

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Programa de Posgrado en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Cuantificación de coliformes fecales en extractos de moluscos  
bivalvos usando el gen *LacZ***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Stefanny Karina Córdova Rangel**

Ensenada, Baja California, México

2015

Tesis defendida por

# **Stefanny Karina Córdova Rangel**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla  
Director del Comité

Dra. Roxana Rico Mora

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

Dr. José Alberto Fernández Zepeda

M. en C. José Guadalupe Espinoza Ibarria



---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Coordinador del Programa de Posgrado en Acuicultura

---

Dra. Rufina Hernández Martínez  
*Directora de Estudios de Posgrado*

Resumen de la tesis que presenta Stefanny Karina Córdova Rangel como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

## **Cuantificación de coliformes fecales en extractos de moluscos bivalvos usando el gen *LacZ***

Resumen aprobado por:

---

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Algunas áreas de cultivo de moluscos bivalvos están expuestas a la contaminación de aguas residuales, lo que puede producir la concentración de bacterias conocidas como coliformes fecales. *Escherichia coli* es la bacteria representativa de este grupo y, cuando está en concentraciones altas, es la causa principal de enfermedades gastrointestinales al consumidor. Por lo que es importante conocer la concentración de estas bacterias en los moluscos bivalvos antes de su consumo. El método convencional para la detección de coliformes fecales es el número más probable (NMP), el cual, actualmente se basa en ensayos bioquímicos del producto del gen *LacZ*. Estos ensayos tardan en producir resultados hasta las 48 h. Por lo tanto, la utilización de la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR) puede ser una alternativa en la disminución del tiempo para procesar una muestra entre 6-8 h. En este estudio se propone un protocolo para la cuantificación de coliformes fecales en moluscos bivalvos utilizando el gen *LacZ* por qPCR que pudiera ayudar a la cuantificación. Para ello se utilizó la cepa de *E. coli* Top10 y se probaron dos condiciones del material genético y dos reporteros para la qPCR. La primer condición fue: DNA de *E. coli* obtenido a través de un proceso de extracción y purificación con un kit comercial. La otra condición fue mediante la liberación del material genético de *E. coli* por el método de lisis celular térmica (MLCT) de la muestra de homogenado de ostion (HO) a analizar sin extracción ni purificación del DNA. El fluorocromo SYBR Green y una sonda de hidrólisis específica del gen *LacZ* se usaron como reporteros. Tanto el DNA de *E. coli* como el MLCT dieron resultados positivos en la amplificación al agregarlos directamente al HO. Debido a que el proceso de extracción de DNA no es 100 % eficiente, se decidió utilizar el MLCT para obtener las curvas estándar con los reporteros. El SYBR Green tuvo como límite de detección 48,000 cel·reacción<sup>-1</sup>, valor muy por arriba de los límites deseados de detección de 200 cel·reacción<sup>-1</sup>. Mientras tanto la sonda de hidrólisis con MLCT se lograron detectar muestras hasta 124 cel·reacción<sup>-1</sup>. Se considera que este procedimiento tiene potencial para su uso en la detección rápida de coliformes fecales en moluscos bivalvos.

Palabras Clave: **gen *LacZ*, coliformes fecales, moluscos bivalvos y qPCR.**

Abstract of the thesis presented by Stefanny Karina Córdova Rangel as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Master in Sciences in Aquaculture.

### **Quantification of fecal coliforms in bivalves extracts using the *LacZ* gene**

Abstract approved by:

---

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Some areas of cultivation of bivalve mollusks are exposed to sewage pollution, which can lead to the concentration of bacteria known as fecal coliforms. The *Escherichia coli* bacterium is representative of this group and, when in high concentrations, is the major cause of gastrointestinal diseases to the consumer. So it is important to know the concentration of this bacterium in bivalve mollusks before consumption. The conventional method for the detection of fecal coliforms is the most probable number (MPN), which is based on biochemical assays of the *LacZ* gene product. This tests takes more than 48 h to produce results. Therefore, using the molecular technique quantitative polymerase chain reaction, qPCR (sometimes called real-time PCR) can be an alternative in reducing the required time down to 6-8 h. In this study, a protocol for the quantification of fecal coliforms in bivalves using the gene *LacZ* for qPCR was developed. For *E. coli* Top10, two conditions of genetic material and two reporters were tested for qPCR. The first condition was: DNA of *E. coli* obtained through a process of extraction and purification with a commercial kit. The other condition was by releasing the genetic material of *E. coli* by the method of thermal cell lysis (MLCT) without extraction or purification of DNA. The fluorochrome SYBR Green and a specific hydrolysis probe for the *LacZ* gene were used as reporters. Both the DNA of *E. coli* and the MLCT gave positive results in amplification when added directly to an oyster homogenate (HO). Because the DNA extraction process is not 100 % efficient, it was decided to use the MLCT for standard curves with reporters. The SYBR Green has detection limit of 48,000 cel·reaction<sup>-1</sup>, value well above the desired detection limits of 200 cel·reaction<sup>-1</sup>. Meanwhile the hydrolysis probe with MLCT was able to detect samples with 124 cel·reaction<sup>-1</sup>. It is considered that this method has potential to be used in the rapid detection of fecal coliforms in bivalves.

Keywords: ***LacZ* gene, fecal coliforms, bivalves mollusks and qPCR.**

## Dedicatoria

*A Roberto Córdova Graillet y Cristina Rangel Morales por ser los pilares en mi desarrollo profesional.*

*A mis hermanas Daisy y Jessica por compartir conmigo la experiencia de estar lejos de casa y completar satisfactoriamente nuestras metas.*

*A Sergio Toledo por su apoyo incondicional.*

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Al director del comité Dr. Miguel Ángel del Río Portilla y a los integrantes de mi comité de tesis, Dra. Roxana Rico Mora, Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez, Dr. José Alberto Fernández Zepeda y M. en C. José Guadalupe Espinoza Ibarría. Gracias por sus valiosas sugerencias, aportes y conocimientos transmitidos durante la realización de la tesis.

