



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

Proyecto de Servicio Social

Evaluación de los cebadores ConsH y Hcom1 para identificar el género *Helicobacter*, y BFHpy1 para identificar *Helicobacter pylori* en niños con manifestaciones gastroduodenales

Presenta:

Mauricio Magdiel Martínez Garces

Asesor Interno Dra. Marisol López López
Prof. Titular "C" TC. Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana-
Xochimilco

Asesor externo: Dra. Carolina María
Antonieta Romo González
Investigador en Ciencias Médicas C
Laboratorio Bacteriología Experimental,
Instituto Nacional de Pediatría

Firma de visto bueno

Firma de visto bueno

Índice

Introducción	3
Antecedentes.....	5
Justificación	7
Objetivo general	8
Objetivos particulares	8
Metodología.....	9
Resultados.....	14
Discusión	20
Conclusión	23
Bibliografía.....	24
Anexos	29
Anexo I. Membrete de Taq polimerasa 2x Master Mix Red, de la marca Ampliqon, Cat. No.: A190303	29
Anexo II. Método de Extracción de DNA en Biopsias Gastrointestinales	30

Introducción

Helicobacter pylori es una bacteria que coloniza el tracto gastrointestinal, y se estima que aproximadamente la mitad de la población mundial son portadores (Yang et al, 2022). Aunque muchas personas no experimentan síntomas, la infección por *H. pylori* puede causar una serie de problemas gastroduodenales, incluyendo dolor abdominal crónico recurrente (síntoma característico en niños), gastritis, úlceras pépticas, e incluso el desarrollo de cáncer gástrico; estas dos últimas patologías se presentan en adultos (Ranjbar et al, 2017;Weng et al, 2021).

Por otro lado, también se han reportado casos de infección con diversas especies de *Helicobacter* no-*Helicobacter pylori* (NHPH) en humanos: Estas especies tienen como huésped natural animales domésticos, de tal manera que es necesario el desarrollo de un diagnóstico capaz de identificar infecciones con NHPH, para poder dar un tratamiento oportuno (Smet et al, 2020). Por tanto, el diagnóstico de la infección por *Helicobacter* es importante para el tratamiento y la prevención de estas complicaciones. Existen diversos métodos de diagnóstico ampliamente descritos para *Helicobacter pylori*, los cuales incluyen pruebas invasivas como el cultivo, ya que requiere de una biopsia gástrica (Yoshii et al, 2020; Toyoshima et al, 2020), y pruebas no invasivas como la prueba de aliento con urea marcada con C¹⁴ y la serología a través de la medición de anticuerpos en sangre contra distintas proteínas de *H. pylori*, (Huh et al, 2018).

En la actualidad, las técnicas moleculares como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) son una herramienta importante para el diagnóstico de *H. pylori* y NHPH. La PCR permite la identificación de la bacteria en la muestra (biopsia gástrica), y es importante contar con una buena sensibilidad y especificidad (Premoli et al, 2004). En busca de mejorar

el diagnóstico de la infección por *Helicobacter* que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría, en este trabajo se para evaluó la eficacia de dos cebadores específicos para la detección del género *Helicobacter* y uno para la especie *H. pylori* ConsH, Hcom1 y BFHpy1 respectivamente, propuestos por Abdelmalek et al, 2002 y se comparó con el estatus de infección con *Helicobacter* y *H. pylori* previamente descrito en un grupo de pacientes pediátricos con manifestaciones gastroduodenales del Servicio de Gastroenterología del Instituto Nacional de Pediatría.

Antecedentes

En 1982, Barry Marshall y Robin Warren demostraron en biopsias de pacientes con gastritis y úlceras gástricas la presencia de una bacteria conocida actualmente como *H. pylori* (Marshall & Warren, 1984). Con el descubrimiento de *H. pylori* cambió un paradigma en la gastroenterología, se reconoció que la mayoría de las úlceras estomacales y las gastritis eran ocasionadas por esta bacteria y no era debido solo al uso de medicamentos o al estrés; posteriormente se llegó a establecer que *H. pylori* es un carcinógeno tipo I (Pedroza-Teran. 2019). El premio Nobel de Medicina y Fisiología en el 2005 se otorgó a Marshall y Warren por el estudio de esta bacteria.

H. pylori es un bacilo Gram-negativo y se calcula que tiene una prevalencia aproximada del 50% en la población a nivel mundial, con mayor afectación en países en vías de desarrollo, (Gravina et al., 2018). Un individuo infectado con esta bacteria puede cursar con ella como sintomático o asintomático y no todos los infectados llegan a desarrollar patologías gastroduodenales severas como cáncer gástrico (Salama et al., 2013).

Se han empleado diversas técnicas para el diagnóstico de *H. pylori*, las cuales se pueden clasificar en (1) invasivas mediante la toma de biopsia gástrica utilizada para realizar prueba rápida de ureasa, histología, cultivo bacteriano y técnicas moleculares (Huh et al,2018), y (2) no invasivas que incluyen la prueba de aliento con urea, prueba de antígeno en heces y serología. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad varía en estas últimas, además de que en el caso de la serología no es un indicativo de una infección aguda (Sabbagh et al, 2019).

Dentro de las invasivas se utilizan herramientas moleculares como la PCR, la cual es una técnica importante para confirmar el diagnóstico además del estándar de oro que es el cultivo;

debido a que esta bacteria es de difícil crecimiento por lo que se recurre a la PCR como un modo útil de confirmación. Esta técnica ha demostrado una sensibilidad y especificidad del 95% en el diagnóstico de *H. pylori*, mostrando una gran ventaja debido a que puede detectar al microorganismo sin importar su viabilidad. (Premoli et al, 2004)

La frecuencia de la infección de *Helicobacter* en niños no solo se ha observado por parte de *H. pylori*, ya que también se han identificado infecciones con otras especies de *Helicobacter* no-*Helicobacter pylori* (NHPH) (Montijo-Barrios et al, 2003; Sugano et al, 2014). Las infecciones con otras especies NHPH que no sean *H. pylori* como *H. suis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. felis*, *H. heilmanii* pueden transmitirse a los humanos a través del contacto directo o indirecto con perros, gatos y cerdos provocando gastritis, úlceras pépticas y duodenales, o linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas de bajo grado. (Taillieu et al, 2022). El cultivo de las especies NHPH es aún más complicado que el cultivo de *H. pylori* por lo cual solamente se pueden identificar por métodos moleculares.

