



# Universidad Autónoma Metropolitana

## Unidad Xochimilco

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura de Química Farmacéutica Biológica

### Informe de Servicio Social

#### Obtención y evaluación de ácidos nucleicos para la generación de controles empleados en métodos moleculares

Juan Carlos Legorreta Domínguez

Matrícula: 2183052791

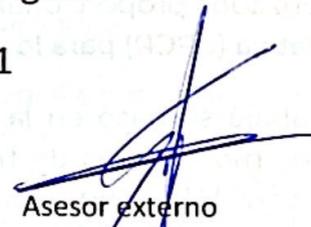


Asesor Interno

María Angélica Gutiérrez Nava

Número económico

34568



Asesor externo

Imelda Rocío Guzmán Cervantes

Cédula profesional

9054214

Lugar de realización:

Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura

(CCAYAC)

Fecha de inicio: 01-11-2023

Fecha de término: 02-05-2024

## INTRODUCCIÓN

La Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC) es el Laboratorio Oficial de Control de la COFEPRIS cuya función es realizar análisis de laboratorio de productos de uso y consumo humano sujetos a control sanitario, que son el soporte científico para los actos de autoridad que realiza la COFEPRIS (vigilancia, autorizaciones, liberación de lotes, atención de alertas y emergencias, entre otros). Dentro de los ensayos de laboratorio, algunos análisis son basados en ácidos nucleicos (métodos moleculares), estos ensayos ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad, además, en algunos casos la reducción del tiempo de respuesta el cual es un punto clave tratándose de la institución que brinda soporte científico para las decisiones en materia de Salud Pública del país.

En los métodos moleculares, los controles positivos son utilizados para la amplificación de la o las secuencias objetivo del organismo a evaluar, además, de confirmar si los oligonucleótidos funcionan adecuadamente. Un control positivo es un estándar absoluto para los ensayos moleculares que se realizan en CCAYAC debido a que permiten evaluar posibles falsos negativos y garantizar la obtención de resultados confiables, los controles positivos al ser ácidos nucleicos caracterizados proporcionan información cualitativa (PCR punto final y qPCR) y cuantitativa (qPCR) para los análisis a desempeñar.

Este trabajo se basó en la generación de ADN para controles empleados en métodos moleculares de tres microorganismos y un producto comercial, los cuales son; *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* ATCC y de harinas de maíz genéticamente modificado. Se busca que estos organismos presenten genes específicos, por ejemplo: en las cepas de *V. parahaemolyticus*, los cuales causan enfermedad en humanos por lo general son beta hemolíticas (fenómeno de Kanagawa positivo) y muestran una alta correlación con la presencia de los genes de hemolisina *thd* y/o *trh*; por lo tanto, las cepas patogénicas que causan gastroenteritis en humanos están asociadas a la presencia de estos genes. (Laboratory Procedures for the Microbiological Analysis of Foods - Canada.Ca, 2006.) En el caso de las cepas de *V. cholerae*, la producción de la toxina colérica (codificada por los genes *ctxAB*) es el principal factor en la patogenicidad de la bacteria, el fragmento del gen *ctxAB* del genoma de *Vch* tiene un tamaño molecular de 777pb, detectado mediante PCR punto final. (BAM Chapter 28: Detection of Enterotoxigenic *Vibrio Cholerae* | FDA, 2001.)). Para los OGM's se busca la detección del promotor 35S CaMV (virus de mosaico de la coliflor, el terminador NOS del gen de nopalina sintetasa de *Agrobacterium* (Institute for Health and Consumer Protection., 2011) *tumefaciens* y/o el promotor 34S FMV (figwort mosaic virus) La presencia de cualquiera de las secuencias antes mencionadas se considera como presencia presuntiva de un organismo genéticamente modificado. Y la

*Salmonella* ATCC se emplea para implementación y validación de métodos para detección del microorganismo.