A todas las personas que han aportado apoyo para el desarrollo de esta tesis:

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez por haberme prestado las instalaciones del laboratorio de Peces Marinos para la construcción del sistema de depuración, así como al técnico Luis Alberto Murillo Valenzuela por su asistencia en la construcción del sistema.

Al Dr. Manuel Alberto Segovia Quintero por permitirme realizar las evaluaciones de la calidad de agua del sistema de depuración en su laboratorio.

Al Dr. Edgar Alfonso López Landavery por brindarme el tiempo en el laboratorio para enseñarme la técnica para realizar de forma exitosa la qPCR.

A las M. en C. Anaid Saavedra Flores y M. en C. Carmen Elvira Vargas Peralta por su disposición en ofrecerme ayuda en las diferentes técnicas que se realizaron para la parte experimental de la tesis en el laboratorio de Genética.

A la Ocean. Celia Carolina Romero Romero por su asesoría en la realización del análisis estadístico y por su amistad.

Finalmente, al M. en C. Sergio Ramón Toledo Gallardo por su enseñanza y asesoría en el uso de  $\text{\LaTeX}$  para la escritura de la tesis.

A mis compañeros de maestría: Candy, Miriam, Denisse, Sara, Humberto, Romy, Caro, Lucía, Cony, Yessica y Fernando por su compañía en esta aventura.

Al grupo de genética: Erik, Josué, Rigo, Estrella, Cassandra y Eduardo por hacer amena la estancia en el laboratorio.

A toda mi querida familia por confiar en mi y que, aunque están lejos, me han apoyado incondicionalmente.

Pero en especial quiero agradecer a mis padres y hermanas que siempre han estado en primera fila apoyándome en las decisiones que he tomado, que han sabido darme ánimo en los momentos difíciles, y que se alegran enormemente con cada meta alcanzada.

# Tabla de contenido

	Página
<b>Resumen en español</b>	<b>ii</b>
<b>Resumen en inglés</b>	<b>iii</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>iv</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>v</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>xi</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Características biológicas de los moluscos bivalvos y su vinculación con la contaminación fecal . . . . .	1
1.2. Coliformes fecales en moluscos bivalvos . . . . .	2
1.2.1. Detección y cuantificación de coliformes fecales . . . . .	3
1.2.2. Uso del gen <i>LacZ</i> en la cuantificación de coliformes fecales . . . . .	8
1.3. Justificación del estudio . . . . .	9
<b>2. Hipótesis y objetivos</b>	<b>10</b>
2.1. Hipótesis . . . . .	10
2.2. Objetivos . . . . .	10
2.2.1. Objetivo general . . . . .	10
2.2.2. Objetivos particulares . . . . .	10
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>11</b>
3.1. Material biológico . . . . .	11
3.1.1. Obtención del homogenado de ostión, HO . . . . .	11
3.1.2. Cultivo de la cepa de referencia . . . . .	12
3.1.3. Extracción del DNA bacteriano . . . . .	12
3.2. Cebadores del gen <i>LacZ</i> . . . . .	12
3.3. Curva estándar con DNA bacteriano y SYBR Green, SG . . . . .	13
3.4. Cuantificación bacteriana en HO y con SG . . . . .	14
3.4.1. Método de lisis celular térmica (MLCT) . . . . .	14
3.4.2. Límite de detección . . . . .	14
3.4.3. Ensayo de enriquecimiento bacteriano . . . . .	14
3.5. Curva estándar con sonda de hidrólisis . . . . .	15
3.5.1. Ensayo con DNA bacteriano . . . . .	15
3.5.2. Ensayo con cultivo bacteriano y MLCT . . . . .	16
3.6. Cuantificación bacteriana en HO y sonda de hidrólisis . . . . .	16
3.7. Comparación entre cuantificaciones . . . . .	16
3.8. Análisis estadístico . . . . .	16
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>18</b>
4.1. Material biológico . . . . .	18