Aunque existen diversos cebadores descritos para la identificación de *H. pylori* se busca que el método de diagnóstico sea cada vez más sensible y específico acorde a la diversidad genética que hay entre las cepas, por lo que el uso de cebadores para identificar el género *Helicobacter* es de gran utilidad para iniciar el diagnóstico de la infección por *H. pylori* ya que al tener una prueba PCR negativa para *H. pylori* pero positiva por PCR para género podría hablarnos de la presencia de otra especie diferente a *H. pylori*.

Abdelmalek y colaboradores en 2022, en su estudio: “*The validity evaluation of different 16S rRNA gene primers for Helicobacter detection urgently requesting to design new specific primers*”, propusieron diseñar cebadores específicos 16S rRNA de *Helicobacter spp.* y *H. pylori* para la identificación por PCR, con el fin de obtener un método de diagnóstico preciso

y factible en la búsqueda de bacterias del género *Helicobacter*, ya que es importante considerar y descartar la presencia de otras especies además de *H. pylori* como posible riesgo para las enfermedades gástricas. Ellos proponen los cebadores de género ConsH y Hcom1 y al cebador BFHpy1 para identificar la especie *H. pylori*, con una buena especificidad y sensibilidad; estos cebadores fueron generados con base en los genes 16S rRNA para *Helicobacter spp* y ureAB para *H. pylori*. (Abdelmalek et al, 2022).

Justificación

El diagnóstico de la infección por *H. pylori* es de gran importancia dado que su presencia ha sido asociada con el desarrollo de algunas enfermedades gastro-duodenales. La infección por *H. pylori* se adquiere normalmente en la niñez, puede permanecer por décadas si no es eliminada y puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades más severas en la etapa adulta como la úlcera-péptica, gastritis y cáncer gástrico. (Kori et al., 2018). Por ello, su detección oportuna es de importancia en pacientes cuya sintomatología ha sido manifestada, sobre todo para la toma de decisión en la práctica clínica, para dar un oportuno tratamiento en aquellos pacientes que se sugiere una infección por *Helicobacter*, la cual debe ser confirmada. La PCR como método de diagnóstico para *H. pylori* permite hacer un diagnóstico confirmatorio, pero para ello es imprescindible tener una especificidad y sensibilidad de los iniciadores para amplificar el DNA blanco presente en una muestra, por ser de gran utilidad en la detección de microorganismos de difícil cultivo como es el caso de *H. pylori*. Adicionalmente, la aplicación de esta técnica se extiende a la detección de otras especies NHPH.

Objetivo general

- Evaluar la concordancia de identificación de *Helicobacter spp* y *H. pylori* con los cebadores ConsH y Hcom1 mediante PCR punto final con respecto a un estatus previo de infección por *Helicobacter spp* y *H. pylori* en biopsias gástricas de niños con sintomatología gastroduodenal.

Objetivos particulares

- Evaluar la especificidad de los cebadores ConsH y Hcom1 para identificar el género *Helicobacter* mediante la técnica de PCR punto final.
- Evaluar la sensibilidad de los cebadores ConsH y Hcom1 para identificar el género *Helicobacter* mediante la técnica de PCR punto final.
- Evaluar la especificidad del cebador BFHpy1 para identificar *Helicobacter pylori* mediante PCR punto final.
- Evaluar la sensibilidad del cebador BFHpy1 para identificar *Helicobacter pylori* mediante PCR punto final.

Metodología

1. Origen y diseño *In silico* de cebadores ConsH, Hcom1 y BFHpy1

Los cebadores ConsH, Hcom1 y BFHpy1 probados en este estudio son propuestos por Abdelmalek S. et al 2022. Este estudio compara diversos oligonucleótidos de PCR para la identificación de *Helicobacter spp* y *H. pylori*, que ya habían sido reportados, además propone el cebador ConsH como un posible estándar de oro para la identificación de *Helicobacter spp*, el cebador Hcom1 diseñado por Choi, et al., 2001 para la identificación de *Helicobacter spp*, y BHFpy1 propuesto por Flahou, B. 2014 fueron los que consideró este estudio con mejores resultados (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores analizados en el estudio.

Gen blanco	Cebador	Secuencia del cebador	Producto (bp)	Referencia
16S rRNA	ConsH	5'-TCG CTA AGA GAT CAG CCT ATG TCC T-3' 5'-ATT CCA CCT ACC TCT CCC ACA CT-3'	435	(Abdelmalek, S. 2022)
16S rRNA	Hcom1	5'-GTA AAG GCT CAC CAA GGC TAT-3' 5'-CCA CCT ACC TCT CCC ACA CTC-3'	390	(Choi, et al., 2001)
UreAB	BFHpy1	5'-AAA GAG CGT GGT TTT CAT GGC G-3' 5'-GGG TTT TAC CGC CAC CGA ATT TAA-3'	217	(Flahou, B. 2014)

Secuencia de los cebadores utilizados en el estudio, incluyendo el gen blanco, la secuencia del cebador, el tamaño del producto amplificado (bp) y la referencia bibliográfica.

2. Evaluación de los cebadores para identificar *Helicobacter spp* y *H. pylori*

Para determinar las condiciones de la reacción de PCR de cada cebador se realizaron reacciones con un gradiente de temperatura en la etapa de alineamiento de 50 °C a 60 °C, con la finalidad de determinar la temperatura óptima, así como la concentración adecuada de los tres pares de nucleótidos. Para la reacción de PCR en punto final se utilizó la Taq polimerasa 2x Master Mix Red, de la marca Ampliion, Cat. No.: A190303 (véase anexo I), en una reacción de 25 µL como volumen final de la reacción (véanse las Tabla 2).

Tabla 2. Preparación de solución de trabajo para PCR de *Helicobacter* de género y *H. pylori*

Solución de trabajo	
Master Mix Red	12.5 µL
Cebador sentido	0.6 µL
Cebador anti sentido	0.6 µL
H₂O	10.3 µL
DNA (muestra)	1-2 µL
Volumen final	25 µL

Las condiciones de preparación del Master Mix para la reacción de PCR es similar en los tres cebadores utilizados, excepto en el volumen del DNA de las muestras, Hcom1 solo se utilizó 1 µL, mientras que en ConsH y BFHpy1 se utilizó 2 µL para la reacción, con los tres cebadores se utilizó una concentración de 0.50 Mm de los cebadores.

