aves y huevos y la aparición de otros agentes de los que no se conocía su papel en la transmisión a través de los alimentos como son: *Escherichia coli* 0157:H7 y *Listeria monocytogenes* (Herman, 1995), las ETA producen síntomas más comunes como diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etc (Rosas, 2001).

La determinación de la secuencia de DNA es la mejor manera de comprender la información acerca del genoma de un organismo vivo. Los rápidos avances en las tecnologías de secuenciación en los últimos años han incrementado el número de aplicaciones tanto en biología como en medicina (Berglund, 2011). El método más eficiente de secuenciación de DNA es el método Sanger (Sanger, 1997) pero tiene limitaciones tales como bajo rendimiento, alto costo, y un tiempo considerable de desarrollo. En los últimos años se ha desarrollado la secuenciación de nueva Generación (NGS) basada en la secuenciación por síntesis o ligación; el estudio de genoma ha cambiado de forma espectacular desde su lanzamiento, en 2005, del primer equipo de NGS. Desde entonces se han desarrollado diferentes opciones tecnológicas para el análisis genético por ultrasecuenciación: 454 de Roche, HiSeq2000 de Illumina, SOLID 5500 de LifeTech, PGM de Ion Torrent, MiSeq de Illumina, Junior de Roche, Pac Bio, Helicos (Holts, 2008).

Las ventajas de estas técnicas de NGS son altos rendimientos, rápido funcionamiento y bajo costo (Holts, 2008). La NGS es un método importante para generar datos de secuenciación de diferentes tipos de aplicaciones con respecto al diagnóstico y responder a un tratamiento de diferentes enfermedades o dependiendo del objetivo de la secuenciación. Un paso importante en el proceso de NGS es el control de calidad de las

genotecas, es la cuantificación de las genotecas para tener una adecuada secuencia de DNA del organismo de interés.

En la actualidad se han descrito diversos métodos para la cuantificación de genotecas, sin embargo no se ha hecho una comparación sobre cuál de estos ofrece mejores rendimientos, por ello en este trabajo se realizó una evaluación de los métodos desarrollados para la cuantificación de las genotecas, para así tener mayor certeza en los pasos posteriores de la secuenciación y no tener cantidades sobreestimadas de estas lo que merma los procesos posteriores a la elaboración de las mismas.

5.1.-Inocuidad alimentaria

La higiene de los alimentos comprende las condiciones y medidas necesarias para la producción, elaboración, almacenamiento y distribución de los alimentos, destinadas a garantizar un producto inocuo, en buen estado y apto para el consumo humano. Se busca alcanzar, alimentos libres de contaminantes, tanto microbiológicos, químicos o físicos con el objetivo de que no representen riesgos para la salud del consumidor (Secretaria de Salud, 2004).

Por lo anterior, el objetivo de inocuidad hace referencia a “la frecuencia y/o concentración máxima de un peligro microbiológico en un alimento en el momento del consumo que proporciona el nivel apropiado de protección de salud” (FAO Y OMS, 2001).

Dentro de los factores por mal manejo de los alimentos que producen ETA (Brown, 1995), podemos señalar que:

- El 56 % es por temperatura inferior a la necesaria en la cocción;
- El 31 % por ingerir alimentos después de varias horas sin refrigerar;
- El 25 % por mala manipulación;
- El 20 % por mal recalentamiento;
- El 16 % por mala preparación; y
- El 9 % por contaminación cruzada.

En la pasada década la OMS difundió una serie de medidas para garantizar la preparación Higiénica de los alimentos a las que se les denomina Reglas de Oro (Brown, 1995. Warlow, Insel, Sellar, 1994):

- Elegir alimentos tratados industrialmente con fines higiénicos.

- Cocinar bien los alimentos.
- Consumir los alimentos inmediatamente después de cocinados.
- Guardar cuidadosamente los alimentos cocidos.
- Recalentar bien los alimentos.
- Evitar el contacto entre alimentos crudos y cocinados.
- Lavarse las manos a menudo.
- Mantener escrupulosamente limpias todas las superficies de la cocina.
- Mantener los alimentos fuera del alcance de insectos, roedores y otros animales.
- Utilizar agua pura.

Alrededor del 70 % de la diarrea aguda es producida por agua y alimentos contaminados (Dias, 1999).

5.2.-Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etc. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias y sus toxinas, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli* (Rosas, 2001).

En estos casos, las patologías que se producen suelen ser de carácter gastrointestinal, aunque pueden dar lugar a cuadros más extendidos en el organismo e, incluso, a septicemias.

Las enfermedades transmitidas por alimentos pueden provocar:

- Las infecciones alimentarias son las producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias y sus toxinas, virus, hongos, parásitos, que en la luz intestinal puedan multiplicarse o lisarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros aparatos o sistemas. Tienen un período de incubación mucho más prolongado.
- Intoxicación alimentaria: Las intoxicaciones alimentarias son las producidas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental, o intencional desde su producción hasta su consumo. Son de carácter fundamentalmente gastroentérico agudo, con notable y principal sintomatología tóxica, aparece bruscamente después de la absorción de alimentos contaminados con microorganismos o con metabolitos elaborados por ellos, por ejemplo *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*.
- Toxi-infección alimentaria: Es el resultado del consumo de algún alimento que contenía gran cantidad de microorganismos que, producen toxinas en el intestino, causando una enfermedad (FAO Y OMS, 2001).

Tradicionalmente, las infecciones se diagnostican mediante el cultivo de muestras de alimentos que se suponen contaminados y la identificación de las bacterias que crecen en

los medios de cultivo, con base en criterios morfológicos y fisiológicos que quizá dependan de factores ambientales o genéticos (Scheu, 1988).

Además, la obtención de resultados puede tomar días (Herman, De Blok, Waes G, 1995. Gentry-Weeks C, Hutcheson H, Kim L, Bolte D, Traub-Dargatz J, 2002) o semanas (Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, Deneff J, Cocito C, Gala J, 2000. Bannantine J, Baechler E, Zhang Q, Li L, Kapur V, 2002); por ejemplo, los métodos convencionales para la detección de *Salmonella* requieren de 3 a 4 días para indicar resultados negativos y más de siete para confirmar un resultado positivo (Bhagwat A, 2004).

La transmisión de enfermedades a través del consumo de alimentos es un fenómeno ya conocido; sin embargo recientemente y en todo el mundo se ha constatado el aumento de su frecuencia, cambios en las etiologías predominantes y en la dinámica epidemiológica. De este modo, se han producido fenómenos mundiales tales como la reaparición del Cólera epidémico en las Américas, el aumento de la frecuencia de la *Salmonella enteritidis* vinculada al consumo de aves y huevos y la aparición de otros agentes que no se conocía su papel en la transmisión a través de los alimentos como son: *Escherichia coli* 0157:H7 y *Listeria monocytogenes* (H, De Block J, Waes G, 1995).

Las enfermedades virales transmitidas por los alimentos y el agua son mucho menos conocidas que las demás y estas pueden ser por *astrovirus*, *rotavirus*, *adenovirus*, *enterovirus* y virus de la hepatitis A entre otros. Dentro de las causas bacterianas están la *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloide*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, infecciones por *vibrios* y *Clostridium*, *Shigella*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* entre otros. Las parasitarias son producidas por *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum*, entre otras (Dias L. T., Valdés-Dapena V. M., 1999).

5.3.- Microorganismos Patógenos

Las enfermedades de origen biológico son producidas por virus, bacterias, hongos y parásitos. El Comité de Expertos de la OMS plantea que la mayoría de las enfermedades por alimentos son de origen microbiano (Dias L. T., Valdés-Dapena V. M., 1999).

La legislación alimentaria por parte de la Secretaria de Salud (SSA) y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), elaboran y emiten en coordinación con otras autoridades competentes las Normas Oficiales Mexicanas (NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba) que indican en las Especificaciones Sanitarias el análisis de los siguientes microorganismos patógenos (Secretaria de Salud, 2004):

1. Microorganismos patógenos normados.

- *Staphylococcus aureus*
- *Salmonella spp*

2. Microorganismos patógenos analizados bajo situaciones de emergencia dictaminada por la Secretaria de Salud (Secretaria de salud, 2004):

- *Listeria monocytogenes*
- *Vibrio cholerae*

También existen otros microorganismos que, aunque no se encuentra normado su análisis, son de importancia debido a que estas bacterias pueden haber formado una población suficientemente grande para causar una infección alimentaria o intoxicar el

intestino de un hospedador sensible. Estos microorganismos patógenos son (Secretaría de salud, 2004):

- *Clostridium perfringens*
- *Campylobacter jejuni*
- *Bacillus cereus*
- *Shigella spp*

5.4 Epidemiología de las ETAS en México

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en México (SINAVE) se rige por la Norma Oficial Mexicana (NOM) 017-SSA2-1994, para la vigilancia epidemiológica, que fue publicada el 11 de octubre de 1999 y ratificada en 2005. De acuerdo con esta norma, se consideran como objeto de vigilancia los casos de enfermedad, las defunciones, los factores de riesgo y los factores de protección.

La contaminación de los alimentos es uno de los problemas de salud más extendida del mundo. El Centro para el Control y Prevención de las enfermedades (CDC) estima que cada año 76 millones de personas se enferman, más de 300,000 son hospitalizados en los Estados Unidos de Norte América y 5,000 norteamericanos mueren como resultado de enfermedades alimentarias, principalmente niños, ancianos e inmunodeficientes, por lo que diversas instituciones trabajan en un programa para aportar información detallada del diagnóstico, tratamiento y prevención de estas enfermedades (Fasano A, 2000. Warlow GM, Insel PM, Sellar MF, 1994).

Las ETA constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas

enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la microbiota normal de aves, cerdos y ganado (Dias L. T., Valdés-Dapena v. M., 1999).

Las enfermedades gastrointestinales reportadas por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) son enfermedades de gran importancia para la salud pública de México, como es el caso del absceso hepático amibiano, amibiasis intestinal, fiebre tifoidea, giardiasis, intoxicación alimentaria bacteriana, paratifoidea y otras salmonelosis, shigelosis, infección intestinal debida a virus y otros organismos y otras infecciones intestinales debido a protozoarios.

También existen otras enfermedades que pueden transmitirse por alimentos, como la brucelosis, la teniasis, la cisticercosis y la hepatitis vírica A o parasitarias como la ascariasis que no generan diarrea (Conde-Bonfil y M., Mora-Zerpa C, 1992).

Las enfermedades de tipo diarreico que pueden ser transmitidas por alimentos y de las cuales se cuenta con información regular son: fiebre tifoidea, paratifoidea y otras salmonelosis; shigelosis; infecciones intestinales por otros organismos; intoxicación alimentaria bacteriana; amibiasis intestinal; otras enfermedades intestinales por protozoarios como la giardiasis.

Debido a la insuficiente información disponible de brotes disponible, para estimar la probabilidad de incidencia de una enfermedad se utiliza el número de nuevos casos por 100 mil habitantes de ETA potenciales (este método permite eliminar del cálculo el efecto del crecimiento demográfico) (Warlow GM, Insel PM, Seller MF, 1994).

Las parasitosis como la amebiasis intestinal, el absceso hepático amebiano, la giardiasis, otras infecciones intestinales debidas a protozoarios, el complejo tenia-sis-cisticercosis, la ascariasis y otras helmintiasis duran de semanas a años; algunas son asintomáticas, y los estudios epidemiológicos realizados en México indican frecuentemente una alta prevalencia, sin embargo rara vez son identificadas como agentes etiológicos causantes de brotes de ETA (Dias L T, Valdés-Dapena V M, 1999).

Se estima que el 20 % de la población de México es portadora de amebiasis intestinal y que sólo el 2 % presenta la sintomatología de la enfermedad. El período en que el individuo puede ser portador varía de algunos meses a dos años (Conde-Bonfil Y M., Mora-Zerpa C, 1992) el individuo puede dejar de ser portador espontáneamente.

La calidad sanitaria de los alimentos, y en particular la de las hortalizas y frutas frescas, pescados, crustáceos y moluscos, es fundamental para poder mantener e incrementar el volumen de las exportaciones de alimentos de México. Si los productores y la industria no logran mejorar los procesos de elaboración y control, y si el Estado no implementa medidas que ofrezcan garantías a los gobiernos de los países importadores de que México cumple con los requisitos de inocuidad alimentaria, los exportadores encontrarán grandes dificultades para mantener o aumentar el volumen de las exportaciones. Además, los ingresos en divisas, el empleo y las posibilidades de desarrollo se verán negativamente afectados.

Los Estados Unidos son el principal destino de las exportaciones mexicanas; según las estadísticas de detenciones de mercancías procedentes de México en ese país, los siguientes peligros microbiológicos deben ser objeto de atención prioritaria:

- *Salmonella* spp. en frutas, jugo de naranja, productos pesqueros, y chocolate. (La paratifoidea y otras salmonelosis se incluyen entre los grandes problemas de salud identificados.)

- *Shigella* spp. en hortalizas frescas. (La shigelosis se incluye entre los grandes problemas de salud identificados.)
- *Cyclospora cayetanensis* en hortalizas frescas. (*C. cayetanensis* se incluye entre "otras infecciones por protozoarios".)
- *Listeria monocytogenes* en guacamole y queso fresco. (*L. monocytogenes* no ha sido identificada por el sistema de vigilancia.)

Por otro lado, el turismo internacional, que es una fuente de divisas considerable para México, podría verse obstaculizado por los casos de diarrea del viajero por consumo de alimentos contaminados. Un indicador pertinente son los estudios subjetivos derivados de encuestas realizadas por los operadores de paquetes turísticos durante el viaje de retorno. Una encuesta de 5 086 turistas ingleses, llevada a cabo durante el verano de 1999, indicó que el 42 % de los entrevistados presentó trastornos estomacales, que muestran la incidencia de la diarrea del viajero (Cartwright R, 1999).

La diarrea del viajero se presenta entre 5 y 15 días después de la llegada al lugar que se visita. La diarrea es generalmente líquida, no inflamatoria, sin sangre y su duración es de 1 a 5 días. En 15 estudios sobre la etiología de esta diarrea en países latinoamericanos, incluido México, se observó que:

- En aproximadamente la mitad de los casos (28-72 %) el agente etiológico fue la *E. coli* enterotoxi-génica (incluida en la identificación de los grandes problemas de salud bajo la clasificación de "infecciones intestinales por otros organismos")
- El segundo agente más frecuentemente identificado fueron los rotavirus (0-36 por ciento) (incluidos en la identificación de los grandes problemas de salud bajo la clasificación de "infecciones intestinales por otros organismos") y;
- En tercer lugar se encontraron *Shigella* (0-30 %) (incluida en la identificación de los grandes problemas de salud bajo la clasificación de shigelosis) y *Salmonella* (0-

16 %) (incluida en la identificación de los grandes problemas de salud bajo la clasificación de "paratifoidea y otras salmonelosis") (Flores, 2002).

El carácter endémico de estas enfermedades es consecuencia de un saneamiento inadecuado y de la presencia relativamente alta de portadores asintomáticos en la población, especialmente entre quienes preparan y sirven los alimentos, y de deficientes condiciones de almacenamiento de los alimentos (Fernández E, 2000).

Tabla 1 Principales enfermedades y sus riesgos			
ETA	RIESGO PARA LA SALUD	RIESGO PARA LAS EXPORTACIONES	RIESGO PARA EL TURISMO
1. Fiebre tifoidea*	✓		
2. Amebiasis intestinal*	✓		
3. Shigelosis*	✓	✓	✓
4. Brucelosis		✓	
5. Cólera		✓	✓
6. Paratifoidea/salmonelosis*	✓	✓	✓
7. Infecciones intestinales causadas por otros organismos*	✓	✓	✓
8. Listeria monocytogenes		✓	
* Enfermedad clasificada como diarreica.			

En México existen agencias que se encargan de la inocuidad de los alimentos frescos y procesados. Dichas agencias son responsabilidad de dos Secretarías de Estado, la Secretaría de Salud (SSA) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Conforme a la Ley General de Salud, la SSA ejercerá las atribuciones de regulación, control y fomento sanitario, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y la SAGARPA se encargará de los

aspectos de Inocuidad a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) (Jiménez E, Chaidez C, 2013).

El Gobierno Mexicano, al comprender la necesidad de prevenir la contaminación de los alimentos, crea dentro del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera, que desarrolla y ejecuta esquemas de aplicación voluntaria sobre temas de inocuidad para la parte primaria de la industria, que promueve la aplicación y certificación de los sistemas de reducción de riesgos de contaminación de los alimentos (Jiménez E, Chaidez C, 2013).