4.1.1.	Obtención del HO . . . . .	18
4.1.2.	Cultivo de la cepa de referencia . . . . .	18
4.1.3.	Extracción del DNA bacteriano . . . . .	18
4.2.	Cebadores del gen <i>LacZ</i> . . . . .	19
4.3.	Curva estándar con DNA bacteriano y SG . . . . .	20
4.4.	Cuantificación bacteriana en HO y con SG . . . . .	25
4.4.1.	Método de lisis celular térmica (MLCT) . . . . .	25
4.4.2.	Límite de detección . . . . .	27
4.4.3.	Ensayo de enriquecimiento bacteriano . . . . .	28
4.5.	Curva estándar con sonda de hidrólisis . . . . .	30
4.5.1.	Ensayo con DNA . . . . .	30
4.5.2.	Ensayo con cultivo bacteriano y MLCT . . . . .	32
4.6.	Cuantificación bacteriana en HO y sonda de hidrólisis . . . . .	33
4.7.	Comparación entre cuantificaciones . . . . .	34
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones</b>	<b>36</b>
5.1.	Conclusiones . . . . .	36
5.2.	Recomendaciones . . . . .	37
	<b>Lista de referencias bibliográficas</b>	<b>38</b>
	<b>Apéndices</b>	<b>43</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1.	Mecanismo de alimentación de los moluscos bivalvos. Modificado de Hickman <i>et al.</i> (2006). . . . .	1
2.	Principio de la qPCR utilizando los fluorocromos con afinidad al DNA y la sonda de hidrólisis. . . . .	5
3.	Ubicación del operón lac en el genoma de <i>E. coli</i> . a) Genoma de <i>E. coli</i> (número de acceso AE014075) que indica la posición del operón lac y b) Ampliación del operón Lac. Elaborada con CLC Sequence Viewer versión 7.5 de QIAGEN Company. . . . .	8
4.	Procedimiento para la obtención del homogenado de ostión, de acuerdo a lo descrito por COFEPRIS (2011). . . . .	11
5.	Ubicación de los cebadores dentro del gen <i>LacZ</i> con número de acceso JX072964 en el GenBank. . . . .	19
6.	Curvas generadas a partir de diluciones seriadas 1:4 de DNA de <i>E. coli</i> utilizando SG (LZL389 y LZR653). . . . .	21
7.	Productos de qPCR generados a partir de las diluciones seriadas 1:4 de DNA de <i>E. coli</i> con los cebadores LZL389 y LZR653 en gel de agarosa 1.5 %, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV. . . . .	21
8.	Curvas generadas a partir de diluciones seriadas 1:8 de DNA de <i>E. coli</i> utilizando SG (LZL389 y LZR653). . . . .	23
9.	Productos de qPCR generados a partir de las diluciones (1:8) de DNA de <i>E. coli</i> con los cebadores LZL389 y LZR653 en gel de agarosa 1.5 %, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV. . . . .	23
10.	Curvas generadas a partir de la inoculación de 20 ng-reacción <sup>-1</sup> ) de DNA de <i>E. coli</i> utilizando SG con los cebadores LZL389 y LZR653. . . . .	26
11.	Curvas generadas a partir de la inoculación de cultivo de <i>E. coli</i> en HO (1:10) utilizando SG con los cebadores LZL389 y LZR653. . . . .	28
12.	Curvas generadas a partir de la inoculación de células de <i>E. coli</i> en HO (1:10 y 1:100) utilizando SG con los cebadores LZL389 y LZR653. . . . .	29
13.	Curvas generadas a partir de diluciones seriadas 1:4 (a y c) y 1:8 (b y d) de DNA de <i>E. coli</i> utilizando sonda de hidrólisis con los cebadores LacZ1F, LacZ1R y LacZ1sonda. . . . .	31
14.	Gráfica generada a partir de diluciones seriadas 1:4 de DNA y 1:8 de células de <i>E. coli</i> utilizando la sonda de hidrólisis con los cebadores LacZ1F, LacZ1R y LacZ1sonda. . . . .	32

15.	Curva de amplificación generada a partir de la inoculación de células de <i>E. coli</i> en HO (1:10) utilizando el MLCT y sonda de hidrólisis con los cebadores LacZ1F, LacZ1R y LacZ1sonda. . . . .	34
16.	Gráfica generada a partir de los valores de Ct obtenidos con SG y sonda de hidrólisis con HO inoculado con células de <i>E. coli</i> . . . . .	35
D.1.	Análisis preliminar del costo de producción para muestras de HO por la qPCR, ostiones para depuración y análisis de agua por el NMP. . . . .	47

## Lista de tablas

Tabla		Página
1.	Resumen de trabajos y métodos utilizados para la detección de coliformes fecales, CF en muestras por qPCR junto con su descripción: 1) Tipo de gen, 2) Nombre de la muestra y bacteria detectar, 3) Límite de detección reportado en concentración de DNA, células y copias por reacción. . . . .	8
2.	Cebadores para qPCR seleccionados para la cuantificación de coliformes fecales. . . . .	13
3.	Cuantificación absoluta del HO (1:10) con inoculación de cultivo de <i>E. coli</i> , a partir de la ecuación $CT = -3.560 \cdot \log(\text{conc}) + 26.597$ . . . . .	27
4.	Cuantificación absoluta del HO (1:10 y 1:100) con inoculación de cultivo bacteriano de <i>E. coli</i> , a partir de la ecuación $CT = -3.572 \cdot \log(\text{conc}) + 26.642$ . Se utilizó SG con los cebadores LZL389 y LZR653. . . . .	29
5.	Cuantificación absoluta del homogenado de ostión (1:10) con inoculación de células de <i>E. coli</i> , a partir de la ecuación $CT = -3.330 \cdot \log(\text{conc}) + 42.462$ . Se utilizó sonda de hidrólisis con los cebadores LacZ1F, LacZ1R y LacZ1sonda. . . . .	33

# Capítulo 1. Introducción

## 1.1. Características biológicas de los moluscos bivalvos y su vinculación con la contaminación fecal

Los moluscos bivalvos, pelecípodos (Pelecypoda) o lamelibranquios (Lamellibranchia) son una clase del filo Mollusca con más de 50,000 especies descritas, la mayoría marinas entre las que se encuentran mejillones, ostiones y almejas (Gosling, 2003; Hickman *et al.*, 2006). Son sésiles y habitan fondos lodosos, arenosos y rocosos, también se les puede encontrar adheridos a raíces de mangle (Márquez y Jiménez, 2002). Se caracterizan por presentar lamelas branquiales que les sirven en la alimentación y el intercambio gaseoso. El mecanismo de alimentación por filtración (Figura 1), inicia con el ingreso de las corrientes de agua (oxígeno y materia orgánica) a la cavidad del manto (Gosling, 2003; Hickman *et al.*, 2006). La materia orgánica se atrapa en cordones de mucosa, la cual la secretan las células glandulares de las branquias y palpos labiales. Seguido del tamizado de las partículas en los poros de las branquias. Finalmente, por acción ciliar se dirigen hacia los palpos labiales y a la boca. Sin embargo, aquellas partículas que no se tamizan por los poros de las branquias caen a la cavidad paleal y se expulsan. A estas partículas se les atribuye el nombre de pseudoheces (Hickman *et al.*, 2006).