Finalmente, la observación de los productos de PCR, con todos los cebadores, se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, en un voltaje de 50V por 45 minutos.

2.1 Especificidad

Para comprobar la especificidad de los cebadores se probaron con DNA extraído de diferentes especies de *Helicobacter* como: *Helicobacter pylori* (*H.p*); *Helicobacter felis* (*H.f*); *Helicobacter suis* (*H.s*); *Helicobacter salomonis* (*H. ss*); *Helicobacter helmannii* (*H.h*); *Helicobacter bizzozeronii* (*H.b*); y DNA de diferentes bacterias como controles negativos, *Pseudomona aeruginosa* (*P.a*) y *Staphylococcus aureus* (*S.a*).

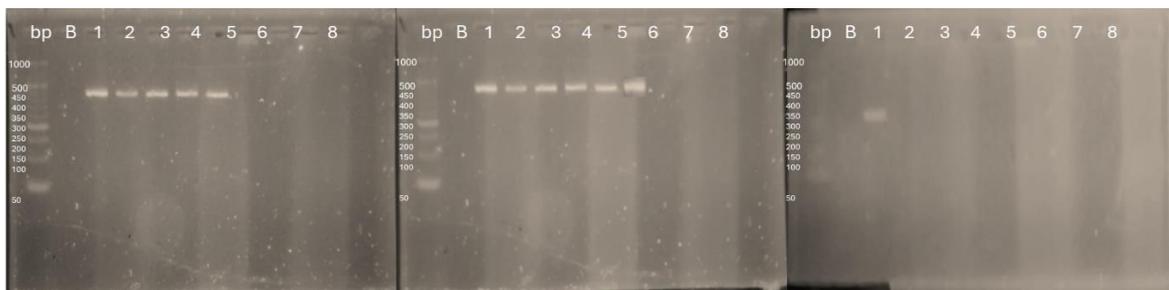


Figura 1. PCR con DNA de cepas control. B: blanco, 1: *H.p*, 2: *H.f*, 3: *H.s*, 4: *H.ss*, 5: *H.h*, 6: *H.b*, 7: *P.a* y 8: *S.a*. El primer gel es el cebador ConsH con un amplicon de 435bp; el segundo gel es Hcom1 con un amplicon de 390bp; y el tercer gel es de BFFpy1 con un amplicon de 217bp.

2.2 Sensibilidad

Para determinar la sensibilidad de los cebadores se realizó una curva de detección con DNA de cepa *H. pylori* J99 en concentraciones de 10, 20, 50, 80 y 120 ng/ μ L. De igual manera se realizó una curva de detección con DNA de biopsias gástricas en concentraciones de 5, 8, 11, 14, 17 y 20 ng/ μ L.

3. Evaluación de cebadores ConsH, Hcom1 y BFHpy1 en muestras clínicas

Una vez determinadas las condiciones experimentales de los tres cebadores en cepas de *Helicobacter* mediante PCR en punto final, se realizó un estudio en ciego con 50 muestras de DNA de biopsias gástricas, provenientes de 25 pacientes con dos regiones del estómago cada uno (antro y cuerpo), las cuales se obtuvieron previamente de un estudio de frecuencia de infección por *H. pylori* y NHPH en niños con manifestaciones gastroduodenales del INP. El estatus de infección para *H. pylori* y otras especies NHPH fue determinado en el Laboratorio de Bacteriología Experimental durante el periodo de 2019-2022 (véase método de extracción de DNA en biopsias gástricas, anexo II) utilizando los siguientes cebadores ureC para identificar *H. pylori* y cebadores ureAB utilizados para identificar cada especie de NHPH considerados como nuestro estándar de oro para comparar los resultados con los cebadores propuestos en este trabajo. El estatus de *Helicobacter spp* fue obtenido de acuerdo a la siguiente definición: se consideró la presencia del género *Helicobacter* cuando el paciente tuviera un estatus positivo de *Helicobacter spp* el cual definimos como previo resultado positivo de PCR ureC (*H. pylori*) y/o con diversos cebadores ureAB (NHPH, *Helicobacter No-H. pylori*).

4. Análisis estadístico

La concordancia, entre los resultados del estatus de infección por el género *Helicobacter* y por *H. pylori* mediante la prueba de PCR utilizando los cebadores ConsH y Hcom1 (género *Helicobacter*) y BFHpy1 (*H. pylori*) y los resultados con cebadores utilizados previamente en el laboratorio, se evaluó mediante el índice Kappa (también conocido como coeficiente Kappa de Cohen). Esta es una medida estadística utilizada para evaluar la concordancia observada en un grupo de datos, representando la proporción de acuerdos observados más allá del azar (Abraira V. 2000; Tang, W. 2015), y donde se utiliza como criterio:

Kappa (κ)	Grado de acuerdo
< 0,00	Sin acuerdo
0,00-0,20	Insignificante
0,21-0,40	Mediano
0,41-0,60	Moderado
0,61-0,80	Sustancial
0,81-1,00	Casi perfecto

Resultados

Las condiciones de amplificación para cada uno de los cebadores se muestran en la Tabla 3

Tabla 3. Condiciones de amplificación de la PCR para identificar *Helicobacter spp* y *H. pylori*

	ConsH		Hcom1		BFHpy1	
	Temp	Tiempo	Temp	Tiempo	Temp	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	94 °C	5 min	94 °C	5 min
Desnaturalización	94°C	1 min	94°C	1 min	94°C	1 min
Hibridación	52°C	2 min	63°C	1 min	59°C	2 min
Extensión	72°C	2 min	72°C	1min	72°C	2 min
Extensión final	72°C	5 min	72°C	4 min	72°C	2 min
Ciclos	30		35		40	

Los datos sombreados muestran las condiciones determinadas en este trabajo, y sin sombreadar aquellas condiciones que ya han sido reportadas.

En el caso de Hcom1 y ConsH las condiciones ya habían sido reportadas (Abdelmalek, S. 2022; Choi, et al., 2001); sin embargo, se realizaron algunas modificaciones. Las condiciones de BFHpy1 se utilizaron tal como lo describen (Flahou, B. 2014).