Sin embargo, no existe un marco legal y normativo en el país para la aplicación de estos programas, aunque en 2007, se realizaron modificaciones en las leyes Federales de Sanidad Vegetal, Salud Animal, así como Pesca, para especificar que los alimentos tienen que tener algún sistema de reducción de riesgo de contaminación, aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura, Buenas Prácticas de Higiene, Buenas Prácticas Agrícolas, sistemas para el control de plagas y trazabilidad y rastreabilidad de los productos. Entre estos programas están la reducción de riesgos de contaminación en frutas y verduras, productos pecuarios – en el caso de la carne muy específicamente con el sistema Tipo Inspección Federal (TIF) –, otras como las Buenas Prácticas en el Manejo y Envasado de la Miel y las Buenas Prácticas Pecuarias (leche y otros productos) (Jiménez E, Chaidez C, 2013).

Hasta diciembre de 2009, las Normas Oficiales Mexicanas que controlaban la producción e inocuidad de alimentos eran la norma oficial mexicana NOM-120-SSA1-1994: Bienes y servicios, prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas; y la NOM- 093-SSA1-1994: Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en los establecimientos fijos. Estas normas se

enfocaban a los controles sanitarios y buenas prácticas de manufactura y saneamiento para establecimientos procesadores de alimentos (restaurantes, negocios de comidas, comisariatos y similares) (Jiménez E, Chaidez C, 2013).

Sin embargo, ante la continua presencia de enfermedades transmitidas por alimentos, el problema de la influenza AH1N1, el surgimiento de más patógenos emergentes como todas las *E.coli* enterohemorrágicas además de la *E.coli* O157:H7 y la globalización en el suministro mundial de alimentos, el Sistema Federal de Salud por medio de COFEPRIS, inició, consultó y decretó finalmente en diciembre de 2009, la NOM-251-SSA1-2009 Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios, que entró en vigor oficial desde septiembre de 2010. Esta norma ya contempla la aplicación de sistemas de gestión que garanticen la inocuidad de los alimentos, como el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC o HACCP, siglas en inglés). Aunque el sistema APPCC que se describe en la norma se trata de una recomendación más formal, su aplicación es voluntaria (Jiménez E, Chaidez C, 2013).

El objetivo de estas normativas es brindar a los productores un marco general de requisitos para reducir los riesgos de contaminación a lo largo de todas las etapas de la producción de alimentos, con el fin de fortalecer el sistema de abastecimiento alimentario bajo formas de producción más seguras (Jiménez E, Chaidez C, 2013).

Por otro lado, en México como en otras regiones de Latinoamérica, se han incrementado considerablemente el número de certificaciones independientes y privadas en temas de calidad e inocuidad alimentaria. Sin embargo, la gran oferta de “Sistemas de Certificación” puede llegar a confundir al productor sobre la elección del sistema que más le conviene. En ese sentido, es importante que los interesados se informen e identifiquen el sistema que cumple con las especificaciones apropiadas al sistema de producción de

alimentos que desarrollan y que cuente con reconocimiento y prestigio internacional (Jiménez E, Chaidez C, 2013).

5.5.- Características de las bacterias Gram positivas y Gram Negativas

En las últimas décadas se han hecho importantes avances en el estudio de la estructura bacteriana, lográndose una identificación bioquímica de muchas fracciones subcelulares; estos avances han permitido ubicar a las bacterias en el reino Procaryotae (Prescott, Harley, Klein, 1999).

El conocimiento de las diferentes estructuras y composición ha permitido comprender como muchas bacterias se relacionan con el hombre, ya sea como integrantes de la microbiota normal o como agresoras para el mismo (Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM, 1994).

Recientemente, los avances de la genética bacteriana hicieron posible el desarrollo de técnicas de biología molecular con aplicaciones a nivel de la investigación científica y el diagnóstico (Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Guerra H, 1993).

Las bacterias integran el reino procariota (pro de primitivo y cariota de núcleo) (Prescott, Harley, Klein, 1999).

Todos los organismos vivos se pueden dividir en dos tipos celulares: eucariotas y procariotas. Tienen estructuras en común como la membrana celular, los ribosomas encargados de la síntesis proteica y el ácido desoxirribonucleico (ADN) portador de la información genética (Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM, 1994). Es importante destacar que el ADN procariota es circular y cerrado, mientras que el eucariota se organiza en cromosomas individuales y se asocia a proteínas de tipo histonas (Prescott, Harley, Klein, 1999).

La reproducción en los eucariotas puede ser tanto sexuada como asexuada, mientras que los procariotas se reproducen por división simple (forma asexuada). El tamaño de la célula eucariota es mayor que el de la procariota. Los procariotas no poseen citoesqueleto, a diferencia de los eucariotas (Prescott, Harley, Klein, 1999).

El tamaño de las bacterias oscila entre las 0.5 y 3 μm , pudiendo llegar en algunos tipos a 10 μm . La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral) (Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM, 1994).

La pared celular de las bacterias Gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglicano, además de dos clases de ácidos teicoicos: Anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el peptidoglicano (también conocido como mureína) (María C. P., 2014). Por el contrario, la capa de peptidoglicano de las Gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido (Pisabarro G, 2009). Estas características se pueden observar en la Fig. 1.

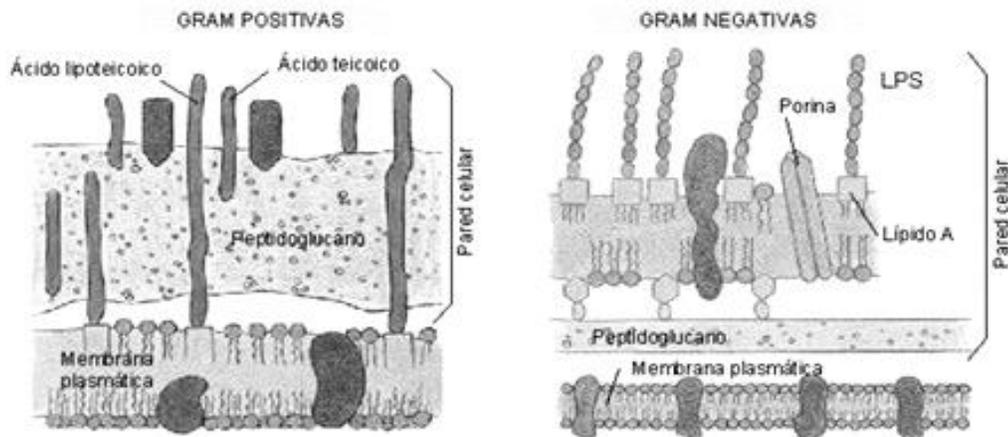


Fig.1.- Estructura de Gram positivas y Gram negativas (La membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, la capa de peptidoglucano que posee es demasiado delgada. Por el contrario, las Gram positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglucanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico (María C. P., 2014).)

5.6.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *SALMONELLA*

El género *Salmonella* es uno de los principales microorganismos que produce enfermedad en el humano, se incluye en la familia Enterobacteriaceae, integrada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, las características generales de las enterobacterias: son fermentadores de la glucosa, catalasa positiva, oxidasa negativo y suelen ser móviles. La nomenclatura de *Salmonella* es compleja. Se han usado diferentes sistemas para referir a este género (Popoff MY, Minor L, 2001).

Como todas las enterobacterias, el género *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y de envoltura, para *Salmonella* (Vi). Los antígenos somáticos son termoestables y su especificidad radica en el componente polisacárido de la endotoxina, complejo proteína- lipopolisacárido. Los antígenos O se clasifican en mayores y menores; los

mayores son los que definen un grupo antigénico. Así, el factor antigénico O:4 caracteriza el antiguo grupo B, hoy llamado O: 4, mientras que los antígenos menores tienen menor valor discriminativo. Por ejemplo, el antígeno O: 12 lo presenta toda *Salmonella* perteneciente a los grupos A, B y D. Pueden encontrarse otros antígenos menores generados por modificaciones químicas o por conversiones fágicas (Brer FW, Villar RG, Angulo FG, Tauxe R, Swamiathan B, 2000).

Los antígenos capsulares o de envoltura sólo lo presentan algunos serotipos de *Salmonella* (Typhi y Dublin). Los antígenos flagelares son proteicos y termolábiles. Algunos serovares sólo producen un único tipo de antígeno H, siendo, en consecuencia, monofásicos. Sin embargo otros serotipos pueden producir alternativamente dos tipos de antígenos H, por lo que se denominan bifásicos. Mediante el uso de reacciones antígeno anticuerpo se determina la fórmula antigénica de una cepa y, a partir de dicha fórmula, se la clasifica en serovar o serotipo siguiendo el esquema propuesto originalmente por Kauffman y White (que agrupa todas las serovariedades conocidas, más de dos mil quinientos) (Popoff MY, Minor L, 2001).

Se han secuenciado los genomas completos de *Salmonella* entérica serovar typhi CT18 (4 809 037 bp), *Salmonella* entérica serovar typhimurium LT2 (4 857 000 bp) y *Salmonella* entérica serovar paratyphi A cepa ATCC 9150 lo que ha sido de gran utilidad en estudios de epidemiología, especificidad de hospedero y patogénesis al detectar la presencia de pseudogenes, profagos funcionales, islotes de patogenicidad, islas de patogenicidad y sistemas de secreción (Minor L, Popoff MY, 1987. Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD Farmer J, 1989) algunos genes requieren futuras investigaciones debido a que aún se desconoce su función precisa.

Las islas de patogenicidad se constituyen por un grupo de genes involucrados en codificar factores específicos de virulencia, su porcentaje de G-C difiere del promedio del genoma bacteriano, se presentan repeticiones directas en sus extremos, portan genes que

codifican factores de movilidad como integrasas, transposasas o secuencias de inserción y se encuentran frecuentemente insertadas en loci de tRNA (Fernández E, 2000. LE Minor L, Popoff MY, 1987).

Salmonella presenta múltiples genes involucrados en la invasión, se trata de un segmento de 35-40 kb que contiene 31 genes que pueden ser divididos en categorías que incluyen: que codifican el SSTIII, denominados *inv*/*spa*, genes que codifican proteínas involucradas en la translocación de las moléculas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedero y genes que codifican las proteínas efectoras y sus chaperonas. A diferencia de otras islas de patogenicidad de *S. enterica*, SPI-1 no está localizada inmediatamente adyacente a genes tRNA.⁵⁹ La SPI-1 se encuentra presente en *S. bongori* y todas las serovariedades de *S. enterica*, probablemente fue adquirida en la evolución temprana de *S. enterica* por transferencia de genes, de manera horizontal; lo que se propone al determinar su % de G-C que es del 42-47% mientras que el del cromosoma de *Salmonella* es del 52-54%; además el tamaño, ordenamiento y orientación de los genes *inv*/*spa* en SPI-1 es similar a los genes de invasión del plásmido de virulencia de *Shigella*.^{40,102} La SPI-1 codifica determinantes que median: la invasión de células del hospedero no fagocíticas, apoptosis de macrófagos *in vitro* y activación de caminos MAP cinasas y factores de transcripción. Las mutantes en la SPI-1 disminuyen virulencia en el ratón, cuando la bacteria es inoculada por vía oral y no se ve disminuida su virulencia cuando se inocular por vía parenteral, lo que sugiere que la SPI-1 funciona en los primeros estadios de la infección. Actualmente se sabe que *Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5. La SPI-2 también codifica para un SSTIII que se activa cuando la bacteria se encuentra intracelularmente dentro de una vacuola. Se localiza en el centisoma 31, situada inmediatamente adyacente al gen tRNA *valV*, su tamaño es de 40 kb y tiene un porcentaje de G-C del 44.6%. Consta de 32 genes que regulan la supervivencia y replicación bacteriana en los compartimentos intracelulares de fagocitos y células epiteliales (Popoff MY, Minor L, 2001). Las funciones moleculares de la SPI-2 no han sido caracterizadas con

tanto detalle como las de la SPI-1. Las mutantes en dicha isla son severamente atenuadas en la infección sistémica al ser inoculada oral o intraperitonealmente (Brenner FW, Villar RG, Angulo FG, Tauxe R, Swamiathan B, 2000).

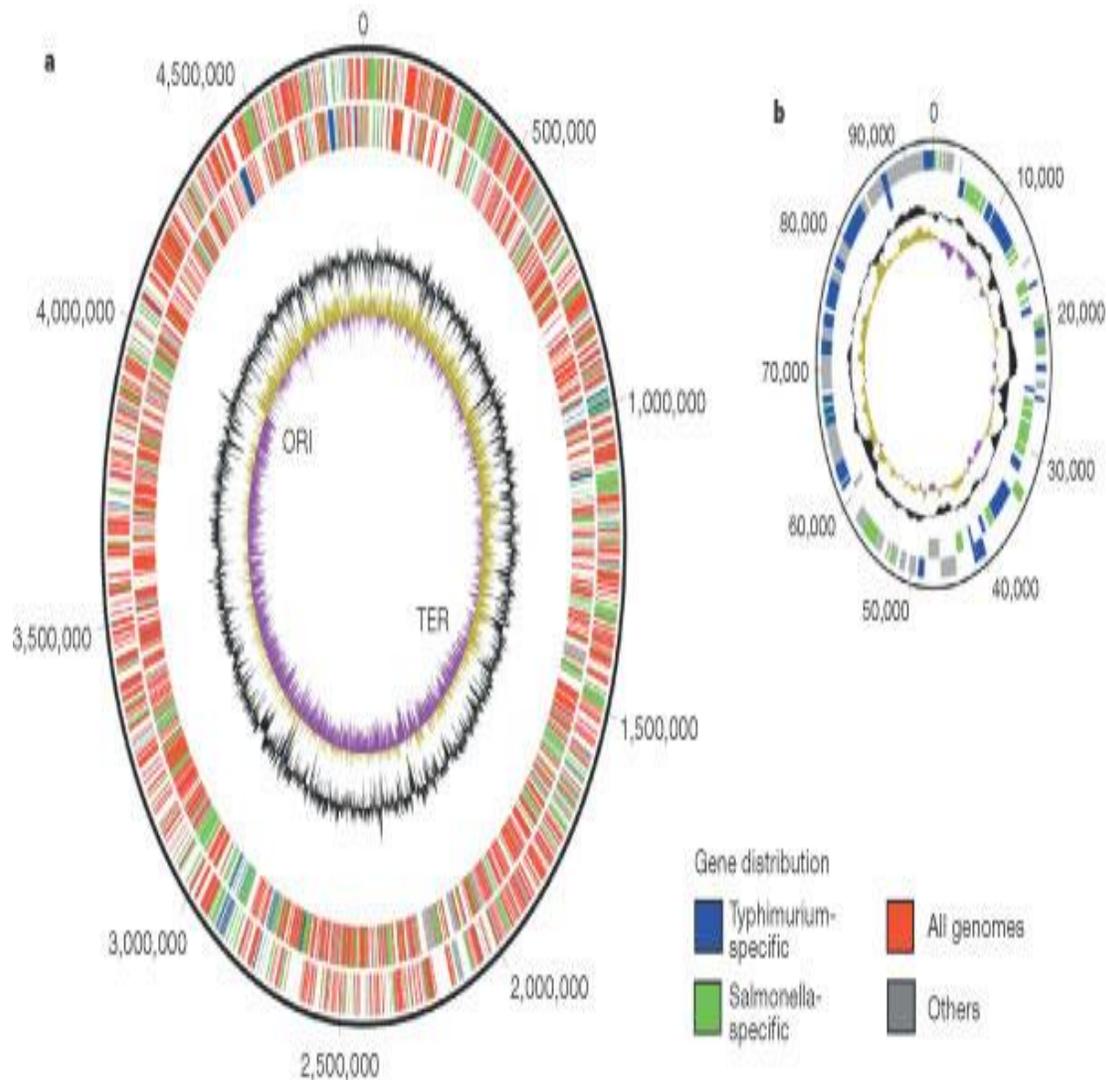


Fig. 2 Cromosoma y plásmido de *Salmonella*, en la que se muestra de manera muy ilustrativa el número de genes tanto del plásmido como del cromosoma

En la Figura 2 se muestra las características del genoma de *Salmonella*. **a**, En el cromosoma se muestran las pares de bases indicadas en el exterior del círculo. Los dos círculos exteriores círculos representan la orientación de codificación, con la hebra hacia delante en el exterior y la cadena inversa en el interior. El color rojo indica homólogos cercanos en los genomas. El color verde indica genes con una estrecha homología en al menos otras *Salmonellas* (*S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. arizonae* o *S. bongori*). El color azul indica genes presentes sólo en *S. typhimurium* LT2. Gris indica otras combinaciones. El círculo interior negro es el contenido de G + C; el círculo amarillo púrpura / más interna es el sesgo GC. Se muestran las posiciones del origen de replicación (ORI) y el terminal (TER). **b**, En el plásmido pSLT los pares de bases se indican fuera del círculo exterior . El plásmido no está a escala. El esquema de colores es la misma que para (McClelland M, Kenneth E. S, John S, 2001).

5.7.- Tipificación de Bacterias Patógenas

La tipificación de las bacterias puede realizarse de diversas maneras siendo las más comunes las siguientes:

- Reacciones bioquímicas: laboratorios de microbiología clínica típicamente identifican un patógeno en una muestra clínica, purificando el microorganismo mediante siembra de una sola colonia del microorganismo en una placa, y luego realizando una serie de estudios bioquímicos que identificarán las especies bacterianas.
- Sistemas serológicos: antisueros seleccionados se pueden utilizar para clasificar las diferentes especies bacterianas. Esto puede basarse en cualquiera de los antígenos de hidratos de carbono o proteínas de la de la pared celular bacteriana o el polisacárido capsular. (Grupo A proteínas M estreptocócica O y H antígenos polisacáridos de salmonela).