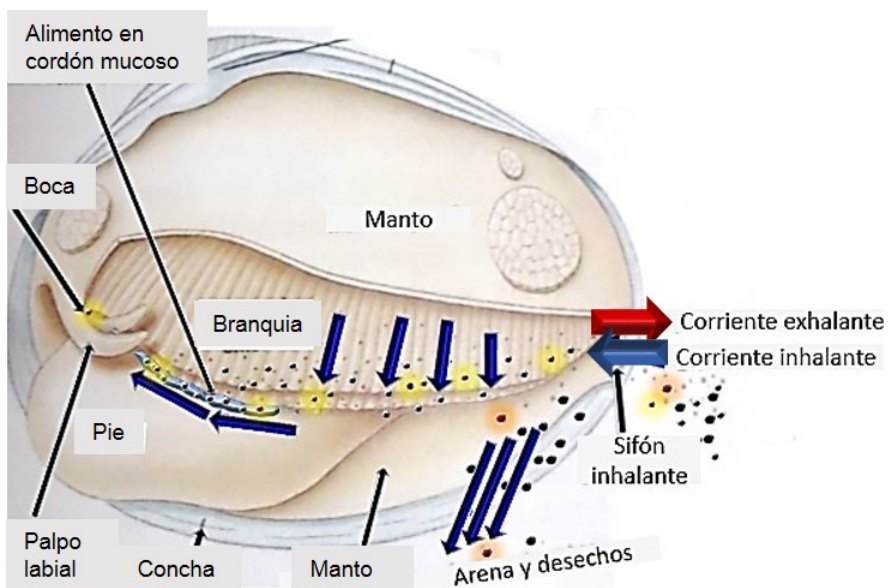


Figura 1: Mecanismo de alimentación de los moluscos bivalvos. Modificado de Hickman *et al.* (2006).

El estilo de vida sedentario de estos moluscos y su alimentación por filtración en zonas cotaminadas, favorece la retención de materia orgánica y bacterias, tanto en la cavidad paleal como en su sistema digestivo. Algunas de esas bacterias pueden resultar patógenas para el ser humano por su especificidad (*Vibrio cholerae* viobar O1) o porque su cantidad es tan alta que supera los mecanismos de defensa del ser humano (*Escherichia coli*) (Rosas *et al.*, 1985; Rippey, 1994). Por ejemplo, el ostión americano *Crassostrea virginica* filtra de 3.9 a 20 l·h<sup>-1</sup> de agua de mar (Rosas *et al.*, 1985), y pueden retener el 100 % de partículas con dimensiones de 5 a 6  $\mu\text{m}$ , mientras que para las de 2  $\mu\text{m}$  su eficiencia de retención disminuye entre el 35 al 70 % (Riisgard, 1988), la determinación de la calidad microbiológica es fundamental para garantizar la inocuidad en el consumo de moluscos bivalvos. De lo contrario, la ingesta de estos organismos en estado crudo, conlleva al riesgo de ocurrencia de enfermedades infecciosas en humanos (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2014), causadas por bacterias presentes en aguas residuales contaminadas (Rippey, 1994).

## 1.2. Coliformes fecales en moluscos bivalvos

La presencia de contaminación fecal en áreas de cultivo de moluscos bivalvos se vincula a zonas próximas con actividades agrícolas y en creciente población humana (Rosas *et al.*, 1985), ya que son propensas a la entrada de aguas de escorrentías agrícolas y aguas residuales (Borbón-Orozco *et al.*, 1994).

Por consiguiente, algunas agencias gubernamentales han mantenido la calidad y seguridad del producto a través de diversos programas (Larkin y Hunt, 2014). En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es la encargada de proteger a la población contra riesgos sanitarios en conjunto con el Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PMSMB). Se indica que moluscos bivalvos con niveles superiores a 230 CF·100 g<sup>-1</sup>, éstos deben de ingresar a un proceso de depuración por al menos 48 h (COFEPRIS, 2009).

El proceso de depuración consiste en la inmersión de los moluscos bivalvos en tanques de flujo abierto o en recirculación con entrada de agua de mar desinfectada, generalmente con ozono o luz ultravioleta. De tal manera que al introducir los

organismos en agua limpia, éstos retoman su actividad de bombeo de agua, lo que da lugar a la reducción de microorganismos en las branquias y en el aparato intestinal (Rees *et al.*, 2010). Por ello, Leal Diego *et al.* (2013) mencionan que el proceso de depuración con agua tratada con luz UV se debe considerar como la fase más importante de la producción de estos organismos previo al consumo humano.

A lo largo del proceso de depuración, entre las bacterias que se utilizan como indicadores de contaminación fecal se incluyen a los coliformes (Hood *et al.*, 1983). Las bacterias coliformes se localizan de forma persistente en la flora microbiana intestinal, por consiguiente se excretan en las heces de personas y animales homeotermos (Dombek *et al.*, 2002). Los coliformes fecales se clasifican en totales y fecales e incluye a los miembros de cuatro géneros de la familia Enterobacteriaceae: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*.