## MÉTODOS

### REACTIVACIÓN DE CEPAS CRIOPRESERVADAS EN ULTRACONGELACIÓN

Las cepas criopreservadas de los microorganismos *V. cholera* con registro Vc 1, Vc 2, Vc 3 y Vc 4 y las cepas de *V. parahemolyticus* con registro Vp 1, Vp 2, Vp 3 y Vp 4 fueron reactivadas para la generación de los controles. La reactivación comenzó con las cepas de *V. cholerae* preservadas a ultracongelación (-70°C) dejando atemperar el vial, se preparó el material y los insumos correspondientes dentro del gabinete de bioseguridad clase A tipo 2 asegurando las condiciones de esterilidad del proceso, una vez descongelado el vial, se procedió a tomar 1000 µL del criovial y agregarlos a 10 mL de caldo T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> (Agar Triptona y sal) e incubarlos a 37°C durante 24h para que los microorganismos se adaptaran al medio, este proceso se realizó por triplicado por cada muestra. Pasado las 24h se tomó 500 µL del medio T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> y se resembró en placas TCBS (Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa) ya que, al ser un medio selectivo se asegurará el crecimiento único e identificación de *V. cholerae* mostrando placas color amarillo.

Para la reactivación de las cepas *V. parahemolyticus* preservadas a ultracongelación (-70°C), se realizó lo mismo solo que el medio para que el microorganismo se adaptará fue caldo de soja y tripticasa con NaCl al 3%, se agregó 1000 µL del criovial y se incubaron a 37°C durante 24h, este proceso se realizó por duplicado por registro. Una vez completada la incubación se tomaron 500 µL del medio para resembrarlo en placas TCBS para asegurar el crecimiento único e identificación de *V. parahemolyticus* mostrando placas color verde.

Una vez reactivadas las cepas e identificadas por medios selectivos se procedió a realizar las extracciones de ADN genómico.

### RESIEMBRA DE CEPAS SALMONELLA ATCC

Para el análisis de las cepas de *Salmonella* ATCC fueron proporcionadas por el departamento de Microbiología con registro Sall 1, Sall 2 y Sall 3. Estas cepas se resembraron en placas AST (Agar soya tripticaseína) y se incubaron durante 24h, una vez crecida la cepa se realizó la extracción de ADN genómico.

### EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE CEPAS

Las cepas *V. parahemolyticus*, *V. cholerae* y *Salmonella* ATCC se trataron con el kit de extracción "High Pure Template Prerapation Kit".

Para las cepas *V. cholerae* y *V. parahemolyticus* se transfirió 1.0 mL de caldo a un microtubo de 1.5 mL estéril y se centrifugó a 8,000 rpm durante 5 minutos, una vez observando el paquete celular se desechó el sobrenadante y se hizo un lavado con PBS 1X agregando 1000  $\mu$ L de PBS 1X al microtubo, se resuspendió el paquete celular y se volvió a centrifugar a 8,000 rpm durante 5 minutos. Una vez hecho esto, se desechó el sobrenadante y se agregaron 200  $\mu$ L de PBS 1X. Para el caso de las *Salmonella* se tomó una asada de masa bacteriana de la placa AST y se resuspendió en 200  $\mu$ L de PBS 1X, a partir de este punto el proceso para las tres cepas siguió el mismo procedimiento.

Se agregaron 5  $\mu$ L de lisozima y se incubó en termobloque a 37°C durante 15 minutos con agitación de 300 rpm, pasado la incubación, se agregó 200  $\mu$ L de la solución amortiguadora de unión y 40  $\mu$ L de proteinasa K y se sometió a otra incubación de 10 minutos a 70°C con agitación de 300 rpm. Una vez terminado la segunda incubación se agregaron 100  $\mu$ L de isopropanol, (en este punto se puede observar la precipitación del ADN) se transfiere toda la solución a una columna acoplado a un tubo recolector y se centrifugó durante 1 minuto a 10,000 rpm. Se transfirió la columna a un nuevo tubo recolector y se agregaron 500  $\mu$ L de solución amortiguadora de remoción, se volvió a centrifugar a 10,000 rpm durante 1 minuto, se transfirió la columna a un nuevo tubo recolector y se agregaron 500  $\mu$ L de solución amortiguadora de lavado y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto, este lavado se repitió una vez más. Se volvió a acoplar la columna a un nuevo tubo y se centrifugó a máxima potencia (aproximadamente 14,700 rpm) durante 10 segundos, se transfirió la columna a un microtubo de 1.5 mL y antes de agregar el amortiguador de elución (precalentado a 70°C) se destapó la columna durante 3 minutos dentro del gabinete para eliminar contaminantes, pasado este tiempo se añadió 200  $\mu$ L de solución amortiguadora de elución, se tapó la columna y se dejó reposar otros 3 minutos, se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto, se tapó el microtubo y se almacenó a -20°C hasta que se le realizaron sus análisis correspondientes. (*High Pure PCR Template Preparation Kit*, n.d.)

#### EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE HARINA DE MAÍZ

Las muestras de harinas a las cuales se les realizó la extracción y purificación de ADN cuentan con los registros M1, M2, M3 y M4. Dichas muestras fueron tratadas con el kit de extracción "Kit Sure Food Prep Basic" para OGM's, las extracciones se realizaron por duplicado.

La extracción comenzó pesando 50.00 mg de harina en un microtubo de 1.5 mL estéril, una vez hecho esto, se preparó el gabinete de bioseguridad y los reactivos correspondientes. Se añadió 40  $\mu$ L de solución amortiguadora de lisis y 20  $\mu$ L de proteinasa K, se vortexeó el microtubo hasta lograr la homogeneidad de la

muestra, después se procedió a incubar las muestras a 65°C durante 30 min con una agitación de 300 rpm. Terminando la incubación, se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm durante 2 minutos logrando la separación de la fase líquida de interés de los residuos insolubles, se colocó un filtro dentro de un tubo receptor de 2 mL y se transfirió la fase líquida al filtro procurando no arrastrar la fase orgánica y se volvió a centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto. Se agregó al filtrado 200 µL de solución amortiguadora de unión y se mezcló, se colocó un nuevo filtro a un tubo receptor y se transfirió la muestra al complejo filtro-tubo para dejarlo incubar 1 minuto a temperatura ambiente, se volvió a centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto, se desechó el líquido filtrado y se colocó nuevamente el filtro en el tubo receptor. (*SureFood® PREP Advanced - Food & Feed Analysis*, n.d.)

Se agregaron 550 µL de solución amortiguadora de prelavado al filtro-columna y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto, se desechó el líquido filtrado y se colocó nuevamente el filtro en el tubo receptor. Se adicionó 550 µL de solución amortiguadora de lavado al filtro y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto, este paso se repitió una vez más, posterior a los lavados se volvió a centrifugar a 12,000 rpm durante 2 minutos para eliminar por completo la solución amortiguadora de lavado. El filtro se colocó en un tubo receptor estéril de 1.5 mL y se le añadieron 100 µL de solución amortiguadora de elución precalentado a 65°C, se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto, una vez terminado, se almacenó la muestra a -20°C hasta que se le realizaron los análisis correspondientes.

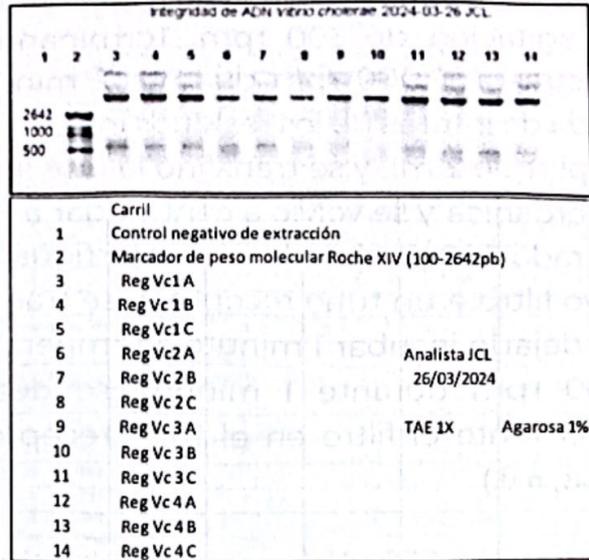
## RESULTADOS

Para las evaluaciones de los ADN extraídos se consideró los parámetros siguientes; pureza, concentración e integridad, para la pureza y concentración se realizó un análisis espectrofotométrico con el equipo Nanodrop One. La concentración fue evaluada a una absorbancia de 260nm y la pureza con un cociente de las absorbancias 260nm y 280nm con intervalos aceptables entre 1.75 - 2.05, las lecturas de las absorbancias se realizaron por triplicado por muestra y la integridad se evaluó con electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los resultados se describen a continuación en las Figuras 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

a)