Además, existen numerosos métodos de tipificación de especies, ya mucho más especializados. Estos son:

5.7.1 Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)

El método de Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP, restriction fragment length polymorphism) se basa en poner en contacto el DNA con enzimas de restricción, generando fragmentos de distintos tamaños. Los fragmentos de DNA que resulten variaran en tamaño y pueden separarse mediante electroforesis en gel y visualizarse por tinción con bromuro de etilo. Este es un análisis RFLP. Los microorganismos con el mismo patrón RFLP están estrechamente relacionados, mientras que aquellos con patrones RFLP muy diferentes lo están menos. Aunque los patrones RFLP son altamente reproducibles y muy exactos, es posible que surjan problemas en la determinación de los fragmentos de DNA, ya que pueden originarse cientos de éstos después de la digestión enzimática.

La electroforesis de campos pulsados (PFGE, Pulsed-field Gel Electrophoresis) fue ideada como una manera de simplificar la tipificación RFLP (Urwin R., Maiden M.C., 2003).

La PFGE suele producir un perfil cromosómico con 5 a 20 fragmentos con tamaños que varían entre 10 y 800 kb. Estos fragmentos se visualizan, se fotografían y se someten a un análisis de imagen. Luego se utilizan programas de computación para determinar si las hebras en análisis son distinguibles o indistinguibles y el grado de detección. El proceso ha sido denominado huellas del DNA (*DNA fingerprinting*) (Urwin R., Maiden M.C., 2003).

5.7.2 Tipificación multilocus de secuencias (MLST)

La tipificación de bacterias por medio de la tipificación multilocus de secuencias (MLST, Multilocus Sequence Typing), es un método que utiliza la secuencia de siete genes de expresión constante, o fragmentos de éstos entre 450-500 pb, para la diferenciación

bacteriana, ya que estos pueden ser secuenciados con buena precisión. Por cada gen de expresión se presenta una secuencia diferente en cada especie de bacteria que son asignadas para cada alelo y para cada uno, los alelos de cada uno de los siete loci definen el perfil alélico o tipo de secuencia (ST, Sequence type) (Urwin R., Maiden M.C., 2003).

En el MLST, las variaciones en los diferentes *locus* se detectan de forma directa por secuenciación del DNA en fragmentos de genes seleccionados, permitiendo la identificación de grupos de microorganismos con idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales) genotípicamente. Esto permite identificar todas las variaciones, no sólo aquellas que produzcan un cambio en la movilidad electroforética (Maiden M.C. ET AL., 1998).

El proceso de selección de los genes, así como de los fragmentos internos de éstos, debe ser realizado para cada especie bacteriana de forma individual, así que el método tiene una aplicación universal (Vázquez J A, Sonsoles B, 2004).

5.7.3.- Secuenciación de genes 16s rRNA

El uso de secuencias de genes 16s rRNA para estudiar la filogenia y taxonomía bacteriana ha sido el marcador genético más comúnmente utilizado por un número de razones. Estas razones incluyen:

1. Su presencia en casi todas las bacterias.
2. La función del gen 16s rRNA con el tiempo no ha cambiado, lo que sugiere que los cambios de secuencia al azar son una medida más precisa de tiempo (evolución).
3. El gen 16s rRNA (1500 pb) es lo suficientemente grande para los propósitos informáticos (Cedar H, Bergman Y, 2009).

Uno de los usos potenciales de las secuencias de los genes 16s rRNA es proporcionar género y la identificación de especies para los aislamientos que no encajan en los perfiles bioquímicos reconocidos, o para taxones que rara vez se asocian con las enfermedades infecciosas humanas. Los resultados acumulativos de un número limitado de estudios hasta la fecha sugieren que la secuenciación de genes 16s rRNA proporciona la identificación de género en la mayoría de los casos (> 90%) (Rodríguez P M, Esteller M, 2011. Hargreaves DC, Crabtree GR, 2011. Iorio MV, Piovan C, Croce CM, 2010).

Aunque la secuenciación de genes de 16s rRNA es muy útil en lo que respecta a la clasificación bacteriana, tiene baja resolución al momento de realizar reconstrucciones filogenéticas a nivel de especie y bajo poder discriminatorio para algunos géneros (Ooi SL, Henikoff S, 2007. Sánchez S L, Lamas M, 2011).

El uso de tecnologías basadas en microarreglos con 16s u otros genes en el futuro puede proporcionar una plataforma mucho más sensible y definitiva para la identificación de especies moleculares en el futuro (Rodicio M R, Mendoza M C, 2004. Sipos, 2010. Schloss, P. D, 2011).

5.7.4 Microarreglos

Los Microarreglos de DNA han emergido como la tecnología más utilizada para la cuantificación masiva de la expresión de genes y han sido aplicados a temas muy diversos entre las investigaciones biológicas en los últimos años. Un elemento fundamental para la aplicación exitosa de esta tecnología es el conocimiento de los pasos a seguir para la obtención y análisis de los datos de expresión (Zuckerandl E, Pauling L, 1965. DeRisi J, *ET AL.* 1996. Miranda J, Bringas R, 2008).

Los comienzos de la tecnología de referencia pueden ubicarse a mediados de los 90 con los estudios de Schena et al (Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang XC, Stern D, 1996) y Lockhart et al (Lee TI, Rinaldi MJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, Gerber GK, 2002). El

formato experimental, está basado en la síntesis o fijación de sondas, que representan los genes (o proteínas, o metabolitos), sobre un sustrato sólido (cristal, plástico, sílice, entre otros), y éstos son expuestos a las moléculas blanco (la muestra) (Castle J, Garrett-Engle P, Armour CD, Duenwald SJ, Loerch PM, Meyer MR, 2003).

El nivel de hibridación entre la sonda específica (*probe*) y la molécula diana (*target*) se indica generalmente mediante fluorescencia y se mide por análisis de imagen e indica el nivel de expresión del gen correspondiente a la sonda en la muestra problema (Castle J, Garrett-Engle P, Armour CD, Duenwald SJ, Loerch PM, Meyer MR, 2003).

Los Microarreglos se han aplicado al estudio de casi cualquier tipo de problema biológico, estudio de genes que se expresan diferencialmente entre varias condiciones:

- Sanos/enfermos, mutantes/silvestres, tratados/no tratados.
- Identificación de genes característicos.
- Detección de mutaciones y polimorfismos de un único gen.

5.8.-Secuenciación de Nueva Generación

El desarrollo en los últimos años de las denominadas tecnologías de secuenciación masiva permite actualmente obtener millones de secuencias de DNA a una velocidad sin precedente y a un costo cada vez más reducido. Estas tecnologías están permitiendo la aparición de logros científicos trascendentales, con la identificación de nuevos genes y la resolución de las bases genéticas de enfermedades mendelianas. Su potencial ha permitido el desarrollo de nuevas aplicaciones y pruebas biológicas (Rodriguez S B, Armegol L, 2012).

Actualmente, el abordaje del estudio del genoma ha cambiado de forma espectacular desde el lanzamiento, en 2005, del primer equipo de secuenciación masiva paralela o “next generation sequencing” (NGS) (Roche 454). Desde entonces se han desarrollado diferentes opciones tecnológicas para el análisis genético por ultrasecuenciación: 454 de Roche, HiSeq2000 de Illumina, SOLID 5500 de LifeTech, PGM de Ion Torrent, MiSeq de Illumina, Junior de Roche, Pac Bio, Helicos (Catarina A, Campusano O, Castillo S, Colla C, 2013).

En pocos años se ha evolucionado hasta la comercialización de plataformas con una capacidad de generación de datos muy elevada, incluso superior a los 180 Gb por corrida Illumina HiSeq2000, SOLID 5500, Helicos, la base científica de estos equipos NGS es:

- Selección de las regiones de interés del genoma mediante soluciones de enriquecimiento (basadas en “chips” o en solución como SureSelect de Agilent y EZ Exome/SeqCap de Nimblegen, o en solución solamente como Rain- Dance, TruSeq de Illumina o basadas en el uso de PCR como es el caso de Qiagen y Fluidigm) que permiten la separación específica de estas regiones del resto del genoma, aumentan la especificidad de la prueba y disminuyen los costos asociados a su estudio (Catarina A, Campusano O, Castillo S, Colla C, 2013).

- Gran capacidad de generación de datos, basada en la producción de varios millones de secuencias de tamaño discreto (entre 35 y 400 pb en los principales equipos de NGS) en varios días de reacción (de 1 a 12 días), dando lugar a que cada una de las posiciones sometidas a estudio sean finalmente secuenciadas varias decenas de veces, lo que en cierta medida facilita los procesos analíticos que se llevan a cabo a partir de los datos brutos (alineamiento, variant “calling”, anotación, entre otros). La generación de secuencias de tamaño relativamente pequeño dificulta enormemente el proceso de

alineamiento, hecho que no sucedía, por ejemplo, con la secuenciación convencional Sanger (Catarina A, Campusano O, Castillo S, Colla C, 2013).

Algunas de las aplicaciones más comunes de la secuenciación masiva son las siguientes:

5.8.1.- Epigenómica

La «*epigenética o epigenómica*» se basa en la existencia de un nivel de regulación de la expresión génica que no está relacionado con la secuencia de bases nitrogenadas sino con la organización estructural que ésta adopta en un momento determinado dentro del núcleo celular, se define como el estudio de los cambios de expresión génica que son potencialmente heredables y que no implican cambios en la secuencia del DNA. De la misma manera que en un idioma los signos de puntuación o los acentos modifican el sentido de una frase; la epigenética sostiene que la cromatina está marcada, acentuada, señalizada y que estas marcas determinan el significado funcional de la secuencia. Los componentes principales de la cromatina son el DNA y las proteínas histonas; ambas unidades son el blanco de modificaciones epigenéticas. El DNA está sujeto a la marcación de la metilación (adición de un grupo metilo, -CH₃) y la recientemente descrita hidroximetilación (adición de un grupo OH-CH₃), ambas marcas ocurren en el nucleótido citosina. En eucariotas, el proceso de metilación del DNA está mediado por las enzimas DNA metiltransferasas que son responsables del establecimiento del patrón de metilación del DNA durante el desarrollo embrionario y también de la transmisión de este patrón a las células hijas tras el proceso de replicación. La metilación del DNA puede modular la transcripción de genes a través de dos mecanismos: el impedimento físico de la unión de factores transcripcionales al promotor y la unión al DNA metilado de proteínas que, a su vez, reclutarán otras enzimas remodeladoras de la cromatina, que podrían modificar las

histonas y formar estructuras inactivas o silentes de cromatina (Cedar H, Bergman Y, 2009). Los estados de «hipermetilación» se han relacionado con una inhibición de la transcripción o de la expresión génica y los estados de «hipometilación» con inestabilidad cromosomal y abundancia de mutaciones. En consecuencia, se ha podido determinar que existe una estrecha relación entre el patrón de metilación del DNA y el proceso de carcinogénesis; siendo el estudio de la relación «metilación del DNA / cáncer» una de las áreas más activas y avanzadas de investigación tanto básica como clínica en el área (Watanabe Y, Maekawa M, 2010). Los patrones específicos de metilación del DNA se utilizan ahora como marcadores de diagnóstico y prognosis en diferentes tipos de cánceres e incluso ciertos fármacos epigenéticos han sido aprobados para su uso en clínica y han demostrado ser efectivos y menos tóxicos que la quimioterapia convencional (Watanabe Y, Maekawa M, 2010. Rodríguez P M, Esteller M, 2011).

5.8.2.-Transcriptómica

La transcriptómica estudia y compara transcriptomas, es decir, los conjuntos de RNA mensajeros o transcritos presentes en una célula, tejido u organismo. Como los proteomas, los transcriptomas son muy variables, ya que muestran qué genes se están expresando en un momento dado. Son particularmente interesantes para los científicos los transcriptomas de las células cancerosas y de las células madre, ya que pueden ayudar a entender los complicados procesos de carcinogénesis y de desarrollo y diferenciación celular (Lockhart D, Winzeler E, 2000).

La transcripción es un proceso nuclear cuya activación depende de estímulos intra o extracelulares que activan cascadas de señalización para determinar cuáles genes deben expresarse o reprimirse de acuerdo con el tipo de estímulo inicial. La cantidad de moléculas producidas de determinado mRNA depende de la función que este tenga en un proceso celular específico. Así, cuando se requiera dar respuesta a una condición determinada en la

cual un gen tiene una participación importante, más moléculas de este transcrito se producirán. De manera similar, bajo ciertas circunstancias particulares hay genes que permanecen apagados, pero un estímulo hace que se expresen y se inicia entonces la transcripción. De esta manera la determinación de dónde, cómo y cuándo es generado un transcrito, bajo una condición dada, es fundamental para el entendimiento de la actividad biológica de un gen. Más aún los niveles de mRNA pueden dar no solo una visión clara de patrones de expresión, sino también cuantificaciones altamente correlacionadas entre cambios en la abundancia de mRNA con cambios en la abundancia de proteínas. En conjunto, todos los transcripos derivados de genes que se producen en una célula en un momento y bajo una condición fisiológica determinada se denomina transcriptoma (Proudfoot, N, Furger A, Dye M, 2002).

5.8.3.-Metagenómica

La metagenómica realiza el análisis genómico de comunidades microbianas. Combina el concepto estadístico de meta-análisis referido al proceso en el que se relacionan estadísticamente análisis separados, con la genómica que es el análisis comprensivo del material genético de un organismo. Este nuevo campo trata de explorar un conjunto de secuencias de DNA que constituyen parte del material genético de una comunidad y que responden a genomas de distintos organismos.

Si se tiene en cuenta que el número estimado de procariotas (organismos unicelulares sin núcleo) presentes en el planeta es mayor que 10^{29} se comprende que, en los distintos ecosistemas biológicos, se hallen en cantidades considerables (Gilbert & Dupont, 2011). Todos poseen una estructura genética y algunos tienen especial incidencia en los procesos de transformación química que ocurren en el medio que habitan, aunque la mayoría de estos microorganismos no pueden ser cultivados en laboratorios a efecto de extraer su DNA e investigar su genoma. Se estima que 1% de todas las especies bacterianas que habitan el planeta se pueden cultivar y estudiar aisladas en el laboratorio.

Es posible determinar su existencia a través de su DNA. Las técnicas descritas para obtener DNA a partir de muestras ambientales no requieren cultivo y constituyen hoy en día la mejor herramienta para establecer la existencia de bacterias y los ambientes en que se desarrollan (Grice & Sangre, 2012).

Los análisis metagenómicos se pueden dividir en dos grandes categorías. La primera incluye estudios por los cuales se intenta obtener la mayor cantidad de secuencias posibles, operando en una forma análoga al secuenciado de un único genoma descrito anteriormente. Así la muestra contiene fragmentos provenientes de muchos genomas diferentes. En general dada una muestra de una comunidad, no es posible ensamblar genomas individuales, pero se obtienen conjuntos de datos con secuencias parciales que en algún caso se pueden asignar a especies conocidas. Esta estrategia se denomina con sus siglas WGS, del inglés “Whole Genome Sequencing”. El segundo análisis metagenómicos se conoce con el nombre de “Análisis de Marcadores”. El objetivo de este tipo de estudio es obtener secuencias de uno, o unos pocos, genes predeterminados, para establecer a que especie pertenece (Gilbert & Dupont, 2011).

5.9.-Genotecas

Uno de los tipos de clonación molecular más frecuente es la elaboración de genotecas (bibliotecas genómicas o mal llamadas librerías genómicas). En este tipo de clonación todo el genoma de un microorganismo se almacena en múltiples fragmentos individuales constituyendo una genoteca de DNA que es característico de la especie. Las genotecas se pueden almacenar por largos periodos de tiempo y se recurre a ellas cada vez que interese rastrear y aislar una secuencia concreta perteneciente a ese organismo. Para el rastreo es necesario tener una sonda que nos permita “pescar” la secuencia deseada, normalmente por hibridación (Izquierdo R M, 2014).

Para tener una genotecas deberemos tener:

- Un sistema eficiente de clonaje de DNA, puesto que deberemos manejar un número considerable de clones.
- Un sistema de selección de los clones que nos interesan de entre toda la colección.
- Un sistema para la obtención de una muestra representativa del ADN a estudiar.

Esto es con los sistemas tradicionales de clonación, actualmente los métodos de secuenciación toman esta idea, formando genotecas bacterianas sin embargo estas no se almacenan dentro de plásmidos bacterianos, en lugar de esto al DNA se adicionan en los extremos secuencias específicas llamadas adaptadores.