Los coliformes totales comprenden a bacterias Gram-negativas aerobias o anaerobias facultativas, no esporuladas, que fermentan lactosa con producción de gas, a partir de la actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa en un lapso de 48 h a 37 °C (Rompré *et al.*, 2002). A diferencia, los coliformes fecales logran la fermentación a 45 °C, siendo *Escherichia coli* la especie más prominente, al tener una cobertura del 90-100 % en las heces de origen humano y animales homeotermos. Bajo esta singularidad, Rosas *et al.* (1985) mencionan que la detección de *E. coli* permite determinar con mayor confiabilidad la calidad bacteriológica de los moluscos bivalvos previo a su comercialización (Nazaret *et al.*, 2005).

### **1.2.1. Detección y cuantificación de coliformes fecales**

Se ha logrado la detección y cuantificación de los coliformes fecales mediante el uso de dos tipos de métodos: los convencionales (p. ej. Número más probable (NMP) y el conteo en placa) y los moleculares (p. ej. PCR y qPCR) (De Abreu-Corrêa *et al.*, 2007). Los métodos convencionales utilizan medios de cultivo que dan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano. Lo que delimita su detección a solo células viables en un tiempo superior a 48 h (Rompré *et al.*, 2002). El NMP consiste en la estimación estadística del número de bacterias por unidad de volumen en una serie de diluciones en tubos. Para

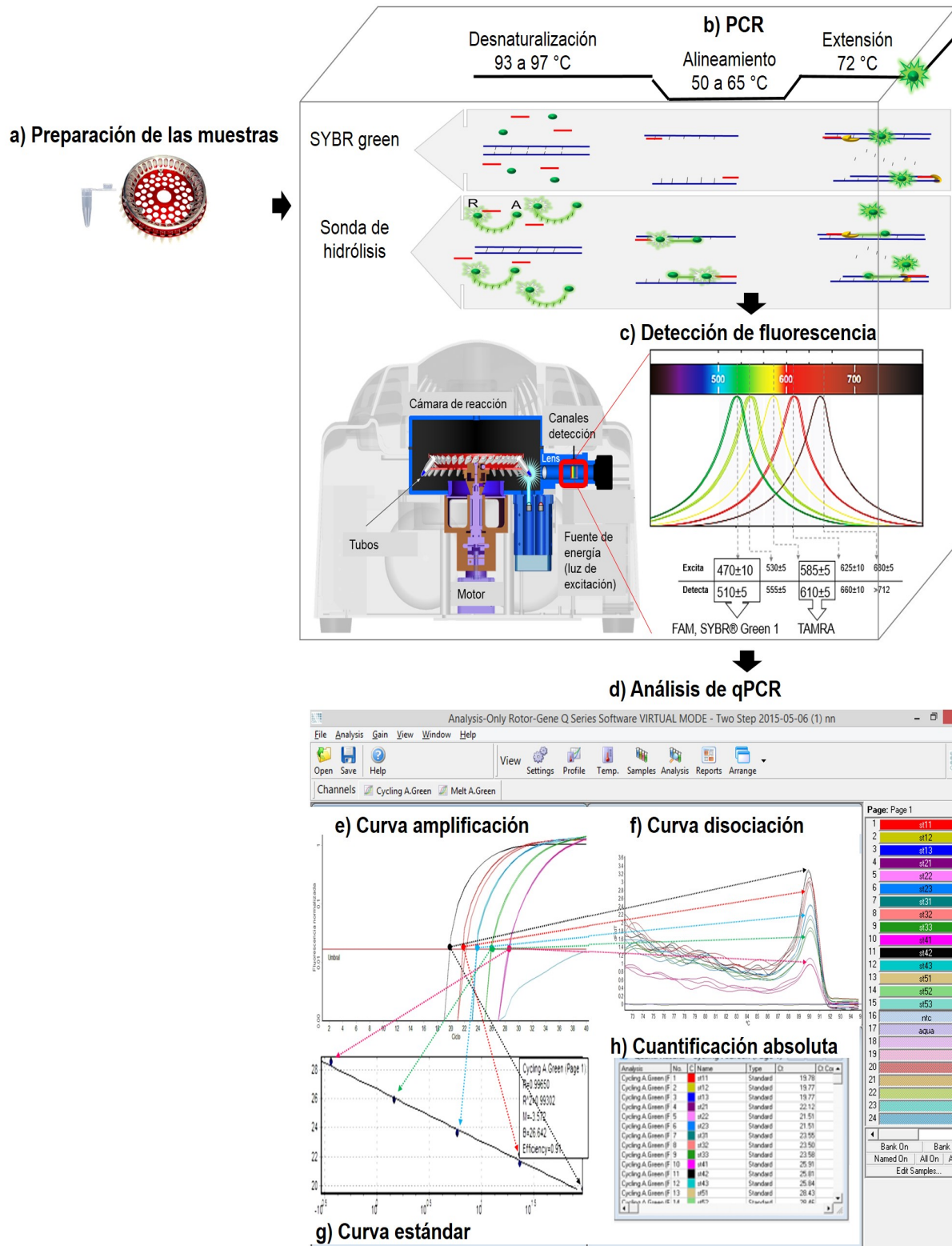
ello, divide la prueba en dos fases: la primera se denomina fase presuntiva en la cual, se utiliza medio de cultivo caldo lauril sulfato de sodio, mientras que en la fase confirmativa, se emplea el caldo específico para *E. coli*. Posterior, a las 48 h de la segunda fase se contabiliza el número de tubos positivos, es decir, con producción de gas. Este valor se busca en las tablas del NMP para conocer la cantidad de coliformes fecales por cada 100 g de tejido de moluscos bivalvos.

En contraste, el empleo de métodos moleculares permite la cuantificación temprana de bacterias presentes en alimentos entre 6 a 8 h, con la ventaja de detectar el 25 a 50 % de bacterias no cultivables. Rompré *et al.* (2002) mencionan que el porcentaje de bacterias no cultivables no es detectado por las técnicas microbiológicas convencionales debido a que, como se mencionó, se basan en características bioquímicas de las bacterias, como la técnica del NMP.