Nombre de muestra	Concentración (ng/μL)	Pureza (A260/A280)
<b>EXTRACCIÓN DE ADN Vc</b>		
Reg Vc1 A	47.06	1.88
Reg Vc1 B	44.47	1.88
Reg Vc1 C	38.89	1.96
Reg Vc2 A	37.10	1.84
Reg Vc2 B	31.22	1.83
Reg Vc2 C	26.87	1.76
Reg Vc3 A	31.69	1.69
Reg Vc3 B	19.17	1.75
Reg Vc3 C	34.38	1.76
Reg Vc4 A	39.73	1.92
Reg Vc4 B	41.73	1.89
Reg Vc4 C	31.84	1.88

b)

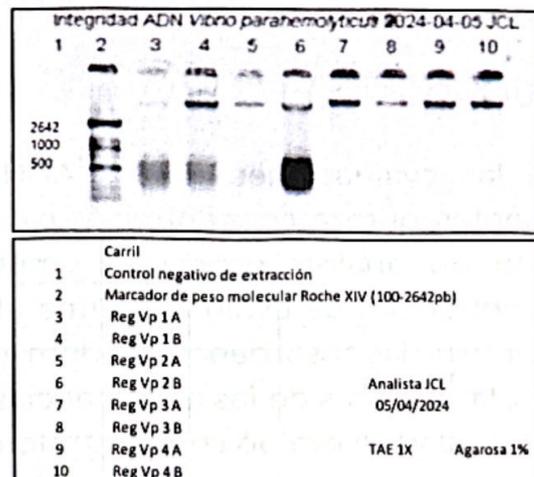


**Figura 1. Resultados de las extracciones de ADN de *Vibrio cholerae*.** Los resultados de ADN de *Vibrio cholerae* mostraron un rendimiento de 35.34 ng/μL en promedio, en los parámetros de concentración y pureza (1a), a excepción de la muestra "Reg Vc 3 A" que obtuvo un resultado por debajo de los parámetros de pureza establecidos, en la figura 1b se muestra que el ADN extraído de todas las muestras está íntegro mostrando bandas sólidas y compactas, además, no se aprecia indicios de contaminación durante el procedimiento reflejado en el control negativo de extracción.

a)

Nombre de muestra	Concentración (ng/μL)	Pureza (A260/A280)
<b>EXTRACCIÓN DE ADN Vp</b>		
Reg Vp 1 A	32.87	1.98
Reg Vp 1 B	46.10	1.86
Reg Vp 2 A	20.53	1.65
Reg Vp 2 B	125.03	2.07
Reg Vp 3 A	15.20	1.61
Reg Vp 3 B	18.28	1.58
Reg Vp 4 A	11.27	1.95
Reg Vp 4 B	14.70	1.74

b)

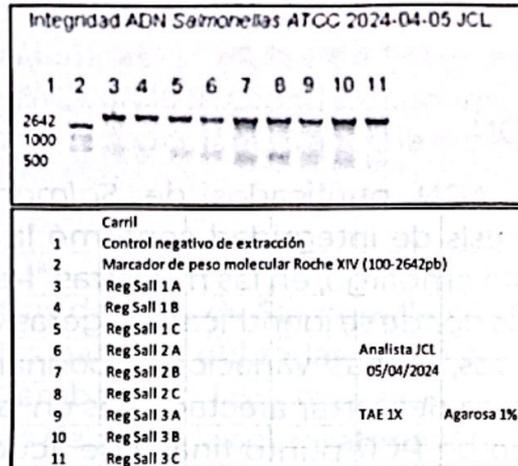


**Figura 2. Resultados de extracciones de ADN de *Vibrio parahaemolyticus*.** Los resultados de ADN de *Vibrio parahaemolyticus* mostraron variaciones en la concentración y en la pureza debido a que el botón celular no fue homogéneo en todas las muestras y esto impacta por la capacidad de unión que tienen las columnas del kit, en la figura 2b se observa ADN de diferentes pesos moleculares lo cual indica que el ADN no está totalmente íntegro, esto puede deberse a que la cepa sobrecreció, además de que la extracción no se realizó a las 24 horas de incubación.

a)