5.9.1.-Tipos de genotecas en la secuenciación masiva

La genoteca en la secuenciación masiva, es una colección aleatoria de fragmentos de DNA que en conjunto representan una parte o el genoma completo de un organismo. Actualmente existen diferentes tipos de genotecas que se pueden construir la para la secuenciación masiva. La primera de estas es la genoteca "*Single-end*", en donde por cada fragmento de DNA se realiza una sola lectura, es decir, la secuenciación de este genoteca se realiza en un solo sentido de 5' a 3'. Otro tipo de genotecas es la secuenciación por medio de genotecas "*Paired-end*" permite secuenciar los dos extremos de un fragmento y generan alta calidad, de datos de la secuencia deseada. Las genotecas "*Paired-end*" facilitan la detección de reordenamientos genómicos y elementos de secuencia repetitivos, así como fusiones de genes y nuevas transcripciones. Finalmente las genotecas "*Mate-pair*" la

lectura solo se realiza por uno de los extremos que es donde se encuentra el marcador para su identificación (Fig. 3 Paired end y Mate pair).

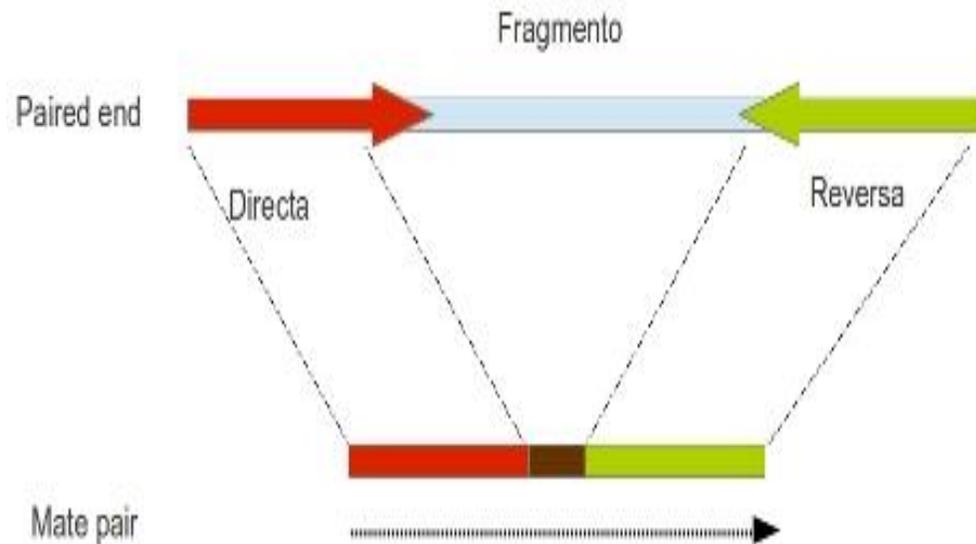


Fig. 3 Genotecas “Paired-end” y “Mate-pair”. Donde se denota el sentido de lectura de las secuencias, en la primera ocurre por cada uno de los extremos directa (3´) y reversa (5´) mientras que en la segunda solo por el extremo 3´ que sería directa.

5.10.- Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

Las siglas PCR son en inglés de *Polymerase Chain Reaction* o Reacción en Cadena de la Polimerasa (Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R, 1993). La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de DNA utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), Cuando se realiza una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el DNA, en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el DNA del organismo que quiere amplificar o estudiar, los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto

pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de $MgCl_2$, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa) (Weighardt F, 2000).

La PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del mRNA procedente de células o tejidos (Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C, 2013). La PCR se aplica en diferentes áreas de las ciencias biológicas y de la salud, formando parte del quehacer científico de muchos laboratorios de investigación que la utilizan principalmente para expresión génica, genotificación, detección de patógenos y análisis de mutaciones (Cariello NF, Swenberg JA, Skopek TR, 1991). Se ha convertido en una herramienta muy importante en la biología molecular (Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW, 2005).

Los primeros que sentaron las bases para desarrollar la PCR en tiempo real fueron Higuchi y colaboradores, en 1992, al videograbar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al DNA durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV (Alleguea C, Campuzano O, Castillo S, Colla M, Iglesias A, Brugada R, 2013). Desde entonces, el objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción (Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C, 2013).

El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de DNA en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible

detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción (Pisabarro G, 2009) sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como sucede en la PCR punto final. La nomenclatura que se usa también es diferente, si utilizamos DNA genómico entonces hablamos de una qPCR (quantitative PCR), si por lo contrario, primero obtenemos cDNA y luego hacemos la PCR, nos referimos a una RT-qPCR (Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW, 2005).

La PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia (Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C, 2013).

Los ingredientes químicos en la PCR en tiempo real, son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg⁺ y buffer se venden juntos en una solución conocida como "Master mix" y el sistema reportero de fluorescencia, en este caso se utilizó SYBR Green el cual se va a unir a DNA de doble cadena por lo que emite fluorescencia cuando se intercala en la doble hélice del mismo así detectar los productos amplificados, el agua debe de estar libre de nucleasas (Cariello NF, Swenberg JA, Skopek TR, 1991).

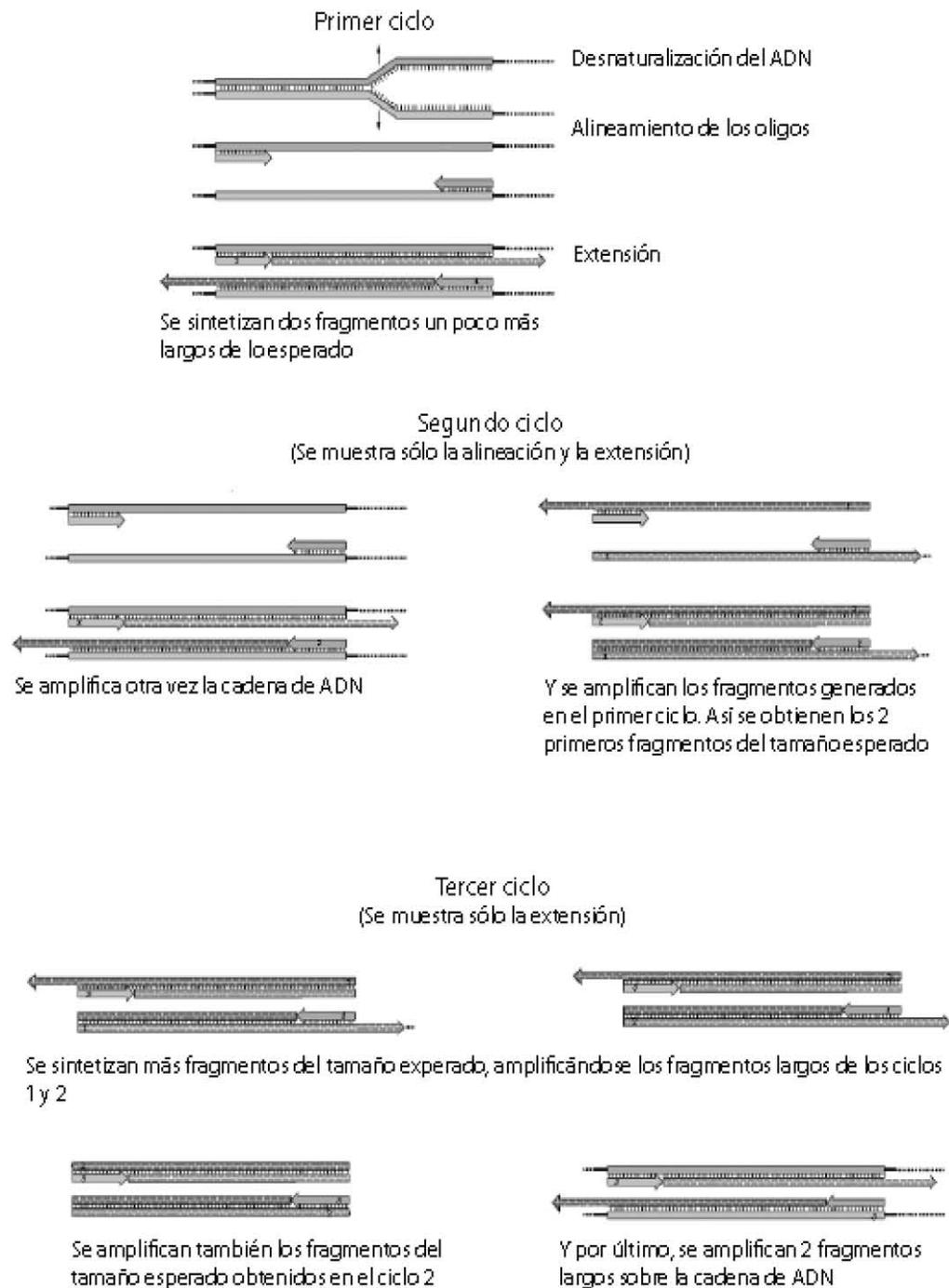


Figura 4. Descripción del proceso de una PCR en los primeros ciclos de reacción. Se muestra la desnaturalización, alineamiento y extensión, pasos de la PCR

Los kits KAPA Library Quantification combinan un juego de estándares de ADN para proporcionar un método rápido, sensible y completamente fiable de cuantificación de las moléculas amplificables en las librerías de Next Generation Sequencing (Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R, 1993).

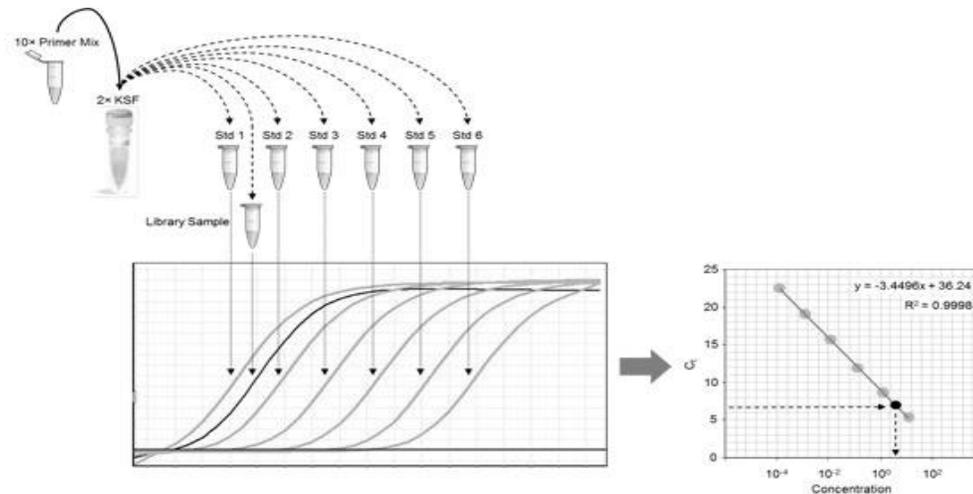


Fig. 5 Preparación de la curva estándar y la muestra. (Esta curva cuenta con seis estándares para formar la curva de cuantificación)

5.11.- Electroforesis de microfluidos

La electroforesis es un método de separación basado en la movilidad de las biomoléculas en una fase líquida sometida a un campo eléctrico. Las moléculas que posean carga negativa migrarán hacia el polo positivo de un aparato electroforético y viceversa. La inclusión de una matriz sólida, además de la fase líquida, permitió agregar un nuevo punto de separación y versatilidad en la electroforesis (Smithies, 1955). De esta manera, no solo las biomoléculas pueden ser separadas por su carga, sino también por su tamaño. La

inclusión de una matriz permite algo que invariablemente sorprende a los estudiantes de biología molecular: recuperar físicamente a la biomolécula que ha sido separada en un gel, con la ayuda de una navaja y un agente de visualización.

El aparato electroforético moderno tiene los siguientes componentes: un contenedor que evite la contaminación y derramamiento de las biomoléculas, dos polos que atraerán a las biomoléculas, una fuente de poder generadora de campo eléctrico regulable, una matriz que permita un segundo punto de resolución y finalmente, una solución amortiguadora de pH que mantenga la integridad de las biomoléculas (Smithies, 1955).

El bioanalizador es una plataforma basada en la tecnología de microfluidos diseñada para la determinación del tamaño, la cuantificación y el control de calidad de ADN, ARN y proteínas en un único instrumento, mediante electroforesis en pequeños chips. Los resultados se obtienen en un corto espacio de tiempo de forma automatizada, directamente en formato digital (Agilent 2100 Bioanalyzer, 2007).

La miniaturización de los instrumentos analíticos ofrece numerosas ventajas frente a las técnicas convencionales. Entre ellas, una mejor precisión y reproducibilidad de los datos, tiempos de análisis reducidos, un mínimo consumo de muestra o una mejor automatización e integración de flujos de trabajo complejos (Smithies, 1955).

Aplicaciones

- Comprobación de calidad del ARN con RIN: ofrece datos del ARN total, ARNm y ARN pequeño incluyendo el algoritmo RIN (por las siglas en inglés de “número de integridad del ARN”)
- Tamaño y cantidad del ADN: separación y cuantificación de alta resolución del ADN.

- Alternativa a SDS-PAGE para el análisis de proteínas: modo rápido y fiable de determinar la cantidad y la pureza de proteínas en todo el rango de sensibilidad desde el azul Coomassie hasta la tinción con plata (Agilent 2100 Bioanalyzer, 2007).

5.12.- Evaluación de métodos cuantitativos

Cuando se realizan análisis es importante producir datos de buena calidad, para esto hay que aplicar algunos criterios clave. Es necesario establecer los sistemas de garantía de calidad y de control de calidad, que aseguran que el sistema está funcionando adecuadamente y que confirme la calidad de los datos (Burkhardt H J, 2001).

La toma, preparación y transporte de muestras y los métodos de extracción de ácidos nucleicos son, parámetros esenciales en la realización de un ensayo y deberían optimizarse para el diagnóstico. Los métodos adecuados varían del tipo de muestra y del organismo (Burkhardt H J, 2001).

Todo el equipo utilizado en el proceso debe mantenerse correctamente. Los aparatos que requieren calibración (bloques de calentamiento, refrigeradores, congeladores, termocicladores, pipetas, etc.) deben calibrarse según los protocolos de calidad del laboratorio (Brambila E, 2000).

Cuando se realicen las pruebas de PCR, es necesario optimizar todos los parámetros, los protocolos y los reactivos. Un ensayo estandarizado es un método que de forma consistente produce el mismo resultado para una muestra dada cuando se repita varias veces.

Durante la optimización de la prueba se puede estimar la resistencia del método a ser afectado por pequeños cambios en los parámetros principales. La introducción de variables intencionales en el proceso de validación caracterizará los parámetros fundamentales de la prueba. Los ejemplos de tales parámetros son: los tiempos y temperaturas de incubación, caducidad de los reactivos, los cebadores etc., cantidad de otros componentes añadidos, etc.). La caracterización de dichos parámetros de control es crucial para la identificación de los puntos críticos que deben controlarse correctamente en el ensayo (NMX-CH-152-IMNC-2005)

La repetitividad y la reproducibilidad son dos parámetros importantes de la precisión de un ensayo. La repetitividad se mide como el grado de concordancia entre las réplicas probadas durante la realización de un ensayo y las probadas en distintas realizaciones del mismo ensayo. La reproducibilidad se determina utilizando un ensayo idéntico (protocolo, reactivos y controles) en diferentes laboratorios (Burkhardt H J, 2001).

Los métodos basados en el ADN deben detectar, identificar y cuantificar los niveles de secuencias específicas de ADN (NMX-CH-152-IMNC-2005)

Actualmente, el método de detección basado en ADN suele consistir en la metodología de la PCR e incluye:

- Un protocolo que describe un método de extracción que es aplicable a una matriz pertinente (Burkhardt H J, 2001).
- Un protocolo que describe las condiciones, incluido el aparato empleado, en las que se puede utilizar la PCR para detectar la secuencia de ADN diana (Burkhardt H J, 2001).

- Una descripción de las secuencias cebadoras del oligonucleótido que amplifican de manera inequívoca la secuencia de ADN diana (Burkhardt H J, 2001).
- Si procede, una descripción de las secuencias de sonda del oligonucleótido fluorescente que identifican de manera inequívoca la secuencia de ADN diana (Burkhardt H J, 2001).
- Una descripción de las secuencias cebadoras del oligonucleótido que amplifican una secuencia de ADN específica al taxón la cual debería estar presente en la matriz convencional del alimento independientemente de la presencia del analito específico a fin de diferenciar un resultado negativo de los procesos fallidos de extracción o amplificación y para cuantificar la cantidad del ADN diana en relación con el ADN específico al taxón.
- Una descripción del método utilizado para detectar el ADN.
- Muestras y normas de control apropiadas.
- Descripciones de las operaciones realizadas para calcular el resultado (Burkhardt H J, 2001).

Para la validación es conveniente utilizar una o varias de las técnicas siguientes para la determinación del desempeño de un método:

1. La validación de métodos microbiológicos debe ser reflejo de las condiciones de ensayo reales. Esto se puede conseguir utilizando muestras contaminadas naturalmente o muestras contaminadas o fortificadas a un determinado nivel. En general, el proceso consiste en la preparación de una muestra agregando el material interferente a una muestra real que contenga el material a ensayar. Una segunda

alícuota de la muestra original se diluye con un solvente, y ambas se analizan determinándose la diferencia entre ambas (Brambila E, 2000).