El método molecular qPCR es una técnica (Figura 2a) que se basa en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR por sus siglas en inglés), la cual, consiste en multiplicar *in vitro* fragmentos específicos del DNA, delimitados por un par de cebadores (secuencia corta de oligonucleótidos que se une en forma complementaria específica a una cadena única de DNA), lo que resulta en el copiado del fragmento de forma exponencial, utilizando tres temperaturas de: desnaturalización, hibridación y polimerización (Figura 2b). A diferencia de la PCR de punto final, en la qPCR la visualización de la amplificación del ácido desoxirribonucleico (DNA) no es hasta que concluyan todos los ciclos, al contrario, desde el inicio se observa el progreso de la reacción mediante el uso de fluorocromos (Bustin, 2000; Bustin *et al.*, 2009) que sirven como reporteros del desarrollo de la reacción.

El SYBR Green (SG) es uno de los fluorocromos que indican o reportan en tiempo real la cantidad de DNA que se va sintetizando durante la PCR (Figura 2c) y es el más utilizado, debido a su bajo costo (Muhamad *et al.*, 2011) con respecto a otros fluorocromos. El SG se caracteriza por absorber a los 480 nm y emitir a los 520 nm, cuando se intercala al DNA de doble hebra.





**Figura 2: Principio de la qPCR utilizando los fluorocromos con afinidad al DNA y la sonda de hidrólisis. a) Preparación de la muestra: extracción de DNA, preparación de la mezcla para la reacción de PCR y colocación de las muestras en el termociclador, b) PCR: reacción de la PCR para la amplificación del fragmento de interés, c) Detección de fluoróforos: La fluorescencia se analiza espectralmente y el canal de detección va en función del fluorocromo, d) Análisis de qPCR: e) Curva de amplificación (unidades de fluorescencia vs. ciclos), f) Curva de disociación (dF/dT vs. temperatura), g) Curva estándar (Ct vs. concentración) y h) Cuantificación absoluta. Modificado de Bustin 2000, y de las presentaciones otorgadas por QIAGEN Company.**

En el caso del fluorocromo SG se puede realizar la curva de disociación, ya que permite graficar la función de la lectura de fluorescencia contra la temperatura en la que se desnaturaliza el DNA amplificado (o amplicón). Al valor de fluorescencia máxima alcanzada se le denomina  $T_m$  (Figura 2f). Cada producto o amplicón tiene su propia  $T_m$ , ya que depende de la longitud y composición nucleotídica del mismo (ej. fragmentos largos tiene una  $T_m$  mayor a la de los fragmentos cortos). La presencia de dos o más picos, es decir, valores diferentes de  $T_m$ , sugiere que se ha obtenido más de un amplicón y que el proceso de amplificación no fue específico para el fragmento de interés (Tamay de Dios *et al.*, 2004).

Otro grupo de reporteros utilizados son las sondas de hidrólisis que se conocen también como sondas 5' exonucleasa de la DNA polimerasa o de marcaje doble. Para ello, se utilizan dos cebadores que amplifiquen el segmento de interés y otro oligonucleótido que es complementario a una región dentro del segmento de interés llamado sonda. Esta sonda se marca con dos fluoróforos, un reportero unido al extremo 5' y un apagador o "quencher" en el extremo 3'. Mientras la sonda se íntegra, los niveles de fluorescencia serán bajos. Conforme pasan los ciclos, la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa realiza la hidrólisis de la sonda y, por consiguiente, se liberan los fluorocromos que incrementan la fluorescencia (Bustin, 2000). El termociclador detecta el aumento en los valores registrados en el programa de qPCR. Seguidamente, para el análisis de la qPCR se procesan los valores registrados en el programa mediante una serie de gráficas (Figura 2d). Iniciando con la curva de amplificación (Figura 2e), esta curva expresa la fluorescencia detectada por el termociclador en el eje de las ordenadas (y) y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas (x). Dependiendo de la sensibilidad del sistema de detección y de los niveles de fondo del ensayo en cuestión, se calcula el umbral del ciclo, que se define como el número de ciclos de PCR donde la fluorescencia cruza el umbral del ciclo, a dicho valor se le denomina Ct. El Ct obtenido corresponde a un fragmento del segmento de DNA de interés amplificado de manera exponencial, es decir, que cada ciclo de amplificación acumula el doble del producto respecto al ciclo anterior. Lo que indica que un valor de Ct menor corresponde a una concentración inicial de DNA mayor, debido a que la fluorescencia está en función de la concentración inicial de DNA (Bustin *et al.*, 2009; Cornejo-Romero *et al.*, 2014).

Después de la amplificación, al realizar el análisis se obtiene la curva estándar (Figura 2g) que se caracteriza por graficar los valores de Ct de los estándares (diluciones seriadas de una cepa de referencia) contra las concentraciones iniciales de las diluciones. Con la curva estándar se obtienen, mediante el análisis de la regresión lineal, la ecuación, la eficiencia de amplificación y la sensibilidad de la reacción (Mackay, 2007).

Finalmente, se determina la cantidad de DNA o de células presentes en cada reacción mediante la detección de la señal de fluorescencia durante el proceso de la PCR. Esta cantidad presenta una relación directa con la cantidad de un fragmento de interés presente en una muestra, al interpolar el valor de Ct de la muestra en la ecuación de la curva estándar (Bustin, 2000; Bustin *et al.*, 2009). El método que transforma esa señal en datos de concentración de la sustancia de interés absoluta se denomina cuantificación absoluta (Figura 2h). Cabe mencionar que la cuantificación relativa usa un gen de referencia (Dorak, 2014) para cuantificar el gen de interés pero no se utilizará en el presente estudio.