Al evaluar la especificidad de los tres cebadores se encontró que el cebador de género Hcom1 identificó a todas las especies de *Helicobacter* y el cebador BHFpy1 identificó específicamente a *H. pylori* con un tamaño de amplicón de 390pb y 217pb, respectivamente. El cebador de género ConsH amplificó un producto de 435pb e identificó a todas las especies de *Helicobacter* probadas excepto a la especie *H. bizzozeronii*.

Por otro lado, la sensibilidad de los tres cebadores se determinó con DNA de cepa de cada especie amplificando en todos los casos desde la concentración de 10 ng/μL. Posteriormente se evaluó la sensibilidad de los cebadores en DNA de biopsias gástricas con una amplificación a partir de la concentración de 8 ng/μL.

Los resultados de concordancia de los cebadores ConsH, Hcom1 y BFHpy1 para identificar *Helicobacter spp* y *H. pylori* con respecto al estatus previo de infección por *Helicobacter spp* y *H. pylori* se observa en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Resultado de PCR con los cebadores ConsH y Hcom1 para identificar *Helicobacter spp*.

Paciente	Región de la muestra	Estatus de <i>Helicobacter spp</i>	ConsH	Hcom1
1	antro	+	+	-
	cuerpo	+	+	-
2	antro	-	-	+
	cuerpo	-	-	+
3	antro	-	-	+
	cuerpo	-	-	+
4	antro	-	-	-
	cuerpo	-	-	+
5	antro	-	-	+
	cuerpo	-	-	+
6	antro	-	-	-
	cuerpo	+	-	+
7	antro	+	+	+
	cuerpo	+	+	-
8	antro	-	-	-
	cuerpo	-	-	-
9	antro	-	-	+
	cuerpo	-	+	-
10	antro	-	+	+
	cuerpo	-	-	-
11	antro	-	+	+
	cuerpo	-	+	+
12	antro	+	+	+
	cuerpo	-	+	+

13	antro	+	+	+
	cuerpo	-	-	+
14	antro	-	-	+
	cuerpo	-	+	+
15	antro	+	+	+
	cuerpo	+	+	+
16	antro	-	-	-
	cuerpo	-	+	+
17	antro	+	+	+
	cuerpo	+	+	+
18	antro	+	+	+
	cuerpo	+	+	+
19	antro	-	+	+
	cuerpo	-	-	-
20	antro	-	-	+
	cuerpo	-	+	-
21	antro	+	+	-
	cuerpo	+	-	+
22	antro	-	-	+
	cuerpo	-	-	-
23	antro	-	-	-
	cuerpo	-	+	+
24	antro	+	-	+
	cuerpo	+	+	+
25	antro	+	+	-
	cuerpo	+	+	-

Tabla 5. Resultado de PCR con los cebadores ureC y BFHpy1 para identificar *H. pylori*.

Paciente	Región de la muestra	UreC	BFHpy1
1	antro	+	+
	cuerpo	+	+
2	antro	-	+
	cuerpo	-	+
3	antro	-	+
	cuerpo	-	+

4	antro	-	-
	cuerpo	-	-
5	antro	-	-
	cuerpo	-	-
6	antro	-	+
	cuerpo	-	+
7	antro	+	+
	cuerpo	+	+
8	antro	-	-
	cuerpo	-	-
9	antro	-	-
	cuerpo	-	+
10	antro	-	+
	cuerpo	-	+
11	antro	-	-
	cuerpo	-	+
12	antro	+	+
	cuerpo	-	+
13	antro	+	+
	cuerpo	-	+
14	antro	-	-
	cuerpo	-	-
15	antro	+	-
	cuerpo	+	-
16	antro	-	-
	cuerpo	-	+
17	antro	+	+
	cuerpo	+	+
18	antro	-	-
	cuerpo	-	+
19	antro	-	-
	cuerpo	-	+
20	antro	-	-
	cuerpo	-	-
21	antro	+	+
	cuerpo	+	+
22	antro	-	-

	cuerpo	-	-
23	antro	-	-
	cuerpo	-	-
24	antro	-	-
	cuerpo	-	-
25	antro	+	-
	cuerpo	+	-

Tabla 6. Análisis de concordancia del cebador ConsH y estatus de *Helicobacter spp.*

		Estatus de <i>Helicobacter spp.</i>		
		Positivo	Negativo	Total
ConsH	Frecuencia de columnas %			
	Positivo	17 89.47	10 32.26	27
	Negativo	2 10.53	21 67.74	23
	Total	19	31	50

La concordancia de los resultados del estatus de infección por *Helicobacter spp.* previamente reportado (ureC y/o ureAB, Laboratorio Bacteriología Experimental) comparado con el estatus obtenido mediante el cebador fue moderada: coeficiente kappa de Cohen de 0.52 (IC95% 0.112-0.749), con una sensibilidad encontrada de 89.47 % y especificidad de 67.74%.

Tabla 7. Análisis de concordancia del cebador Hcom1 y estatus de *Helicobacter spp.*

		Estatus de <i>Helicobacter spp</i>			
		Frecuencia de columna %	Positivo	Negativo	Total
Hcom1	Positivo		13 68.42	19 61.29	32
	Negativo		6 31.58	12 38.71	18
	Total		19	31	50

La concordancia de los resultados del estatus de infección por *Helicobacter spp* previamente reportado (ureC y/o ureAB, Laboratorio Bacteriología Experimental) comparado con el estatus obtenido mediante el cebador Hcom1 fue insignificante: coeficiente kappa de Cohen de 0.062 (IC95% 0.122-0.302), con una sensibilidad encontrada de 68.42 % y especificidad de 38.71%.

Tabla 8. Análisis de concordancia del cebador BFHpy1 y estatus de *H. pylori*.