2. Uso de materiales de referencia o materiales de referencia certificados. Esta alternativa tiene algunos inconvenientes como el elevado coste económico, la posibilidad y facilidad de encontrar un material de referencia suficientemente representativo de la muestra a validar (Brambila E, 2000).

3. Comparación de resultados obtenidos con otros métodos alternativos. Se analizan muestras de pacientes por el método en estudio y otro método de comparación, luego se estima el error sistemático basándose en las diferencias observadas entre ambos métodos. El método de comparación debería ser, en la medida de lo posible, el de referencia (gold standard) (Brambila E, 2000).

4. Comparaciones inter-laboratorios (validación por pares de valores). La validación por pares de valores es aplicable cuando no es posible utilizar ninguno de los métodos anteriores, es decir no es posible realizar contaminación artificial de las muestras, no se puede disponer de muestras de valor de referencia estable, o cuando siéndolo no se disponga de cantidad suficiente. Esta sistemática se basa en la utilización de resultados de inter-comparaciones en las que haya participado el laboratorio, y utilizar estos datos como valores de referencia. La participación en inter-comparaciones permite una evaluación del sesgo de forma que el laboratorio pueda demostrar que se mantiene dentro de los criterios de aceptación definidos por normas, reglamentos, por el cliente o por el laboratorio (Brambila E, 2000).

6. Planteamiento del Problema

6.1 Justificación

El Centro Nacional en Detección de Referencia de Organismos Genéticamente Modificados (CNDROGM), emplea la NGS para la identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), las cuales constituyen un importante problema de salud pública (FAO y OMS, 2001), esto debido a que se ha constatado un aumento de su frecuencia, y durante el proceso de secuenciación de estos microorganismos, uno de los pasos cruciales es la cuantificación de la genoteca para tener una adecuada secuencia de ADN del organismo de interés. En la actualidad se han descrito diversos métodos para la cuantificación de genotecas, sin embargo no se ha hecho una comparación sobre cuál de éstos ofrece mejores rendimientos, por ello en este trabajo se realizó una evaluación de los métodos desarrollados para la cuantificación de la genotecas de ADN, para así tener mayor certeza en los pasos posteriores de la secuenciación y no tener sobreestimada la cantidad de genoteca lo que disminuye el rendimiento en los procesos posteriores a la elaboración de la genotecas.

7.2- Objetivos

7.21.-Objetivo General

- Analizar los métodos de cuantificación de genotecas por la técnica de qPCR y electroforesis capilar mediante una comparación estadística de los resultados obtenidos para determinar cuál proporciona mejores resultados, para su utilización en la plataforma de secuenciación masiva PGM ION TORRENT.

7.2.-Objetivos Particulares

1. Extraer DNA genómico de aislados bacterianos procedentes de alimentos y determinar la concentración del material genético.
2. Establecer las condiciones adecuadas para la fragmentación de DNA, con el fin de obtener segmentos genómicos de alrededor de 400pb.
3. Elaborar genotecas para secuenciación masiva y cuantificarlas por los métodos: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y electroforesis de microfluidos.
4. Comparar los resultados de los métodos de cuantificación de las genotecas, mediante el desarrollo de pruebas inter ensayo e intra ensayo.

8.-Estrategia experimental

La metodología consistió en la extracción de ADN bacteriano, seguido de su cuantificación, después un proceso de fragmentación, que se realizó por dos métodos el mecánico y enzimático, posteriormente, se llevó a cabo una reacción de ligación de adaptadores, seguido de un proceso de selección de tamaño de los fragmentos de ADN (400 pb), para después someter las genotecas a un proceso de amplificación para finalizar con la cuantificación de las moléculas mediante el Bioanalizador y la qPCR, lo anterior se ejemplifica en el siguiente diagrama de flujo:

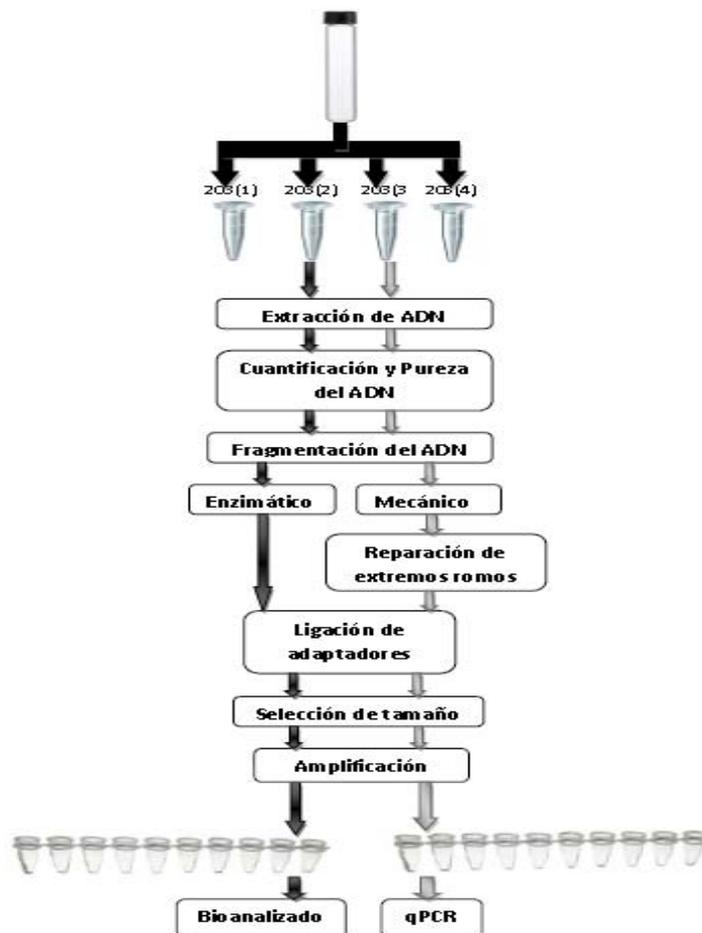


Fig. 6 Flujo de trabajo

9.-Materiales y métodos

La extracción del DNA se partió de un tubo con 5 mL de caldo, la cual se alicuotó en cuatro tubos. A los cuales se les realizó todo el proceso de extracción.

9.1.- Extracción de DNA

La extracción de DNA de las bacterias, se realizó mediante la metodología del sistema Genomic DNA Extracción Kit. Esto se llevó a cabo utilizando 1 mL de la suspensión bacteriana, en el caso de bacterias Gram positivas se utilizó una velocidad de centrifugación de 6000 rpm/10 min y para las bacterias Gram negativas se utilizó la velocidad de 3000 rpm/10 min, para concentrar las bacterias en un pellet. Posteriormente se agregaron 500 µL de Buffer TE 1X y nuevamente se centrifugó y se re-suspendió en 200 µL de Buffer TE 1X más 40 µL de lisozima (10 mg/mL). Posteriormente se agitó e incubó a 37 °C por 30 min. Se centrifugó a 10000 g/5 min y se desechó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de Buffer de lisis y 10 µL de Proteínasa K (10 mg/mL). Se volvió agitar e incubar a 65 °C durante 30 min a la velocidad de 600 rpm. Se agregó 750 µL de Cloroformo y se agitó con el vórtex y se centrifugó a 10,000 g/5 min. De la fase superior se toman 800 µL y se colocan en el tubo de 2 mL nuevo. Se agregaron 800 µL del Buffer de unión se agitó en el vórtex y se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 s. Después se realizaron tres lavados agregando 500 µL de la solución de lavado, se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 s. A continuación se realizaron dos lavados agregando 700 µL de Etanol al 75 %, centrifugar a 10,000 rpm/30 s. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 30 s, para eliminar el exceso de etanol y secar la columna. La columna se colocó en un tubo de 1.7 mL y se le agregaron 50 µL de Buffer TE 1X (previamente calentado a 65°C). Se dejó incubar 65 °C/10 min. Finalmente se añadió 50 µL de Buffer TE 1X y se centrifugó a 10000 rpm/30 s. Los 100 µL obtenidos se colocaron en un tubo nuevo, se etiquetaron y conservaron a -20 °C.

9.1.1.-Cuantificación y Pureza del DNA

De las muestras de DNA se tomó 1 μL para ser evaluadas en el Nano Drop 2000 (un espectrofotómetro), a 260 y 280 nm, para así determinar la concentración del DNA en $\text{ng}/\mu\text{L}$ y la relación de pureza del mismo.

9.2.-Fragmentación del DNA (400pb)

9.2.1.- Método enzimático

La fragmentación del DNA se llevó a cabo utilizando el “Ion Shear [™] Plus Reagents Kits”, para esto se partió de 35 μL de DNA con una concentración de 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Se agregaron 5 μL de 10X Reaction Buffer y 10 μL de Enzyme Mix II, posteriormente se incubó a 37°C durante 7.5 s pasado el tiempo se agregaron 5 μL de Buffer Stop y se colocaron inmediatamente en hielo.

9.2.2.- Fragmentación mecánica (Sonicación)

Otro método alternativo en la fragmentación del DNA es la Sonicación, este se llevó a cabo por el equipo Covaris [™]. Para este proceso se necesitó DNA a una concentración de 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ que se colocó en un microtubo de 0.6 mL y se colocó en el equipo previamente programado a 300 ciclos por 80 s, (Parámetros estandarizados por Verónica Aidé Olvera, 2016, Q.F.B., Facultad de Estudios Superiores Zaragoza) para así poder obtener fragmentos de DNA adecuados de aproximadamente 400pb. Posterior a la fragmentación se realizó un proceso de purificación, esto fue de la siguiente manera: se agregaron 99 μL a un tubo de 1.5 mL de “Agencourt AMPure” y se dejó 5 min a temperatura ambiente, se colocó el tubo en una barra magnética (MPC) por 3 minutos y se retiró el sobrenadante, después se agregaron 500 μL de etanol al 70 % e incubo por 30 s, durante este tiempo se giró el tubo a 180° constantemente, transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante, este paso se repitió una vez más, se retiró el exceso de etanol agitando el tubo en el vórtex y colocando

en una microcentrifuga y se volvió a colocar el tubo en la barra magnética por un lapso de 5 min, el tubo se dejó abierto para que el exceso de etanol se evaporara, posteriormente se agregaron 25µL de la solución “Low TE”, y se agitó en el vórtex y se colocó nuevamente en la barra magnética para así retirar el sobrenadante que es donde queda contenido el DNA fragmentado y ya purificado.

9.3.-Reparación de los extremos romos y ligación de Adaptadores

Posteriormente se llevó a cabo la reparación de extremos romos y una ligación de adaptadores, (este paso solo se llevó a cabo en el DNA que se fragmento mediante Sonicación) implementando el “Ion Plus Fragment Library Kit” y “Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 kit. La reacción para cada muestra se llevó a cabo en un tubo de 0.6 mL con una siguiente mezcla de reacción presentada en la Tabla 2.

Tabla 2 Reacción de ligación

Componente	Volumen (µL)
DNA	25
10X Ligase Buffer	10
Ion P1 Adapter	2
Ion Xpress™ Barcode X	2
dNTP Mix	2
Nuclease-free Water	49
ADN Ligasa	2
Nick Repair Polymerase	8

Se colocó el microtubo en un termociclador y se realizó el programa de termociclado presentado en la Tabla 3 para la reacción de ligación:

Tabla 3 Temperatura y tiempos en el termocicador para la reacción de ligación

Temperatura	Tiempo
25 °C	15 min
72 °C	5 min
4 °C	

Después de la ligación sigue un proceso de purificación, esto se realizó de la siguiente manera: se agregaron 100 μL a un tubo de 1.5 mL de Agencourt AMPure y se dejó 5 min a temperatura ambiente, se colocó el tubo en una barra magnética (MPC) por 3 minutos y se retiró el sobrenadante, después se agregaron 500 μL de Etanol al 70 % e incubo por 30 s, durante este tiempo girar el tubo a 180° constantemente, transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante, el lavado con etanol se realizó una vez más; se retiró el exceso de etanol agitando el tubo en el vórtex y colocando en una microcentrifuga, se volvió a colocar el tubo en la barra magnética por un lapso de 5 min, el tubo se dejó abierto para eliminar el exceso de etanol, posteriormente se agregaron 20 μL de la solución “Low TE”, se agitó en el vórtex y se colocó nuevamente en la barra magnética al menos 1 min, se transfirió el sobrenadante a un microtubo de baja retención.

9.4.-Selección de tamaño

9.4.1.-Pippin Prep™

Para la selección del tamaño se utilizó el equipo Pippin Prep™ el cual utiliza un cassette en los cuales están colocados canales con gel de agarosa y con buffer que contiene bromuro de etidio, este actúa como una típica electroforesis en gel, para este procedimiento se necesitó 20 μL de DNA ligado mas 10 μL de “Low TE” y 10 μL de “Loading solution”, esto por cada muestra, cada una de ellas se colocó en su pozo correspondiente, y se colocó un marcador de peso molecular, se puede seguir la electroforesis visualmente (esto en la pantalla del equipo) para así terminando el tiempo de corrimiento que es de 1 hora y 40 min, en un pozo

en el extremo opuesto a donde se colocó la muestra, es donde se recupera al DNA fragmentado con un tamaño promedio de 475 pb.

9.5.-Amplificación

Posteriormente a la selección de tamaño, se requiere que el DNA sea amplificado, esto se realizó para cada alicuota en un tubo de 0.6 mL con una mezcla de reacción como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4 Componentes de la reacción de amplificación

Componente	Volumen (μL)
	50-100
Platinum® PCR SuperMix High Fidelity	100
Library Amplification Primer Mix	5
Unamplified Library	25
total	130

Se colocaron los tubos en el termociclador y se programó el protocolo para PCR que se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5 Temperatura y tiempos en el termociclador para la reacción de amplificación

	Paso	Temperatura	Tiempo
1 Ciclo	Desnaturalización	95 °C	5 min
8 Ciclos	Desnaturalización	95 °C	5 s
	Alineamiento	58 °C	15 s
	Extensión	70 °C	1 min
Mantener	---	4 °C	-----

9.6.-Verificación de tamaño de fragmentos

9.6.1-Bioanalizador

Una vez extraído y fragmentado el DNA se procede a verificar que tenga el tamaño promedio esperado, aproximadamente 400 pb, para ello se utilizó el Bioanalyzer 2100, equipo que utiliza “chips” semiconductores, el cual viene diseñado en filas y columnas de cuatro pozos dando un total de 16, éste se va a colocar en una estación, en el pozo marcado con una G se colocaron 9 μL de “gel-dye mix”, y se aseguró de que el émbolo de la jeringa se encuentre en 1 mL, se contó 1 min en el cronómetro, se cerró la estación y se bajó el émbolo hasta el fondo dejando transcurrir un minuto, después de transcurrir este tiempo se liberó el émbolo hasta que subió al volumen de 1 mL, y se abrió la estación. Se colocaron 9 μL de “gel-dye mix” en cada uno de los demás pozos marcados con G, posteriormente se colocaron 5 μL en los 12 pozos restantes y 1 μL de marcador de peso molecular en el pozo marcado con una escalera y se colocó un volumen de 1 μL de cada muestra en cada uno de los pozos, posteriormente se colocó el “chip” en IKA vórtex para mezclar los componentes, por 1 min. Finalmente se introdujo el chip en el Bioanalizador 2100 y se corrió el programa determinado para la cuantificación y verificación de los fragmentos del DNA. En la Figura 7 se muestra de manera general como se coloca la muestra, en que parte del equipo se introduce el chip y una imagen del Bioanalizador 2010 y un equipo de cómputo en el cual se lleva a cabo la cuantificación en tiempo real.



Fig. 7: 1.-Estación donde se carga el “chip” con el “gel-dye mix”. 2.- Colocación de las muestras. 3.- Colocación del chip en el Bioanalizador 2010. 4.- Bioanalizador 2010 y un equipo de cómputo en el cual se lleva a cabo la cuantificación. 5.-“Chip”

9.6.2.-qPCR

Para la determinación del número de moléculas presentes en la genoteca se procedió a la realización de una qPCR.

Se realizó el llenado de una placa para PCR, en la cual se colocó una serie de seis estándares en la placa (reacciones por triplicado para las diluciones 1: 500, 1: 1000, 1: 2000 y 1: 4000, la concentración de los estándares se puede ver en Tabla 8, posterior a esto, utilizando el “KAPA Library Quantification Kit” se llevó a cabo la mezcla de reacción para cada muestra la cual se indica en la Tabla 6.