Debido a su análisis cuantitativo, la qPCR se ha utilizado en el diagnóstico de coliformes fecales en muestras de interés alimentario. Ejemplo de ello son los trabajos de Koponen *et al.* (2002) y Molina IV y Lowe (2012), quienes concluyen que la cuantificación absoluta de coliformes fecales en muestras de agua es efectiva con el uso de la sonda de hidrólisis y el SG por la qPCR. A lo largo de estos trabajos (Tabla 1) se incluyen las metodologías empleadas en la preparación de la muestra, las cuales se engloban en la extracción de DNA. En cambio, en el trabajo de Blackstone *et al.* (2007), las muestras de homogenado de ostión (HO) utilizadas para la detección y cuantificación de patógenos por qPCR se someten a un método de liberación del material genético mediante la lisis celular térmica (MGLC). Este procedimiento tiene la finalidad de obtener la liberación del DNA total y la eliminación de sustancias inhibitoras presentes en el HO (ej. hemolinfa, lípidos y colágeno) (Nolan *et al.*, 2006; Poma *et al.*, 2012) para que se realice exitosamente la reacción de PCR.

**Tabla 1: Resumen de trabajos y métodos utilizados para la detección de coliformes fecales, CF en muestras por qPCR junto con su descripción: 1) Tipo de gen, 2) Nombre de la muestra y bacteria detectar, 3) Límite de detección reportado en concentración de DNA, células y copias por reacción.**

Gen/Fluoróforo	Muestra/Bacteria	Limite de detección		Referencia
		pg	células copias	
<i>LacZ</i> /sonda	Agua/ <i>E. coli</i>			Koponen <i>et al.</i> (2002)*
<i>LacZ</i> /sonda	Agua/CT		3	Foulds <i>et al.</i> (2002)
<i>uidA</i> /sonda	Agua/ <i>E. coli</i>		14	Lee <i>et al.</i> (2006)
16rRNA/SG	Agua/ <i>E. coli</i>		2.7	Liu <i>et al.</i> (2009)
<i>LacZ</i> /SG	Agua/CF	1	200**	Molina IV y Lowe (2012)
16rRNA/sonda	Agua/CF		10	Ryu <i>et al.</i> (2014)
23rRNA/sonda	Agua/ <i>E. coli</i>		10	González y Noble (2014)

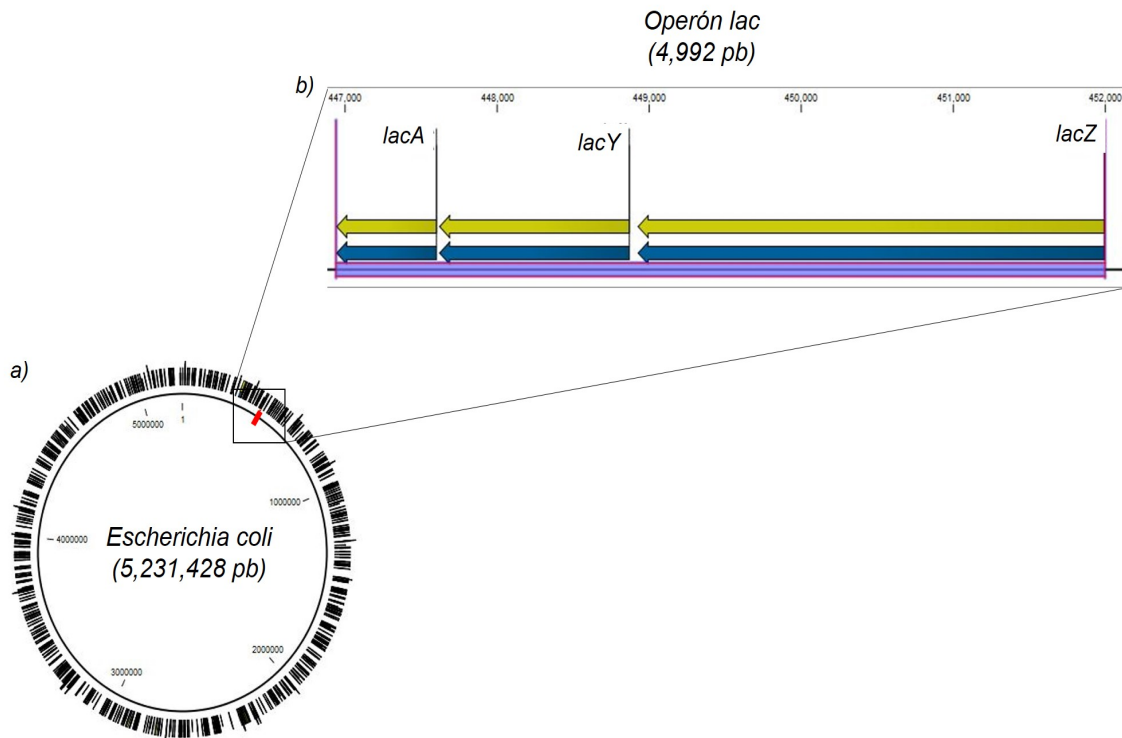
\*En este estudio no se evaluó el límite de detección.

CT= coliformes y SG= SYBR Green totales

\*\*La estimación de células se obtuvo a partir de la relación: 20 células de *E. coli* equivalen a 100 fg (Luna *et al.*, 2012).