		UreC			
		Frecuencia de la columna %	Positivo	Negativo	Total
BFHpy1	Positivo		10 71.43	15 41.67	25
	Negativo		4 28.57	21 58.33	25
	Total		14	36	50

La concordancia de los resultados del estatus de infección por *H. pylori* previamente reportado (ureC, Laboratorio Bacteriología Experimental) comparado con el estatus obtenido mediante el cebador BFHpy1 fue mediana: coeficiente kappa de Cohen de 0.24 (IC95% 0.123-0.481), sensibilidad de 71.42 % y especificidad de 58.33%

Discusión

El diagnóstico mediante PCR para *H. pylori* y para otras especies de *Helicobacter* No-*H. pylori* (NHPH) es una herramienta crucial en la identificación precisa y temprana de la infección, lo que facilita un tratamiento oportuno y efectivo, que ayuda a prevenir complicaciones asociadas con la infección por estas bacterias. Esta técnica se considera simple, precisa y factible en comparación con otros métodos de diagnóstico y su validez y precisión dependen en gran medida del diseño de los cebadores, aunque una de las limitantes que puede presentarse es la cobertura de determinación de diversas cepas circulantes a lo largo de distintas regiones geográficas debido a la variabilidad genética que existe entre las cepas. Por lo anterior, se requiere del uso de cebadores que presenten buena sensibilidad y especificidad para la identificación de la bacteria del género *Helicobacter*, siendo la más frecuente *H. pylori*, por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo evaluar tres cebadores previamente investigados por Abdelmalek et al, 2022 para ver su eficacia en la identificación de *Helicobacter* en nuestras muestras clínicas de biopsias gástricas que llegan al laboratorio para diagnóstico de la infección.

De acuerdo con el análisis estadístico de los dos cebadores evaluados, ConsH mostró ser el mejor para la identificación de *Helicobacter spp* en las muestras clínicas de los pacientes de este estudio, a diferencia del cebador Hcom1. Sin embargo, el valor de concordancia con respecto a nuestro parámetro de estándar de oro se muestra como grado de acuerdo moderado. Para Abdelmalek S .et al. ConsH podría considerarse como un posible estándar de oro para el diagnóstico de *Helicobacter spp*, ya que su evaluación *in silico* como *in vitro* mostró buenos resultados en cuanto a sensibilidad el límite de detección del cebador ConsH fue de 250 y 25 pg en muestras clínicas de heces y biopsias, respectivamente y cuando evaluaron su

especificidad *in silico* identificaron todas las cepas de *Helicobacter* probadas y no identificaron ninguna cepa que no fuera del género *Helicobacter*. Cuando lo probaron en muestras clínicas, ConsH identificó 99 (40.7%) casos positivos a *Helicobacter spp* en 243 muestras clínicas de biopsia. En nuestro estudio la sensibilidad es aceptable con 8ng cantidad aceptable para una muestra de DNA de biopsia gástrica, en cuanto a su especificidad al probarlo con otras bacterias no del género *Helicobacter* como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* no hubo reconocimiento y al probarlo en muestras clínicas de biopsia gástrica se encontró una especificidad del 67%, este valor hace sentido con lo que observamos al evaluar la especificidad de este cebador con DNA de diferentes especies de NHPH (*H. suis*, *H. bizozzeronii*, *H. salomonis*, *H. felis*, *H. heilmannii*) resultando que el cebador ConsH no identifica a la especie *H. bizozzeronii* a pesar de ser un cebador diseñado por el autor para identificar el género *Helicobacter* de acuerdo a la evaluación que ellos hicieron *in silico*. Esto podría explicarse a que, aunque la región está conservada entre el gen 16S RNAr en el caso de esta especie puede ocurrir cierta variación en dicha región en esta especie en nuestra población infectada, considerando que además de las regiones conservadas, el 16S RNAr contiene regiones hipervariables que son altamente específicas para especies o géneros biológicos. A pesar de las diversas ventajas de la PCR, las altas tasas de mutación de *Helicobacter spp*, el polimorfismo en el sitio de unión en el extremo 3' en genes codificadores de proteínas, es una situación que es conocida en *H. pylori*, pero aún no descrito en las otras especies no pylori, todo esto pudiendo afectar la eficiencia de amplificación y pueden llevar a resultados falsos negativos.

Con respecto al cebador Hcom1, diseñado para identificar género *Helicobacter*, mostró un grado de acuerdo insignificante, con respecto a los resultados obtenidos previamente sobre el estatus de infección con *Helicobacter spp* en nuestras muestras clínicas. Aunque presentó una sensibilidad de detección de 8ng en muestras clínicas y al evaluar su especificidad con varias especies de *Helicobacter* este fue capaz de identificarlas, la concordancia fue baja. Para Abdelmalek et al, este cebador fue considerado no significativo para el uso en el diagnóstico de *Helicobacter spp*. Sin embargo, Farshad et al., 2004 determinó que el cebador Hcom1 tiene una buena especificidad en la identificación de *Helicobacter spp*, con una buena sensibilidad a concentraciones mínimas de DNA. Por otro lado, el cebador BFHpy1 mostró un grado de concordancia mediano, con respecto a los resultados obtenidos previamente sobre el estatus de infección con *H. pylori* en nuestras muestras clínicas, considerándose no un buen cebador para identificar *H. pylori* , lo cual también señala Abdelmalek et al., 2022 pues no encontraron buena especificidad debido a que al probar con otras bacterias no del género *Helicobacter*, hubo un reconocimiento hacia *K. pneumoniae*, en nuestro caso si observamos especificidad hacia *H. pylori* ya que al probarla con las distintas especies de *Helicobacter*- No *Helicobacter pylori* estas no fueron reconocidas por el cebador, al igual que bacterias no del género *Helicobacter* como *Pseudomonas auroginosa* y *Staphylococcus aureus* no fueron identificadas. En cuanto a sensibilidad la concentración donde se observa detección de *H. pylori* en biopsias gástricas con este cebador fue 8ng. Por otro parte, Flahou, et al., quienes originalmente diseñaron el cebador BFHpy1 y lo evaluaron en un estudio de muestras de biopsia en chimpancés y simios, lo consideran para su uso en el diagnóstico de *Helicobacter*.

Estos resultados nos llevan a considerar que de los tres cebadores evaluados se podría considerar el uso de Hcom1 para el diagnóstico de *Helicobacter spp*, como previa identificación específica de cada una de las especies dentro del diagnóstico molecular de *Helicobacter* en el laboratorio de Bacteriología Experimental. Las siguientes consideraciones deben ser importantes para diseñar adecuadamente cebadores para identificar *Helicobacter spp*: (1) especificidad, los cebadores deben ser altamente específicos para *Helicobacter* y no producir amplificación cruzada con otros microorganismos presentes en la muestra, para evitar falsos positivos; (2) sensibilidad, deben ser capaces de detectar incluso cantidades mínimas de DNA en la muestra; conservación de la secuencia, los cebadores deben estar diseñados para regiones conservadas del genoma de *Helicobacter* para garantizar que la PCR pueda detectar diferentes cepas de la bacteria, esto es crucial para abordar la diversidad genética de *Helicobacter* y evitar la falta de detección de ciertas cepas; (3) eficacia clínica, es importante no solo el diseño *in silico* y esto implica validar los cebadores en muestras clínicas y comparar los resultados con otros métodos de diagnóstico para evaluar su precisión y confiabilidad.