Tabla 6 Mezcla de reacción para cuantificación

Componente	Volumen (μL)
KAPA SYBR [®] FAST qPCR Master Mix	12
Library DNA or DNA standard	18
Total	30

Después de la mezcla de reacción se centrifugó a 3400 rpm y se colocó la placa en el termociclador (LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System) y se realizó el programa presentado en la Tabla 7 Temperatura y tiempos en el termociclador para la cuantificación:

Tabla 7 Temperatura y tiempos en el termociclador para la cuantificación

	Paso	Temperatura	Tiempo
1 Ciclo	Activación/Desnaturalización	95°C	5 min
35 Ciclos	Desnaturalización	95°C	30 s
	Extensión	60°C	40 s
Mantener	-----	4°C	-----

Posteriormente se retiró la placa del equipo y se extrajeron los datos para su análisis.

Tabla 8 Concentración de Estándares

Numero de estandar	Factor de dilucion	(Copias de DNA/ μ L) ³
Std 1	3.2	50000000
Std 2	0.32	5000000
Std 3	0.032	500000
Std 4	0.0032	50000
Std 5	0.00032	5000
Std 6	0.000032	500

9.8.- Bioanalizador

Para la determinación de la concentración de las genotecas mediante el Bioanalizador se siguió el mismo procedimiento explicado en el punto 9.6.1

9.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los grupos de datos se utilizó el programa SPSS que es una aplicación para el análisis de datos de tipo estadístico y es todo un referente utilizado por instituciones gubernamentales, empresas y centros de investigación de todo el mundo. La interfaz que ofrece este programa le permite al usuario introducir datos, construir gráficos y tablas descriptivas o diagramas.

Para este estudio se realizó un análisis estadístico de los dos grupos de datos, obteniendo la media, la varianza y desviación estándar, esto para, poder determinar si los datos denotaban una tendencia normal o no, aplicando la prueba de Shapiro-Wilk, Para posteriormente poder analizar ese grupo de datos mediante una prueba de t de student, esta para datos con distribución normal, y para datos que no cumplieran con este requisito

se utilizó la prueba de Mann-Whitney, que permite el análisis de grupos de datos con tendencia normal y otro no, o ambos sean los que no presenten distribución normal.

10.-Resultados

10.1 Extracción de DNA de muestras de *Salmonella*

La elaboración de genotecas es uno de los pasos importantes para poder obtener la secuencia genética de un organismo, porque se necesita tener segmentos de DNA cuyo tamaño oscile entre 450 a 480 pb para la plataforma Ion Torrent PGM, además de una correcta concentración de ésta, para posteriormente poder ser amplificada por medio de una PCR de emulsión. Para evaluar la concentración de las genotecas para la plataforma Ion Torrent PGM se han desarrollado distintos métodos, es por ello que en este trabajo evaluamos cuál de los métodos disponibles para cuantificación de genoteca, provee mejores resultados.

Antes de la elaboración de la genotecas, se requiere de un DNA como materia prima, por ello una de las primeras etapas de este trabajo, consistió en la extracción del material genético de las células bacterianas para lo cual se utilizó el Fast Id Kit.

Mediante espectrofotometría se pudo determinar la concentración y la pureza de la muestra de DNA basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada.

Entonces para cumplir con los objetivos planteados, primero se realizó la extracción de DNA, de una muestra de *Salmonella*, para la cual se tomó un tubo de 5 mL con caldo bacteriano, éste se alicuotó en 4 tubos Eppendorf de 1.2 mL, con el objetivo de extraer DNA por cuadruplicado, una vez terminada la extracción se evaluó la calidad y concentración del material genético por espectrofotometría obteniendo las concentraciones mostradas en la Tabla 9, donde también se muestra la proporción A 260/280 y donde en todos los casos se

fue superior a 1.8 por lo que se consideró que tenía el nivel de pureza suficiente para la elaboración de genotecas.

Tabla 9. Concentración y pureza del DNA

Muestra	[η g/ μ L]	260/280
<i>Salmonella (1)</i>	45.2	2.06
<i>Salmonella (2)</i>	49.9	2.02
<i>Salmonella (3)</i>	77.8	1.99
<i>Salmonella (4)</i>	42.6	2.08

10.2 Estandarización de la fragmentación de DNA

Una vez obtenido el DNA, se procedió a la fragmentación de este material genético, por dos métodos: el mecánico por medio de ondas ultrasónicas (sonicación) y enzimáticamente mediante endonucleasas, esta etapa quedó estandarizada como se indica a continuación para los dos métodos, con las siguientes condiciones. Para el primer método se utilizaron las condiciones que se presentan en la Tabla 10, con estos parámetros se obtuvieron fragmentos de 400 pb.

Tabla 10 Parámetros establecidos para la Fragmentación mecánica

Peak Power (Watt)	Duty Factor (Percent)	Cycles/Burst (Count)	Duration (seconds)
75.0	20.0	300	80

El tamaño de los fragmentos obtenidos se verificó mediante una electroforesis de microfluidos, los resultados obtenidos se pueden ver el Figura 8.

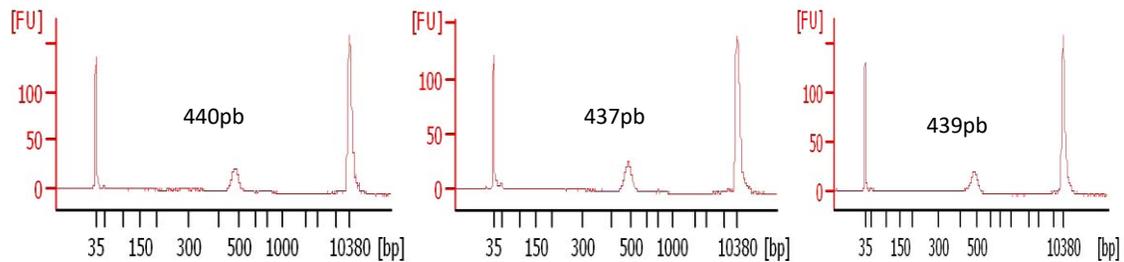


Figura 8. Fragmentación por sonicación por triplicado de una sola muestra de *Salmonella*. (En este se observan tres repeticiones de fragmentación de la misma muestra, ya purificada bajo las condiciones de la Tabla 10.)

Con las condiciones utilizadas (Tabla 10) se observó que los fragmentos de DNA obtenidos se encontraron dentro del rango de 437 pb a 440 pb, con lo que se puede decir que su distribución de tamaños es homogénea.

Por otro lado, la muestra que se fragmentó de forma enzimática utilizando el tiempo de 7.5 minutos de reacción, tiempo durante el cual las endonucleasas escinden el material genético de forma azarosa, después los fragmentos se purificaron y de igual forma se verificaron los tamaños obtenidos mediante una electroforesis de microfluidos (Figura 9).

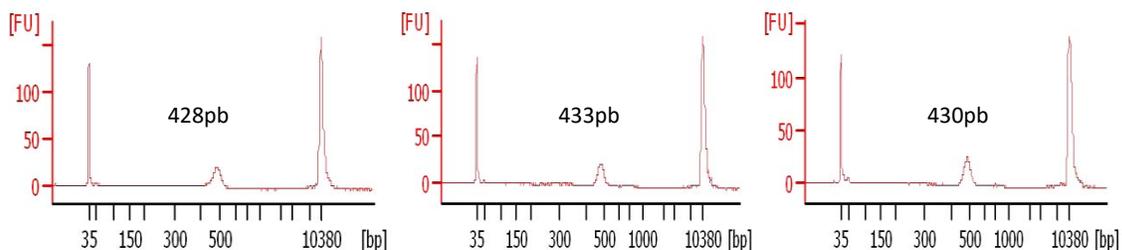


Figura 9. Fragmentación enzimática por triplicado de una sola muestra de *Salmonella*. (En este se observan tres repeticiones de fragmentación utilizando el tiempo de 7.5 min de reacción.)

Los fragmentos de DNA obtenidos por medio del rompimiento enzimático presentan tamaños entre 428 pb a 430 pb, un poco más pequeños a los que se obtuvieron por medio de la sonicación, sin embargo de igual forma se observa que la distribución de los fragmentos es uniforme.

Con los resultados anteriores de fragmentación se puede decir que los procesos de fragmentación de DNA se estandarizaron, porque bajo las condiciones mencionadas se observaron que en las tres repeticiones se obtuvieron resultados similares.

10.3 Elaboración de genotecas para la plataforma Ion Torrent

Una vez teniendo estandarizados los tiempos de reacción y número de ciclos para la fragmentación del DNA, se elaboraron genotecas a partir de dos alícuotas que presentaron una mejor concentración y pureza en la extracción de DNA, cuyo material genético fue fragmentado con las condiciones establecidas en los métodos de fragmentación mencionados anteriormente.

Primero se elaboró una genoteca, con el material genético fragmentado de forma mecánica, a ello posteriormente se ligaron unos adaptadores (secuencias únicas que permiten su identificación de la genoteca durante la secuenciación), se realizó una selección de tamaño de la genoteca por medio de una electroforesis automatizada, seguido de esto, se amplificó la genoteca por una reacción tipo PCR, con el objeto de tener cantidad suficiente de material genético, y finalmente se purifica el producto de PCR o genoteca amplificada, para su posterior evaluación de calidad por medio de una electroforesis de microfluidos, cuyo resultado se muestra en el Figura 10.

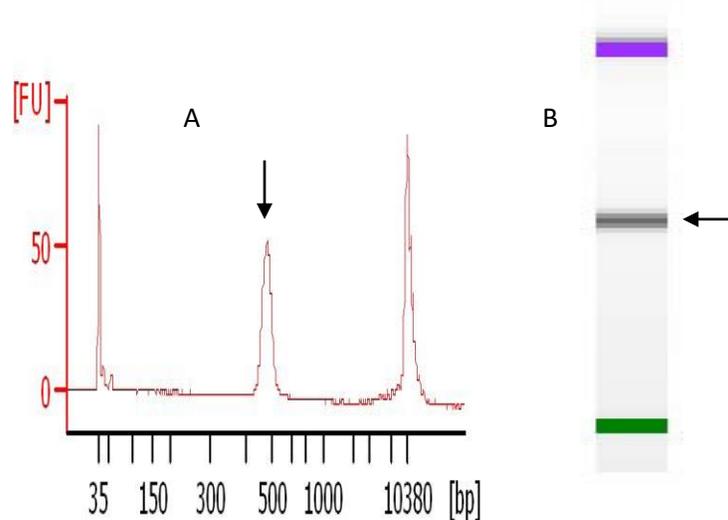


Figura 10. A) Genoteka fragmentada por sonicación con un tamaño promedio de 481 pb. B) Electroferograma, que muestra una banda de correspondiente a la genoteka, observándose que no existen impurezas.

Los fragmentos de DNA que se obtuvieron por medio de sonicación presentaron un tamaño de aproximado de 439 pb a 440 pb. Cuando se terminó de elaborar la genoteka se observó en el gráfico 10, el tamaño de genoteka fue de 478 pb, lo cual se debe a la adición de los adaptadores. Por otro lado en el panel B de la figura 10, se observó únicamente una banda correspondiente a la genoteka, lo que indica que tiene buena pureza y puede ser adecuada para la secuenciación.

Además, se elaboró otra genoteka con el material genético fragmentado de forma enzimática, de igual forma que la genoteka anterior se siguieron los pasos ligación de adaptadores, selección de tamaño, y amplificación, para finalmente evaluar su calidad en por medio de una electroforesis de microfluidos, cuyo resultado se observa en el Figura 11.

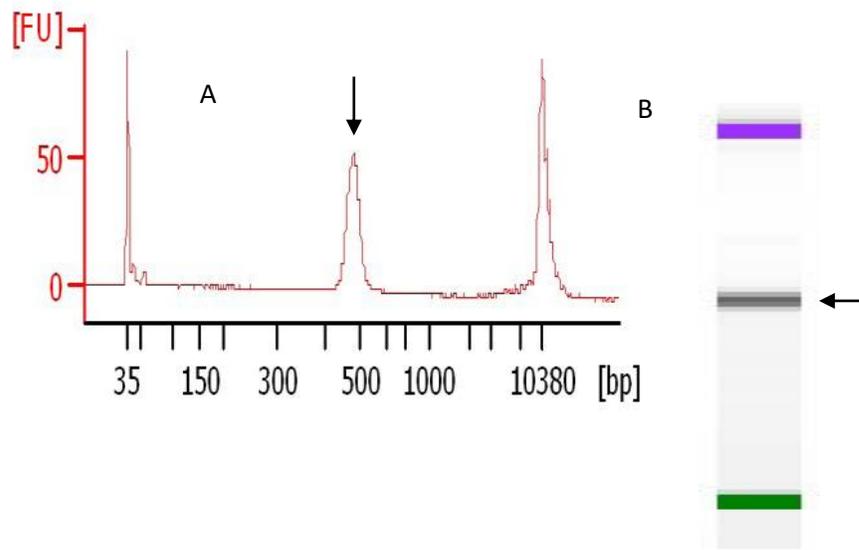


Figura 11. A) Genoteca fragmentada enzimáticamente con un tamaño promedio de 478 pb. B) Electroferograma, que muestra una banda de correspondiente a la genoteca, observándose que no existen impurezas.

El tamaño final de la genoteca fue de 481 pb, esto se debe de igual forma a la presencia de adaptadores, ambas genotecas se observa que se encuentran dentro de los parámetros establecidos para aceptar el tamaño de las genotecas para su posterior cuantificación y subsecuente emulsión.

10.4 Cuantificación de las genotecas

El punto crucial de este trabajo fue realizar una comparación de los distintos métodos de cuantificación de las genotecas para ello se utilizaron dos métodos una PCR en tiempo real y la electroforesis de microfluidos, esta cuantificación se realizó por duplicado.

En la Figura 12 y 13 se muestran las curvas estándar empleadas en las cuantificaciones, tomando en cuenta los valores de r^2 y m de cada una.

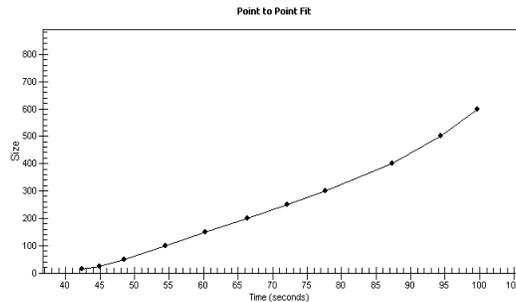


Figura 12. Curva de cuantificación de la electroforesis de microfluidos (Obtenida en el equipo Bioanalizador donde se obtuvo una r^2 de 0.1617 y una pendiente de $m=-0.2238$)

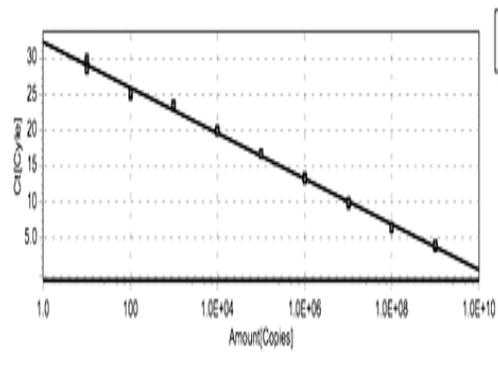


Figura 13. Curva de cuantificación obtenida de reacción de cadena de la polimerasa tiempo real (Obtenida en el equipo 480 de Roche donde se obtuvo una r^2 de 0.999 y una pendiente de $m=-3.20$)

Cabe resaltar de los dos gráficos los valores r^2 obtenidos, ya que para el gráfico de electroforesis de microfluidos, el valor es cercano a cero, lo que indica que no hay una buena relación entre los datos, mientras que para la qPCR el valor es cercano a 1, significa que hay un buen ajuste, lo cual muestra un indicio que el primer método no es muy fiable para la cuantificación de genotecas.

Es por ello que a los cuatro datos que se obtuvieron de estas mediciones, se les aplicó una estadística descriptiva paramétrica (la media, desviación estándar y varianza), para observar si existen diferencias significativas entre los métodos, cuyos resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Estadística Descriptiva de la cuantificación de las genotecas

Método de Cuantificación	Tipo de Fragmentación	Media	Desviación estándar	Varianza	CV
qPCR	Enzimática	4.3e ⁸	3.8e ⁷	1.4e ¹⁵	0.088
	Sonicación	4.0e ⁸	5.3 e ⁷	2.8 e ¹⁵	0.1025
Electroforesis de Microfluidos	Enzimática	2.6e ⁸	5.4 e ⁷	2.9 e ¹⁵	0.2076
	Sonicación	1.9e ⁸	7.4 e ⁷	5.5 e ¹⁵	0.3894

Las genotecas elaboradas por los distintos métodos fueron comparadas por las métricas estadísticas, sin embargo con los resultados obtenidos no es fácil determinar cuál de los métodos de cuantificación presenta mejores resultados.

Es por ello que se decidió realizar una prueba de t student, donde primero es necesario realizar pruebas de normalidad adicionales a la estadística paramétrica para poder determinar si los datos presentan una distribución normal o no, y en caso contrario aplicar otra prueba estadística para determinar las diferencias significativas de los datos, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

Tabla 12 Prueba de normalidad.