Nombre de muestra	Concentración (ng/uL)	Pureza (A260/A280)
EXTRACCIÓN DE ADN <i>Salmonellas</i> ATCC		
Reg Sall 1 A	46.32	1.86
Reg Sall 1 B	34.43	1.96
Reg Sall 1 C	50.69	2.01
Reg Sall 2 A	53.04	2.04
Reg Sall 2 B	67.64	2.00
Reg Sall 2 C	69.92	2.06
Reg Sall 3 A	49.06	2.01
Reg Sall 3 B	55.70	2.04
Reg Sall 3 C	29.65	1.95

b)

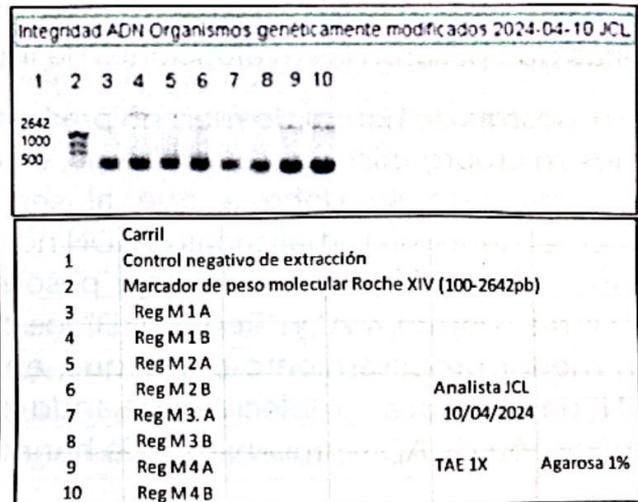


**Figura 3. Resultados de extracciones de ADN de *Salmonella* ATCC.** Los resultados obtenidos para el ADN purificado de *Salmonella* ATCC, mostraron un rendimiento de 50.72ng/μL en promedio, a su vez, en los resultados de pureza cumplen todas las muestras dentro de los intervalos a excepción del registro "Sall 2 C" el cual cuenta con un valor de una milésima superior al parámetro establecido. En la figura 3 b se muestra que el ADN extraído de todas las muestras esta íntegro mostrando bandas sólidas y compactas, además, no se aprecia indicios de contaminación durante el procedimiento reflejado en el control negativo de extracción.

a)

Nombre de muestra	Concentración (ng/uL)	Pureza (A260/A280)
EXTRACCIÓN DE ADN DE OGM'S		
Reg M 1 A	96.93	1.97
Reg M 1 B	106.16	1.98
Reg M 2 A	95.66	2.08
Reg M 2 B	129.53	2.03
Reg M 3. A	78.73	2.07
Reg M 3 B	101.06	1.99
Reg M 4 A	197.50	2.02
Reg M 4 B	205.97	2.03

b)



**Figura 4. Resultados de extracciones de harina de maíz.** Los resultados de las extracciones de harinas de maíz mostraron un rendimiento de 126.44ng/μL en promedio, dos muestras no entran en el parámetro de pureza por variaciones mínimas como se muestra en la figura 4 a. En la figura 4b se muestra que el ADN extraído de todas las muestras esta íntegro mostrando bandas sólidas y compactas, a diferencia de las cepas que presentan una banda de alto peso molecular estas

muestras presentan una banda de aproximadamente <100 pb, esto puede deberse a la naturaleza de la muestra, además, no se aprecia indicios de contaminación durante el procedimiento reflejado en el control negativo de extracción.