Conclusión

El cebador ConsH mostró mejor índice de concordancia, sin embargo, debe considerarse que no es capaz de identificar una de las especies NHPH, por lo que su aplicación en el diagnóstico de infección por *Helicobacter spp* en muestras clínicas de biopsias gástricas es cuestionable.

Bibliografía

- Abdelmalek, S., Shokry, K., Hamed, W., Abdelnaser, M., Aboubakr, A., Elenin, S. A., Ali, M., Mostafa, M., & Abou-Okada, M. (2022). The validity evaluation of different 16s rRNA gene cebadores for helicobacter detection urgently requesting to design new specific cebadores. *Scientific reports*, 12(1), 10737. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14600-4>
- AMPLIQON. (2023). Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED. Recuperado de <https://ampliqon.com/download.ashx?sku=A190303>
- Abraira V. (2000). El índice kappa. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-familia-semergen-40-pdf-S113835930173955X>
- Choi, Y.K., Han, J.H., Joo, H.S., (2001). Identification of novel Helicobacter species in pig stomachs by PCR and partial sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3311–3315.
- Chahuán, J., Pizarro, M., & Riquelme, A. (2022). Métodos diagnósticos para la detección de infección por Helicobacter pylori. ¿Cuál y cuándo deben solicitarse? *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 52(1). <https://doi.org/10.52787/agl.v52i1.176>
- Dore, M. P., & Pes, G. M. (2021). What Is New in Helicobacter pylori Diagnosis. An Overview. *J Clin Med*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/jcm10102091>
- Eusebi, L. H., Zagari, R. M., & Bazzoli, F. (2014). Epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*, 19 Suppl 1, 1–5. <https://doi.org/10.1111/hel.12165>
- Flahou, B., Modrý, D., Pomajbíková, K., Petrželková, K. J., Smet, A., Ducatelle, R., Pasmans, F., Sá, R. M., Todd, A., Hashimoto, C., Mulama, M., Kiang, J., Rossi, M., & Haesebrouck, F. (2014). Diversity of zoonotic enterohepatic Helicobacter species and detection of a putative novel gastric Helicobacter species in wild and wild-born

captive chimpanzees and western lowland gorillas. *Veterinary microbiology*, 174(1-2), 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.032>

Farshad S.(2004). Simultaneous Detection of Helicobacter Genus and Helicobacter pylori Species using a Multiplex PCR Method. Recueperado de <http://ibj.pasteur.ac.ir/article-1-494-en.pdf>

FitzGerald, R., & Smith, S. M. (2021). An Overview of Helicobacter pylori Infection. *Methods Mol Biol*, 2283, 1-14. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1302-3_1

Fernandez-Caso, B., et al, T. (2022). Are molecular methods helpful for the diagnosis of Helicobacter pylori infection and for the prediction of its antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*, 13, 962063. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962063>

Gravina, A. G., Zagari, R. M., De Musis, C., Romano, L., Loguercio, C., & Romano, M. (2018). Helicobacter pylori and extragastric diseases: A review. *World J Gastroenterol*, 24(29), 3204-3221. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i29.3204>

Garces-Duran, R., Llach, J., Da Fieno, A., Cordova, H., & Fernandez-Esparrach, G. (2022). Endoscopic diagnosis of H. pylori infection. *Gastroenterol Hepatol*. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2022.09.008> (Diagnóstico endoscopico de la infeccion por H. pylori.)

Huh, C. W., & Kim, B. W. (2018). The Korean journal of gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe chi, 72(5), 229–236. <https://doi.org/10.4166/kjg.2018.72.5.229>

- Kori, M., Daugule, I., & Urbonas, V. (2018). Helicobacter pylori and some aspects of gut microbiota in children. *Helicobacter*, 23 Suppl 1, e12524. <https://doi.org/10.1111/hel.12524>
- Méndez-Álvarez, S., & Pérez-Roth, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(3), 183-192. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-la-pcr-multiple-microbiologia-clinica-13058027>
- Montijo-Barrios, E., Celestino-Pérez, O. Y., Morelia-Mandujano, L., Rojas-Maruri, C. M., Smet, A., Haesebrouck, F., De Witte, C., & Romo-González, C. (2023). Helicobacter bizzozeronii infection in a girl with severe gastric disorders in México: case report. *BMC Pediatrics*, 23(1), 364. <https://doi.org/10.1186/s12887-023-04142-7>
- Marshall, B. J., & Warren, J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1(8390), 1311-1315. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91816-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91816-6)
- Premoli, Gloria , González, Anajulia, Millán-Mendoza, Beatriz, Percoco, Tiziana, & Vielma, Amilcar. (2004). Diagnóstico de Helicobacter pylori mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(2), 85-90. Recuperado en 15 de junio de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602004000200001&lng=es&tlng=es.
- Pedroza-Teran, L. et al (2019). Asociación de la infección por Helicobacter Pylori y el riesgo de pólipos colorrectales: una cohorte del Hospital Regional 1, “Carlos McGregor

- Sánchez”, IMSS. *Endoscopia*, 31(Supl. 2), 166-169. Epub 14 de febrero de 2022. <https://doi.org/10.24875/end.m19000079>
- Ranjbar, R., Behzadi, P., & Farshad, S. (2017). Advances in diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 64(3), 273–292. <https://doi.org/10.1556/030.64.2017.008>
- Sugano, K., Tack, J., Kuipers, E. J., Graham, D. Y., El-Omar, E. M., Miura, S., Haruma, K., Asaka, M., Uemura, N., Malfertheiner, P., & faculty members of Kyoto Global Consensus Conference (2015). Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, 64(9), 1353–1367. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309252>
- Salama, N. R., Hartung, M. L., & Muller, A. (2013). Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*, 11(6), 385-399. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3016>
- Sabbagh, P., Javanian, M., Koppolu, V., Vasigala, V. R., & Ebrahimpour, S. (2019). *Helicobacter pylori* infection in children: an overview of diagnostic methods. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 38(6), 1035–1045. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03502-5>
- Smet, A., & Menard, A. (2020). Review: Other *Helicobacter* species. *Helicobacter*, 25 Suppl 1, e12744. <https://doi.org/10.1111/hel.12744>
- Taillieu, E., Chiers, K., Amorim, I., Gärtner, F., Maes, D., Van Steenkiste, C., & Haesebrouck, F. (2022). Gastric *Helicobacter* species associated with dogs, cats and pigs: significance for public and animal health. *Veterinary research*, 53(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01059-4>