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
203 qPCR sonicación	0.189	10	0.200(*)	0.915	10	0.320
203 qPCR enzimática	0.163	10	0.200(*)	0.921	10	0.363
Electroforesis microfluidos sonicación	0.298	10	0.012	0.748	10	0.003
Electroforesis microfluidos enzimática	0.115	10	0.200(*)	0.956	10	0.743

En Tabla 12 de las pruebas de normalidad se observa cuatro grupos de datos, que describe que para las determinaciones realizadas por la qPCR, tanto con fragmentación mecánica y por digestión enzimática si cumplen con las condiciones de normalidad, esto dando valores por encima del valor de significancia, siendo estos valores de 0.320 y 0.363 respectivamente, por lo que es posible realizar una comparación entre el método de fragmentación.

Sin embargo, para las determinaciones realizadas por la electroforesis de microfluidos solo un grupo de datos fue el que reporta valores de normalidad, siendo este grupo de las genotecas formadas a partir del material genético fragmentado enzimáticamente, con un valor de 0.743; mientras que para la genotecas elaboradas a partir del material genético fragmentado enzimáticamente, arrojó un valor por debajo del nivel de significancia siendo este valor de 0.003, lo cual indica que este grupo de datos no tiene una distribución normal y que por lo tanto para poder comparar el método de fragmentación se debe de utilizar otra prueba diferente a la t de student para muestras que presentan una distribución no normal.

Una vez teniendo esto se realizó la prueba t de student para los datos de la qPCR, en este tipo de análisis estadístico existe la condición de que el grupo de datos a analizar tenga una

distribución normal, mientras que para los dos grupos de la electroforesis de microfluidos se realizó otra prueba estadística para realizar la comparación entre ambos grupos, esta prueba es la de Mann-Whitney, una prueba estadística no paramétrica que se aplica cuando el análisis de los dos grupos no se ajustan a una distribución normal.

En este proyecto se consideró que las muestras son muestras independientes ya que estas se fragmentaron por distintos métodos (mencionados anteriormente). Con los datos obtenidos de la estadística descriptiva para muestras independientes.

Al hablar del concepto “significación estadística” se relaciona con la necesidad de “probar hipótesis”. Este proceso se realiza utilizando “pruebas de hipótesis”, las que permiten cuantificar hasta qué punto, la variabilidad de la muestra en estudio es responsable de los resultados obtenidos en el estudio. Es así como H_0 o hipótesis nula, representa la afirmación de que no hay asociación entre las dos variables; y H_a , o hipótesis alternativa, afirma que existe asociación entre las dos variables. Entonces, la estadística permite decidir qué hipótesis debemos elegir, con el nivel de seguridad que habitualmente en clínica es de 95%.

Al realizar el análisis estadístico para comparar los métodos de cuantificación (qPCR y electroforesis de microfluidos) se puede notar que para ambos casos los valores obtenidos son de 0.000. Lo cual indica que ambos métodos muestran una diferencia estadísticamente significativa al momento de realizar las determinaciones, por lo tanto se puede afirmar que son muy diferentes en cuanto a métodos de cuantificación estos dos equipos Tabla 13.

Tabla 13. Análisis estadístico comparativo de los métodos de cuantificación

	Prueba Estadística	Resultado	Valor de significancia
qPCR (Sonicación)	t de Student	0.000	0.005
qPCR (Digestión)			
Electroforesis de Microfluidos (Sonicación)	Mann-Whitney	0.000	
Electroforesis de Microfluidos (Digestión)			

10.5 Pruebas Intra e Inter ensayo

Posterior al análisis estadístico se realizó la evaluación de intra e inter ensayo de las cuantificaciones por los dos métodos de cuantificación.

En las pruebas de inter ensayo se puede hacer el comparativo entre cada método de cuantificación al observar el comportamiento de la concentración de moléculas, tomando como referencia la media estadística de cada uno de los grupos. Muestran un comportamiento más uniforme las cuantificaciones por qPCR en comparación con las cuantificadas por electroforesis de microfluidos, destacando que las mediciones se realizaron en días diferentes y con diferente analista, pudiendo así determinar la repetibilidad del proceso en la elaboración de las genoteca, lo que presenta una variación entre el método y la persona que lo realiza.

Para la evaluación intra ensayo, se cuantificó una muestra en un mismo día varias veces y se puede ver que el que presenta una mayor variación entre cada una de las concentraciones que se obtuvo son las cuantificaciones que se realizaron por electroforesis

de microfluidos mientras que en las que se cuantificaron por qPCR la variación existe, pero no es tan marcada como en la Electroforesis de Microfluidos.

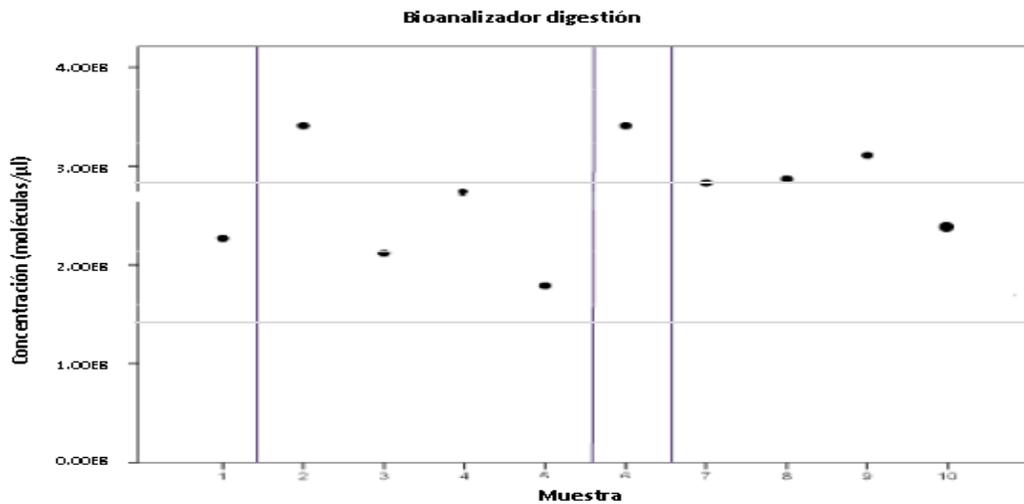


Figura 14 Cuantificación por Electroforesis de Microfluidos (Enzimática) intra e inter ensayo

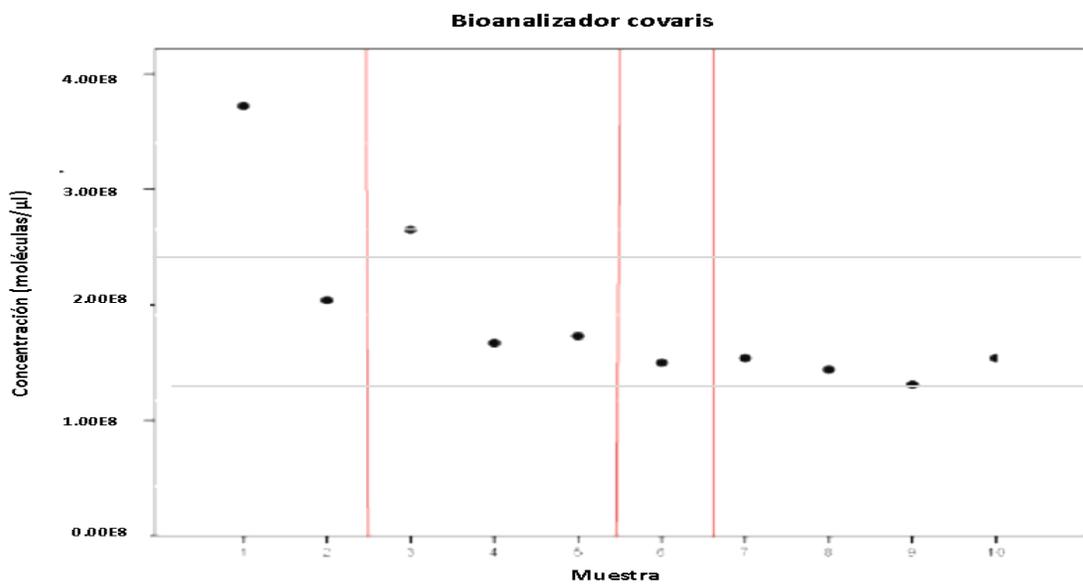


Figura 15 Cuantificación por Electroforesis de Microfluidos (Sonicación) intra e inter ensayo

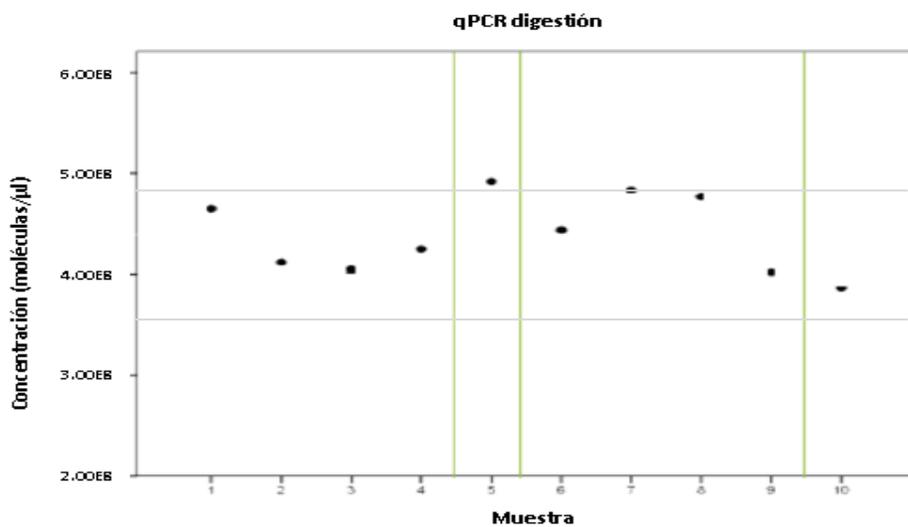


Figura 16 Cuantificación por qPCR (Enzimático) intra e inter ensayo

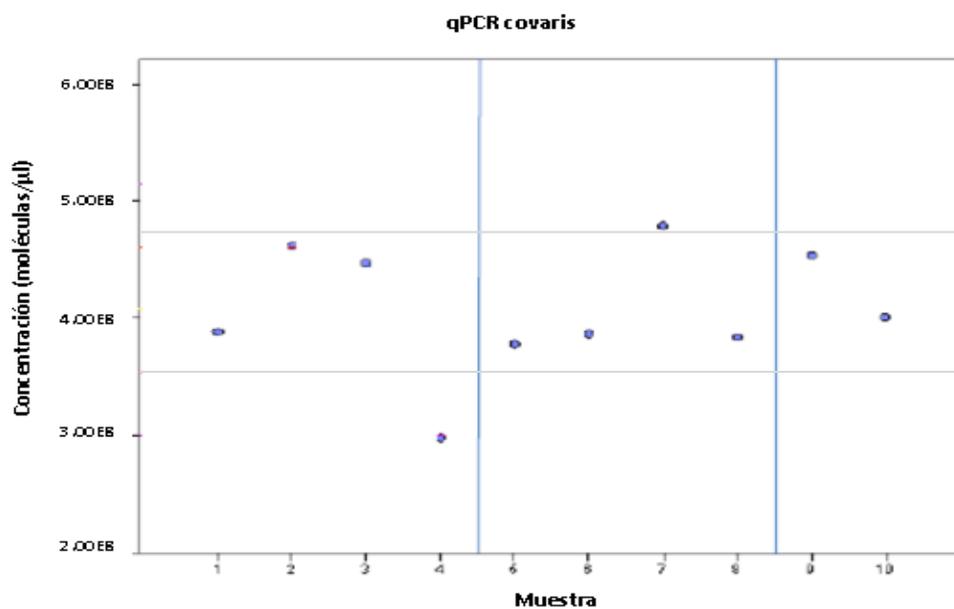


Figura 17 Cuantificación por qPCR (Sonicación) intra e inter ensayo

11.-Discusión

La secuenciación de nueva generación tiene múltiples aplicaciones como la secuenciación de bisulfito de sodio para la detección de modificaciones postranscripcionales, la metagenómica, la antropología forense, la tipificación de microorganismos, entre otras; Esta última ha sido de gran utilidad ya que ha permitido identificar microorganismos lo cual es difícil por métodos convencionales, o microorganismo que presentan baja diversidad nucleotídica, conocidas como especies monomórficas como por ejemplo *Salmonella* (Medini et al., 2008), bacteria se puede encontrar ampliamente distribuida en la naturaleza siendo *Salmonella entérica* una de las serovariedades que se asocian a salmonelosis de origen alimentario; de forma particular en México las serovariedades más frecuentemente aisladas son Typhimuirum, Enteritidis, Derby, Agona y Anatum (Hernández et al., 2011).

En ese sentido el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados, ha implementado la secuenciación masiva como método de identificación de bacterias de interés agroalimentario como *Salmonella*. La secuenciación masiva en la plataforma Ion Torrent, consta de tres etapas, formación de genotecas, emulsión y secuenciación, el presente trabajo se evaluó una parte primordial de la primera etapa la cuantificación de las genotecas.

Para la elaboración de genotecas para la plataforma Ion Torrent, lo primero que se necesita es el material genético, el cual fue extraído con el Fas Id Kit el cual contiene entre sus componentes un poderosos desnaturalizantes selectivos para el DNA así como reactivos específicamente diseñados para prevenir la degradación del DNA y contaminantes que podrían inhibir la reacción de PCR, posteriormente se procedió a evaluar la calidad y concentración, esto se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop, los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 10, de estas extracciones se eligieron las que presentaron mejores condiciones para seguir la preparación de las genotecas tomando en cuenta que la concentración debía de ser mayor o igual a 50 ng/ μ L y la pureza debe tener

una relación entre 1.8-2.0; por lo tanto se tomaron las muestras *Salmonella* (2) y *Salmonella* (3) que fueron las que cumplieron con estas dos condiciones.

De este modo la concentración de la muestra de ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Mientras que la relación de absorbancia A260/280 se utilizan para evaluar la pureza de las muestras.

La relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6. Un valor A260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas.

Una vez seleccionadas las muestras de ADN que presentaron buenas condiciones se realizó el proceso de fragmentación del material genético, paso crucial para la elaboración de genotecas; esta fragmentación se llevó a cabo por dos métodos, el primero fue una fragmentación mecánica por sonicación y el segundo fue una digestión enzimática por endonucleasas no específicas. Para ambos métodos se estandarizaron las condiciones para obtener fragmentos de ADN de un tamaño aproximado de 400 pb, (el tamaño promedio final de las genotecas fue de 470 pb).

Una vez teniendo las genotecas, estas se cuantificaron por decuplicado, para lo cual se emplearon los métodos qPCR y electroforesis de microfluidos, es decir de las genotecas elaboradas que fueron fragmentadas por medio de sonicación se cuantificaron por la electroforesis de microfluidos y la qPCR, de igual forma para la genotecas que se elaboraron a partir de la fragmentación enzimática se cuantificaron por los mismos dos métodos.

En el Grafico 12 se muestra el comportamiento de la curva estándar con la cual se llevó a cabo la cuantificación de cada una de las repeticiones de las genotecas, la curva estándar está dada por tiempo de migración de los fragmentos de ADN frente al tamaño del mismo,

la cuantificación se llevó a cabo por la interpolación de las repeticiones de las genotecas, para la cual se obtuvieron los datos de r^2 y pendiente dándonos los siguientes resultados 0.1617 y -0.2238 respectivamente. En la Grafico 13 se observó el comportamiento de la curva estándar para este método de cuantificación, en el cual podemos ver a simple vista que este muestra un comportamiento más lineal en comparación con la curva de cuantificación la electroforesis de microfluidos en el Bioanalyzer 2100, en este tipo de cuantificaciones para la elaboración de la curva estándar se utilizan estándares de concentraciones exactamente conocidas, después interpolando cada una de las repeticiones de las genotecas, se calcula su concentración, al igual que curva de cuantificación la electroforesis de microfluidos en el Bioanalyzer 2100 para se obtuvieron los datos de r^2 y pendiente dándonos los siguientes resultados 0.9990 y -3.320 respectivamente.

Al comparar estos datos para determinar cuál ofrece mejores resultados, r^2 es mucho mejor en la cuantificación realizada por qPCR ya que el valor se acerca mucho mas a 1 (0.9990) en cambio la cuantificación que se realizó con Bioanalyzer 2100 presenta una r^2 más alejada de 1 (0.1617) indicando que en este tipo de cuantificaciones la correlación entre grupo de datos es mas disperso y por lo tanto el modelo es poco confiable y los resultados que se van a obtener son más variados.

Para el análisis de la pendiente se tomó en consideración que el valor de esta debe de encontrarse entre -3.1 y -3.6, tomando como referencia este dato podemos afirmar que para la cuantificación realizada por el Bioanalyzer 2100 su valor de pendiente es menor al rango establecido, este valor de -0.2238 mientras que para la cuantificación llevada a cabo por qPCR el valor cae dentro del rango establecido, siendo este valor de -3.320.