## DISCUSIÓN

Para los ADN purificados de *Salmonella* ATCC y *Vibrio cholerae*, en la electroforesis de integridad confirmó la extracción de ADN genómico de alta calidad, sin embargo, en las muestras "Reg Sall 2 C y Reg Vc 3 A" se presenciaron resultados donde se identificaron ligeras variaciones en los parámetros de pureza establecidos, dichas variaciones podrían afectar la amplificación del gen de interés, para descartar afectaciones en las muestras se propondrían evaluar por un ensayo de PCR punto final y de acuerdo al resultado descartar o incluir las muestras como controles para futuros análisis. Los ADN extraídos de las cepas de *Vibrio parahemolyticus* tuvieron inconvenientes durante su fase de adaptabilidad de las células en el caldo de soya tripticasa, esto se debió a que el caldo se sobresaturó de *V. parahemolyticus* agotando las fuentes de energía en un periodo corto de tiempo que, a su vez, llevó al microorganismo a una fase de muerte antes de lo esperado provocando la apoptosis celular. Dicho esto, la electroforesis en la figura 2b muestra en los pozos 3, 4 y 6 rastros degradados de ADN de las células muertas, como consecuencia, interfieren estos rastros en los análisis como un control positivo, las muestras antes mencionadas no se pueden considerar como control positivo, además, las muestras en los pozos 3, 5 y 8 presentan una baja concentración, por lo tanto tampoco se pueden considerar controles, siendo solo las muestras "Reg Vp 3 A, Reg Vp 4 A y Reg Vp 4 B" las únicas que pasaron las evaluaciones de integridad.

Las muestras de harina de maíz no presentan un ADN íntegro como en las cepas de los microorganismos, sin embargo, esto no indica un mal tratamiento de las muestras, esto se debe a que al ser muestras de harinas procesadas y principalmente nixtamalizadas el ADN no se encuentra íntegro y presentan estas bandas más difuminadas de bajo peso molecular. un caso particular son las muestras "Reg M 4 A" y "Reg M 4 B" los cuales son muestras de maíz triturado con menor procesamiento por lo que, en el pozo 9 y 10 se logra a observar un ADN de alto peso molecular dejando a entender una buena extracción y purificación de ADN proveniente de harinas de maíz.

Las muestras pertenecientes a las cepas de *V. cholerae* fueron analizadas por analistas de la CCAYAC mostrando en todas las muestras la amplificación del gen *ctxAB* por PCR punto final con un tamaño de 777 pb. Además de mostrar la amplificación correspondiente, el CNE no mostró indicios de contaminación lo cual indica un manejo y un tratamiento óptimo desde el comienzo del análisis.

Las muestras serán registradas y almacenadas a ultracongelación para ser empleadas como controles en futuros análisis.

## PERSPECTIVAS

Las muestras de *V. parahemolyticus*, las harinas de maíz y de *Salmonella* ATCC serán analizadas por analistas de la CCAYAC con la finalidad de confirmar que las muestras sigan manteniendo los genes correspondientes a fecha de término de este informe.

## CONCLUSIÓN

En resumen, se encontró que las muestras de ADN de *Salmonella* ATCC y *Vibrio cholerae* son de alta calidad y adecuadas para ser utilizadas como controles en análisis moleculares futuros. Sin embargo, las muestras de *Vibrio parahemolyticus* presentaron problemas debido a la sobresaturación de células en el caldo de soja tripticasa, lo que llevó a la muerte celular prematura. Por otro lado, las muestras de harina de maíz mostraron un ADN difuminado de bajo peso molecular que no influyeron en el análisis posterior por PCR tiempo real. Las muestras de *V. cholerae* mostraron amplificación del gen *ctxAB* por PCR punto final, siendo almacenadas como controles para futuros análisis.

## BIBLIOGRAFÍA

*BAM Chapter 28: Detection of Enterotoxigenic Vibrio cholerae* | FDA. (n.d.). Retrieved May 18, 2024, from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-28-detection-enterotoxigenic-vibrio-cholerae>

*High Pure PCR Template Preparation Kit*. (n.d.). Retrieved May 19, 2024, from <https://lifescience.roche.com/global/en/products/others/high-pure-pcr-template-preparation-kit-3684811.html>

Institute for Health and Consumer Protection. (2011). *Compendium of reference methods for GMO analysis*. <https://doi.org/10.2788/16086>

*Laboratory Procedures for the Microbiological Analysis of Foods - Canada.ca*. (2006.). Retrieved May 19, 2024, from <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/research-programs-analytical-methods/analytical-methods/compendium-methods/laboratory-procedures-microbiological-analysis-foods-compendium-analytical-methods.html>

*Servicios Analíticos* | Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios | Gobierno | *gob.mx*. (2016.). Retrieved May 19, 2024, from <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/servicios-analiticos>

*SureFood® PREP Advanced - Food & Feed Analysis*. (n.d.). Retrieved May 19, 2024, from <https://food.r-biopharm.com/products/surefood-prep-advanced/>