- Toyoshima, O., Nishizawa, T., & Koike, K. (2020). Endoscopic Kyoto classification of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk diagnosis. *World journal of gastroenterology*, 26(5), 466–477. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i5.466>
- Tang, W., Hu, J., Zhang, H., Wu, P., & He, H. (2015). Kappa coefficient: a popular measure of rater agreement. *Shanghai archives of psychiatry*, 27(1), 62–67. <https://doi.org/10.11919/j.issn.1002-0829.215010>
- Weng, C. Y., Xu, J. L., Sun, S. P., Wang, K. J., & Lv, B. (2021). *Helicobacter pylori* eradication: Exploring its impacts on the gastric mucosa. *World journal of gastroenterology*, 27(31), 5152–5170. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i31.5152>
- Yang, H., & Hu, B. (2022). Immunological Perspective: *Helicobacter pylori* Infection and Gastritis. *Mediators of inflammation*, 2022, 2944156. <https://doi.org/10.1155/2022/2944156>
- Yoshii, S., Mabe, K., Watano, K., Ohno, M., Matsumoto, M., Ono, S., Kudo, T., Nojima, M., Kato, M., & Sakamoto, N. (2020). Validity of endoscopic features for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection status based on the Kyoto classification of gastritis. *Digestive endoscopy : official journal of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society*, 32(1), 74–83. <https://doi.org/10.1111/den.13486>

Anexos

Anexo I. Membrete de Taq polimerasa 2x Master Mix Red, de la marca Ampliqon, Cat. No.: A190303

AMPLIQON 
PCR ENZYMES & REAGENTS

Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED
2 mM MgCl₂ final concentration



Cat. No.: A190303

R190303

500 Reactions

MADE IN DENMARK

-	Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED, 2 mM MgCl ₂
ID No.	5200350
Cap colour	Purple
Content	10 x 1.25 ml

Key Features

Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED is a ready-to-use 2x reaction mix with the Ampliqon Taq DNA polymerase, the NH₄⁺ buffer system, dNTPs and magnesium chloride present. Each reaction requires 25 µl of the 2x Master Mix RED. Simply add primers, template and water to a total reaction volume of 50 µl to successfully carry out primer extensions and other molecular biology applications.

Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED offers several advantages. Set up time is significantly reduced. The chance of contaminating component stocks is eliminated. Reduction of reagent handling steps leads to better reproducibility. Standard tests can be set up with the confidence that results will be consistent every time.

There is no need to buy and use separate loading dyes. Simply load a portion of the reaction product onto an agarose gel for electrophoresis and subsequent visualization. The red dye front runs at 1000 – 2000 bp on a 0.5 – 1.5% agarose gel.

Composition of the Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (2 mM MgCl₂ final concentration)

- Tris-HCl pH 8.5, (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂, 0.2% Tween[®] 20
- 0.4 mM of each dNTP
- Ampliqon Taq DNA polymerase
- Inert red dye and stabilizer

Recommended Storage and Stability

Long term storage at -20 °C. Product expiry at -20 °C is stated on the label.

Option: Store at +4 °C for up to 6 months.

Quality Control

Taq DNA Polymerase is tested for contaminating activities, with no traces of endonuclease activity, nicking activity or exonuclease activity.

Protocol

This protocol serves as a guideline to ensure optimal PCR results when using Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED. Optimal reaction conditions such as incubation times, temperatures, and amount of template DNA may vary and must be determined individually.

1. Thaw Taq 2x Master Mix RED and primers. **It is important to thaw the solutions completely and mix thoroughly before use to avoid localized concentrations of salts.** Keep all components on ice.
2. Prepare a reaction mix. Table 1 shows the reaction set up for a final volume of 50 µl. If desired, the reaction size may be scaled down. Use 10 µl of the Taq 2x Master Mix RED in a final volume of 20 µl.

Table 1. Reaction components (reaction mix and template DNA)

Component	Vol./reaction*	Final concentration*
Taq 2x Master Mix	25 µl	1x
25 mM MgCl ₂	0 µl (0 – 5 µl)	2 mM (2 – 4.5 mM)
Primer A (10 µM)	1 µl (0.5 – 5 µl)	0.2 µM (0.1 – 1.0 µM)
Primer B (10 µM)	1 µl (0.5 – 5 µl)	0.2 µM (0.1 – 1.0 µM)
PCR-grade H ₂ O	X µl	-
Template DNA	X µl	genomic DNA: 50 ng (10 – 500 ng) plasmid DNA: 0.5 ng (0.1 – 1 ng) bacterial DNA: 5 ng (1 – 10 ng)
TOTAL volume	50 µl	-

* Suggested starting conditions; theoretically used conditions in brackets

3. Mix the reaction mix thoroughly and dispense appropriate volumes into reaction tubes. Mix gently, e.g. by pipetting the reaction mix up and down a few times.
4. Add template DNA to the individual tubes containing the reaction mix.
5. Program the thermal cycler according to the manufacturer's instructions. See table 2 for an example.
For maximum yield and specificity, temperatures and cycling times should be optimized for each new template target or primer pair.
6. Place the tubes in the thermal cycler and start the reaction.
7. At the end of the run, simply load a portion of the reaction product (e.g. 10 µl) onto an agarose gel for analysis.

Table 2. Three-step PCR program

Cycles	Duration of cycle	Temperature
1	2 – 5 minutes	95 °C
25 – 35	20 – 30 seconds ^a 20 – 40 seconds ^b 30 seconds ^c	95 °C 50 – 65 °C 72 °C
1	5 minutes ^d	72 °C

^a Denaturation step: This step is the first regular cycling event and consists of heating the reaction to 95 °C for 20 – 30 seconds. It causes melting of the DNA template by disrupting the hydrogen bonds between complementary bases, yielding single-stranded DNA molecules.