Una vez que se obtuvieron los resultados de las cuantificaciones por electroforesis de microfluidos se realizó una serie de cálculos matemáticos para convertir la concentración en pmol/L (que es la concentración que reporta el equipo) a η M, esto fue porque en el

manual del equipo se reporta un factor para poder calcular la cantidad de moléculas por microlitro, este reporta que cada 8.3 nM contiene aproximadamente $5e^9$ moléculas/ μ L. Este factor de conversión se utilizó para todos los grupos de muestras que fueron cuantificados por este método. Mientras que para la qPCR no fue necesario realizar cálculos de este tipo, debido a que el equipo reporta la concentración en moléculas/ μ L, estas unidades de concentración fueron tomadas por igual para ese grupo de muestras. Así tanto las cuantificaciones por electroforesis de microfluidos y qPCR presentaban las mismas unidades de concentración.

El tratamiento de los datos para esta estadística descriptiva fue como muestras independientes, porque las muestras analizadas provienen de procesos diferentes de fragmentación como se mencionó anteriormente.

Las genotecas que se cuantificaron por medio de electroforesis de microfluidos presentaron un comportamiento más disperso en los datos de cuantificación, en comparación de las genotecas que se cuantificaron por qPCR, porque las primeras presentaron un valor de desviación estándar mayor al que se presentaron las cuantificadas por qPCR. Por lo tanto las cuantificaciones realizadas por la qPCR son más homogéneas y tienen menos variación.

Sin embargo independientemente al método de cuantificación, las genotecas cuyo material genético se fragmentó por sonicación, presentaron mayor variación en los datos en los dos métodos de cuantificación con respecto a las genotecas de las cuales se construyeron por material genético fragmentado por endonucleasas.

Primero se aplicaron pruebas de normalidad para observar la distribución de los datos, posteriormente para evaluar si ambos métodos de cuantificación presentan diferencias significativas se realizó una prueba t de Student y con ello comparar los grupos de datos, sin embargo.

En general con las pruebas estadísticas observamos que existen diferencias significativas en los dos métodos de cuantificación, siendo más variables los resultados que se obtuvieron en la electroforesis de microfluidos, como también se pudo observar en los ensayos intra e inter-ensayo, siendo más precisa la qPCR.

12.- Conclusiones

Se extrajo DNA bacteriano con buenas condiciones de pureza y concentración.

Se determinaron las condiciones adecuadas para la fragmentación de DNA tanto por el método enzimático y mecánico (sonicación).

La electroforesis de microfluidos muestra una mayor dispersión de resultados en comparación con la qPCR de acuerdo con los datos estadísticos.

En la muestra cuantificada por electroforesis de microfluidos y qPCR se pudo determinar que la electroforesis de microfluidos presenta resultados menos certeros en comparación a las cuantificaciones realizadas por la qPCR.

La qPCR genera mejores resultados, para la cuantificación de genotecas.

Utilizando la m y r^2 de las curvas de cuantificación, la que presento una mejor linealidad y una variabilidad menor es la curva de la qPCR.

Analizando las pruebas de inter ensayo se demostró, que las que las muestras que se cuantificaron por medio la qPCR presentaron resultados más uniformes, en comparación a las cuantificadas por Electroforesis de Microfluidos, determinando así repetibilidad del proceso.

En la evaluación de intra ensayo, al cuantificar una muestra en un mismo día varias veces, se demostró que presenta una mayor variación las cuantificaciones realizadas por electroforesis de microfluidos y en las que se cuantificaron por qPCR la variación existe, pero de menor significancia.

Analizando estadísticamente los métodos de cuantificación de genotecas para la plataforma de secuenciación masiva PGM ION TORRENT la que proporciona mejores resultados es la qPCR.

13.- Glosario

Bioanalizador: es una plataforma basada en la tecnología de microfluidos diseñada para la determinación del tamaño, la cuantificación y el control de calidad de ADN, ARN y proteínas en un único instrumento, mediante electroforesis en pequeños chips.

Clon: hacer referencia al grupo de organismos o células que son idénticos desde el punto de vista genético y que se originan a través de una reproducción de carácter asexual.

Electroforesis de microfluidos: es un método de separación basado en la movilidad de las biomoléculas en una fase líquida sometida a un campo eléctrico.

Enfermedad de transmisión alimentaria: Término general empleado para describir toda enfermedad o dolencia causada por la ingesta de bebidas o alimentos contaminados. Tradicionalmente se denomina “intoxicación alimentaria”.

Epigenómica: o *epigenómica* se basa en la existencia de un nivel de regulación de la expresión génica que no está relacionado con la secuencia de bases nitrogenadas sino con la organización estructural que ésta adopta en un momento determinado dentro del núcleo celular, se define como el estudio de los cambios de expresión génica que son potencialmente heredables y que no implican cambios en la secuencia del DNA.

Gen: Partícula de material genético que, junto con otras, se halla dispuesta en un orden fijo a lo largo de un cromosoma, y que determina la aparición de los caracteres hereditarios en los seres vivos.

Genoteca: o mal llamadas librerías genómicas, es todo el genoma de un microorganismo que se almacena en múltiples fragmentos individuales constituyendo una genoteca de DNA que es característico de la especie.

Inocuo: es la incapacidad que algo o alguien presentan para infligir un daño.

Mate-pair: la lectura solo se realiza por uno de los extremos que es donde se encuentra el marcador para su identificación.

Metagenómica: realiza el análisis genómico de comunidades microbianas, combina el concepto estadístico de meta-análisis referido al proceso en el que se relacionan estadísticamente análisis separados, con la genómica que es el análisis comprensivo del material genético de un organismo.

Pairedend: permite secuenciar los dos extremos de un fragmento y generan alta calidad, de datos de la secuencia deseada. Las genotecas “*Paired-end*” facilitan la detección de reordenamientos genómicos y elementos de secuencia repetitivos, así como fusiones de genes y nuevas transcripciones.

Patógeno: Todo microorganismo que provoque enfermedades, como una bacteria, un virus o un parásito. A menudo se le denomina “germen” o “microbio”.

Single-end: en donde por cada fragmento de DNA se realiza una sola lectura, es decir, la secuenciación de este genoteca se realiza en un solo sentido de 5´ a 3´.

Transcriptómica: estudia y compara transcriptomas, es decir, los conjuntos de RNA mensajeros o transcriptos presentes en una célula, tejido u organismo.

14.-Referencias bibliográficas

1. Agilent 2100 Bioanalyzer application compendium Agilent Technologies, Germany (2007).
2. Allegue Catarina, Oscar Campusano, Sergio Castillo, Mónica Col, **Nuevas herramientas diagnosticas en la genética de la muerte súbita**, Centro de genética Cardiovascular, UdG-IdibGi, Instituto de investigación Biomédica de Girona, España, 2013.
3. Bannantine J, Baechler E, Zhang Q, Li L, Kapur V. **Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with *Mycobacterium avium* subsp. avium reveals potential diagnostic sequences.** J Clin Microbiol 2002; 40: 1303-1310.
4. Benjamín Rodríguez-Santiago, Lluís Armengol, **Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal.** Diagn Prenat. 2012; 23:56-66.
5. Berglund Eva C, Anna Kiialainen, Ann-Christine Syvanen, **Nex-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics**, Investigative Genetics, 2011, 2:23.
6. Bhagwat A. **Rapid detection of Salmonella from vegetable rinse-water using real-time PCR.** Food Microbiol 2004; 21: 73-78.
7. Brambila Eduardo, (2000) **Validación y Verificación de Sistemas de Medición en el Laboratorio**, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
8. Brenner FW, Villar RG, Angulo FG, Tauxe R, Swamiathan B. Guest commentary. **Salmonella nomenclature.** J Clin Microbiol 2000; 2465 –2467.
9. Brown JE. **Nutrition now. In The Múltiple dimensiones of food safety.** Edit. West Publishing Company 1995; p32-16.
10. Burkhardt h.j. (2001) **Standardization and quality control of PCR analyses.** Clin. Cbem. Lab. Med., 38, 87-91.

11. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. **Quantitative real-time RT-PCR-a perspective.** J Mol Endocrinol. 2005; 34: 597-601.
12. Cariello NF, Swenberg JA, Skopek TR. **Fidelity of *Thermococcus litoralis* ADN polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis.** Nucleic Acids Res. 1991; 19: 4193-4198.
13. Cartwright, R. **Incidence of subjective travelles' diarrhoea.** *MicroDiagnostics*, noviembre 1999., Reino Unido.
14. Castle J, Garrett-Engle P, Armour CD, Duenwald SJ, Loerch PM, Meyer MR, et al. **Optimization of oligonucleotide arrays and RNA amplification protocols for analysis of transcript structure and alternative splicing.** Genome Biol 2003; 4: R66.
15. Catarina Alleguea, Oscar Campuzano, Sergio Castillo, Mònica Colla, Anna Iglesias, Ramon Brugada, **Nuevas herramientas diagnósticas en la genética de la muerte súbita,** Rev Esp Cardiol Supl. 2013;13(A):24-9 - Vol. 13 Núm.Supl.A DOI: 10.1016/S1131-3587(13)70063-3.
16. Cedar H, Bergman Y. **Linking ADN methylation and Histone modification: patterns and paradigms.** Nature Reviews Genetics 2009; 10: 295-304.
17. Chee M, Yang R, Hubbell E, Berno A, Huang XC, Stern D, et al. **Accessing genetic information with high-density ADN arrays.** Science 1996; 274:610-4.
18. Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, Deneff J, Cocito C, Gala J. **Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. paratuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle.** J Clin Microbiol 2000; 38: 3048-3054.
19. Conde-Bonfil y M., Mora-Zerpa C. **Entamoeba histolítica: un desafío vigente.** *Salud Pública de México*, 1992, Vol. 34, N° 3, mayo-junio.
20. DeRisi J, et al. 1996. **Use of a cADN microarray to analyse gene expression patterns in human cancer.** Nat. Genet. 14: 457-460.

21. Dias L. T., Valdés-Dapena v. M., **Enfermedades transmitidas por alimentos**. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Hospital Pediátrico "Juan Manuel Marquez" 1999.
22. FAO y OMS .Comisión del Codex Alimentarius. Manual de procedimiento: 12^o Edición. Publicado por la Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Roma, 2001.
23. Fasano A. **Bacterial Infections**. In. Eds. Walker AW, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins J. Pediatric Gastrointestinal Disease: BC Decker Inc, Ontario, 2000. Satcher D. **Food safety: a growing global health problem**. JAMA 2000; 283: 1817-21.
24. Fernández, E. 2000. **Microbiología e inocuidad de los alimentos**. Universidad Autónoma de Querétaro, México, p. 220 y 459.
25. Flores Luna José Luis, 2002, **Modelo de evaluación de riesgos sanitarios derivados del consumo de agua y alimentos para la Protección contra Riesgos Sanitarios**, Secretaría de Salud, México.
26. Gentry-Weeks C, Hutcheson H, Kim L, Bolte D, Traub-Dargatz J, Morley P *et al*. **Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of Salmonella spp**. J Clin Microbiol 2002; 40: 1487-1492.
27. Gilbert & Dupont, **Microbial Metagenomics: Beyond the Genome**. Annual Review of Marine Science (2011) 3: 347-371.
28. Grice & Sangre, **The Human Microbiome: Our Second Genome**, Annual Review of Genomics and Human Genetics (2012) 13: 12.1-12.20
29. Hargreaves DC, Crabtree GR. **ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms**. Cell Res 2011; 21(3): 396-420.
30. Herman L, De Block J, Waes G. **A direct PCR detection method for Clostridium tyrobutyricum spores in up to 100 milliliters of raw milk**. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 4141-4146.

31. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R. (1993). **Kinetic PCR: Real-time monitoring of ADN Amplification reactions**. *Biotechnology* 11, 1026-1030.
32. Holts R.A., S.J.M. Jones, **Genom. Res.**, 2008, 18, 839.
33. Iorio MV, Piován C, Croce CM. **Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network**. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799(10-12): 694-701.
34. Izquierdo R M, 2014, **Curso de Genética Molecular e Ingeniería Genética**, Ediciones Pirámide, Madrid, p 138.
35. Jiménez Edeza Maribel, de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa y Cristóbal Chaidez Quiroz del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, coordinación Culiacán. El texto forma parte del documento: **Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en México 2012**, SAGARPA-SEDESOL-INSP-FAO, 2013.
36. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM. editores, Zinsser **Microbiología**. 20ª ed. BsAs. Panamericana; 1994.
37. Le Minor L, Popoff MY: Request for an opinion. **Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. nom., rev. as the type and only species of the genus *Salmonella***. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37: 465 – 468.
38. Lee TI, Rinaldi MJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, Gerber GK, et al. **Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae***. *Science* 2002; 298: 799-804.
39. Lockhart, D.; E. Winzeler, **Genomics, Gene Expression and ADN Arrays**, *Nature* 415: 827-836, EE.UU. , 2000.
40. Maiden M. C. et al., 1998, **Multilocus sequence typing: a portable approach the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3140-3145.

41. María C. P., **Morfología y estructura bacteriana**, (2014), Microbiología General, pág. 1045-1060, 2ª edición, México.
42. McClelland Michael, Kenneth E. Sanderson, John Spieth, **Complete genome sequence of *Salmonella entericaserovar Typhimurium* LT2**, *Nature* 413, 852-856 (25 October 2001).
43. Miranda J, Bringas R, **Análisis de datos de microarreglos de ADN Parte I: Antecedentes de la tecnología y diseño experimental**, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB, 2008.
44. NMX-CH-152-IMNC-2005. **Metrología en Química-Vocabulario**.
45. Ooi SL, Henikoff S. **Germline histone dynamics and epigenetics**. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 257-265.
46. Pisabarro G. (2009) **Microbiología Clínica**. Davinia Arjona, Carlos Aragón, José Antonio Aguilera, Lucía Ramírez, Antonio G. Pisabarro. Mycological, Universidad Pública de Navarra.
47. Popoff MY, Le Minor L: **Formules antigeniques des serovars des *Salmonella*.WHO collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**. Institut Pasteur, Paris, 2001.
48. Prescott, Harley, Klein. **Microbiología**. Mc Graw-Hill Interamericana de España. 4ª ed. 1999.
49. Proudfoot, N.; A. Furger; M. Dye: «**Integrating mRNA Processing with Transcription**», *Cell* 108: 501-512, Inglaterra, 2002.
50. Reeves MW, Evins Gm, Heiba AA, Plikaytis BD Farmer JJ 3rd. **Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonella* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* com.nov.** *J Clin Microbiol* 1989; 27(2): 313 – 320.
51. Rodicio María del Rosario ^a, María del Carmen Mendoza ^a, **Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones**

- en microbiología clínica, Abril 2004 , Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. Vol. 22. Núm. 04. España.
52. Rodríguez-Paredes M, Esteller M. **Cancer epigenetics reaches mainstream oncology.** Nat Med 2011; 17(3): 330-339.
53. Rosas GA, Acosta VM. **Manual de manejo higiénico de los alimentos.** México, D.F.: Secretaría de Salud, 2001.
54. Sánchez Serrano Sinthia Lizbeth, Lamas Mónica, **Epigenética: un nuevo lenguaje, un nuevo destino,** Vol. VI Número 2-2011: 105-110.
55. Sanger F., S. Nicklen, A.R. Coulson, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** 1997, 74, 5463.
56. Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Guerra H. **Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas.** Ed Panamericana. 2ª ed. Buenos Aires 1993.
57. Scheu P, Berghof K, Stahl U. **Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction.** Food Microbiol 1998; 15: 13-31.
58. Schloss, P. D. *et al.* **Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies.** *PLoS ONE.* 6, e27310, doi:10.1371/journal.pone.0027310 (2011).
59. Secretaria de Salud. **Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.** Diario Oficial de la Federación 13 de Abril de 2004.
60. Sipos, **Addressing PCR biases in environmental microbiology studies.** *Methods Mol. Biol.* 599, 37-58, doi: 10.1007/978-1-60761-439-5_3 (2010).
61. Smithies, **Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults** Biochemical Journal, 61 (4) (1955), pp. 629–641.
62. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C, **Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real,** Laboratorio de Biotecnología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), México, D.F. Vol. 2, Núm. 2 Mayo-Agosto 2013 pp 70-78.

-
63. Urwin R, Maiden M. C., 2003, **Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology**. Trends Microbiol., 11, 479-487.
 64. Vázquez Julio A, Sonsoles Berrón, **Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet**, Febrero 2004, Laboratorio de Referencia de Neisserias. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Vol. 22. Núm. 02. Madrid, España.
 65. Warlow GM, Insel PM, Seller MF. **Contemporary Nutrition. Issues and insights. In Food Safety**. Edit. Mosley year Book 1994; p.540-48.
 66. Weighardt F., **PCR cuantitativa para la detección de OGM**, Institute for Health and Consumer Protection, 2000.
 67. Zuckerkandl E, Pauling L. **Molecules as documents of evolutionary history**. J Theor Biol 1965; 8: 357-66.