^b Annealing step: The reaction temperature is lowered to 50 – 65 °C for 20 – 40 seconds allowing annealing of the primers to the single-stranded DNA template. Typically, the annealing temperature is about 3 – 5 °C below the T_m (melting temperature) of the primers used.

² Extension/elongation step: Taq polymerase has its optimum activity temperature at 72 °C. At this step the DNA polymerase synthesizes a new DNA strand complementary to the DNA template strand. The extension time depends on the length of the DNA fragment to be amplified. As a rule of thumb, at its optimum temperature the DNA polymerase will polymerize a thousand bases per minute.

³ Final elongation: This single step is occasionally performed at a temperature of 72 °C for 5 minutes after the last PCR cycle to ensure that any remaining single-stranded DNA is fully extended.

Two-step PCR program

Fast 2-step PCR protocols are available using this link:

<https://www.ampliqon.com/en/faq-technology/application-notes/>

Notes:

- The final MgCl₂ concentration of this 2x Taq Master Mix RED is 2 mM. In some applications, more than 2 mM MgCl₂ is required for best results. Use 25 mM MgCl₂ to adjust the Mg²⁺ concentration according to table 3.

Table 3. Additional volume (µl) of MgCl₂ per 50 µl reaction:

Final MgCl ₂ conc. in reaction (mM)	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
Volume of 25 mM MgCl ₂	0	1	2	3	4	5

Related Products

Taq Master Mixes (500 x 50 µl reactions) *	Cat. No.
2x Master Mix, 1.5 mM MgCl ₂ final concentration	A140303
2x Taq OptiMix CLEAR, 1.5 mM MgCl ₂ final concentration	A370503
2x Master Mix RED, 1.5 mM MgCl ₂ final concentration	A180303

TEMPase Hot Start Master Mixes (500 x 50 µl reactions) *	Cat. No.
2x Master Mix A**, 1.5 mM MgCl ₂ final concentration	A230303
2x Master Mix A**BLUE, 1.5 mM MgCl ₂ final concentration	A290403

*Master mixes available also in 1.1x variants as well as 2 mM MgCl₂ variants, **Mix A is Ammonium Buffer based, also available as Mix C based on Combination Buffer.

Special TEMPase Master Mixes (500 x 50 µl reactions)	Cat. No.
Multiplex 2x Master Mix, 3 mM MgCl ₂ final concentration	A260303
GC TEMPase 2x Master Mix I – for GC-rich templates	A331703
GC TEMPase 2x Master Mix II – for GC-rich templates	A332703

Taq DNA Polymerase (500 units) *	Cat. No.
Taq DNA Polymerase 5 U/µl	A110003
• with 10x Ammonium Buffer	A111103

*Available in kits including one or two buffers (Ammonium Buffer, Standard Buffer or Combination Buffer). All kits include extra 25 mM MgCl₂.

Hot Start DNA Polymerase (500 units) *	Cat. No.
TEMPase Hot Start DNA Polymerase, 5 U/µl	A220003
• with 10x Ammonium Buffer	A221103

*Available in kits including one or two buffers (Ammonium Buffer, Standard Buffer or Combination Buffer). All kits include extra 25 mM MgCl₂.

Buffers for DNA polymerases *	Cat. No.
10x Ammonium Buffer, 3 x 1.5 ml	A301103
10x Standard Buffer, 3 x 1.5 ml	A302103
10x Combination Buffer, 3 x 1.5 ml	A303103
5x PCR Buffer RED, 6 x 1.5 ml **	A301810
PCR Grade Water, 6 x 5 ml	A360056

*Ammonium Buffer, Standard Buffer and Combination Buffer are also available as Mg²⁺ free buffers, detergent free buffers and Mg²⁺ and detergent free buffers.

**For direct gel loading and visualisation.

For Research Use Only. Not for use in diagnostics procedures.

Other product sizes, combinations and customized solutions are available. Please look at www.ampliqon.com or ask for our complete product list for PCR Enzymes. For customized solutions please contact us.

Made in Denmark

Issued 08/2021

La reacción de PCR con los cebadores analizados se realizó en un volumen de 25 µL (AMPLIQON, 2023).

Anexo II. Método de Extracción de DNA en Biopsias Gastrointestinales

En primera instancia, se homogeniza la muestra con solución salina. Posteriormente, se toman 500 µL del homogenizado y se mezclan con 600 µL de buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 + 0.1% sarcosina), 20 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y 20 µL de lisozima (5 mg/mL) en un tubo de 1.5 mL. Se deja incubando toda la noche a 50 °C. Al día siguiente, se incuban los tubos a 95 °C durante 5 minutos para inactivar la proteinasa K.

La extracción de DNA se lleva a cabo mediante la técnica de Fenol-Cloroformo, la cual consiste en:

- Agregar 540 μL de Fenol: Cloroformo: Isoamílico. Se agita con ayuda de un Vortex durante 10 segundos y se centrifuga a 14 000 RPM durante 10 minutos.
- Tomar la fase acuosa y transferirla a un tubo de 1.5 mL, teniendo cuidado de no tomar la interfase. Agregar 500 μL de cloroformo isoamílico y centrifugar a 14 000 RPM durante 10 minutos.
- Tomar la fase acuosa y transferirla a un tubo de 1.5 mL. Agregar 30 μL de acetato de sodio 3 molar y 600 μL de isopropanol frío, mezclando suavemente. Dejar precipitar toda la noche.
- Al día siguiente, centrifugar a 14 000 RPM durante 10 minutos. Después, lavar el *pellet* de DNA con 600 μL etanol al 70% centrifugando a 14 000 RPM durante 10 minutos.
- Decantar el etanol y dejar secar el pellet de ADN.
- Re-suspender el *pellet* en 100 μL de agua libre de nucleasas y dejar rehidratar a 4 °C durante toda la noche.

Una vez obtenido el DNA, se cuantifica utilizando el equipo NANODROP 2000. Se mide su concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$) y pureza, en relación con las absorbancias 260 nm/280 nm, trabajando con muestras con un valor de 1.6 a 1.9.

Se resguardan las muestras de DNA en refrigeración a -20 °C.