### 1.2.2. Uso del gen *LacZ* en la cuantificación de coliformes fecales

El gen *LacZ* se localiza dentro del genoma de *E. coli* (5,231,428 pb) en la posición 448924 a 451998 con un tamaño de 3,075 pb (Kalnins *et al.*, 1983) (Figura 3). Este gen es uno de los genes estructurales del operón Lac (4,992 pb).



**Figura 3: Ubicación del operón lac en el genoma de *E. coli*. a) Genoma de *E. coli* (número de acceso AE014075) que indica la posición del operón lac y b) Ampliación del operón Lac. Elaborada con CLC Sequence Viewer versión 7.5 de QIAGEN Company.**

Específicamente, el análisis del gen *LacZ* en los métodos convencionales consiste en detectar la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa para la diferenciación de bacterias que utilicen lactosa como fuente de carbono (como es el caso de los coliformes), enzima que es codificada por el gen *LacZ*. En contraste, el uso del gen *LacZ* en métodos moleculares tiene la finalidad de amplificar material genético de coliformes fecales, mediante la qPCR.

A pesar de que la qPCR y el gen *LacZ* se aplican en muestras ambientales, no existen trabajos que detecten y cuantifiquen coliformes fecales bajo esta técnica y gen en moluscos bivalvos.

### **1.3. Justificación del estudio**

Por su forma de alimentación los moluscos bivalvos, al estar expuestos en áreas de cultivo con contaminación fecal, son susceptibles a concentrar bacterias fecales. Estas bacterias, en ciertas cantidades, son nocivas para el ser humano cuando consumen estos moluscos. Por ello, la estimación de la cantidad y tipo de bacterias de los moluscos a consumir debe realizarse en el menor tiempo posible para su salida al mercado. Actualmente esta cuantificación e identificación se hace con pruebas bioquímicas y la obtención de resultados es de aproximadamente 48 h. La existencia de técnicas moleculares para cuantificar e identificar organismos abre la puerta a buscar su aplicación en la estimación de la carga bacteriana de moluscos cultivados en aguas contaminadas por materia fecal en un tiempo menor. En este sentido, el presente estudio busca aplicar el uso del gen *LacZ* en la cuantificación y detección de coliformes fecales en moluscos bivalvos a partir de la qPCR.

# Capítulo 2. Hipótesis y objetivos

---

## 2.1. Hipótesis

Dado que el gen *LacZ* está asociado directamente con la presencia de coliformes fecales, su estimación a partir de dos tipos de fluorocromos por qPCR, nos indicará, en un tiempo menor al método convencional, la cantidad de estas bacterias en la muestra.

## 2.2. Objetivos

### 2.2.1. Objetivo general

Determinar si la técnica de qPCR, puede ser utilizada para estimaciones de carga bacteriana en moluscos bivalvos expuestos a contaminación fecal usando el gen *LacZ* como indicador de cantidad de bacterias.

### 2.2.2. Objetivos particulares

- Desarrollar un protocolo para la obtención del límite de detección del fluorocromo SYBR Green usando el gen *LacZ* mediante la técnica de qPCR para la cuantificación de coliformes fecales en moluscos bivalvos.
- Desarrollar un protocolo para la obtención del límite de detección de la sonda de hidrólisis usando el gen *LacZ* mediante la técnica de qPCR para la cuantificación de coliformes fecales en moluscos bivalvos.
- Comparar los fluorocromos usando el gen *LacZ* por qPCR para la cuantificación de coliformes fecales en moluscos bivalvos.

## Capítulo 3. Materiales y métodos

### 3.1. Material biológico

#### 3.1.1. Obtención del homogenado de ostión, HO

La preparación del HO consistió en obtener ostiones (*Crassostrea gigas*) del mercado de pescados y mariscos, ubicado en el puerto de Ensenada, B.C., México que no presentaran alteraciones visuales en la concha, o que presentaran las valvas abiertas con el fin de obtener organismos íntegros. De ahí, se trasladaron dentro de una bolsa de plástico hacia el Laboratorio de Genética del Departamento de Acuicultura del CICESE.

Al llegar al laboratorio, se dio inicio al procedimiento para la preparación de la muestra (Figura 4), iniciando con la limpieza de la concha. Los ejemplares se etiquetaron y se registraron el largo y peso total. Después, se procedió a abrir los ostiones para la obtención del homogenado, para lo cual se vació el líquido intervalvar y el cuerpo del molusco bivalvo en un vaso de precipitado estéril previamente colocado en una balanza para determinar el peso del contenido del ostión. De ahí, con una licuadora Magic Bullet MBR-1701 (Homeland Housewares) se homogenizó por 1 min todo el material que contenía el vaso de precipitado. De ese homogenado de ostión se realizaron diluciones desde 1:2, 1:10 hasta 1:100 con amortiguador de fosfato (Apéndice B), equivalente a 1, 0.1 y 0.001 g de ostión, respectivamente. Todo este protocolo se realizó de acuerdo a lo descrito por COFEPRIS (2011).



**Figura 4: Procedimiento para la obtención del homogenado de ostión, de acuerdo a lo descrito por COFEPRIS (2011).**

### 3.1.2. Cultivo de la cepa de referencia

Para establecer un control sanitario respecto a la cantidad de bacterias fecales, una referencia de crecimiento bacteriano y producción del gen *LacZ*, se utilizó *Escherichia coli* (Top 10 de Invitrogen) por ser la mejor representante de este grupo, tal como se expuso en la Sesión trigésimo quinta en Roma, Italia, 2-7 Julio 2012, liderada por FAO<sup>1</sup>/OMS<sup>2</sup> y la Comisión de CODEX Alimentarius. Esta bacteria la proporcionó el laboratorio de Genética del Departamento de Acuicultura, CICESE. Esta bacteria se utilizó en la preparación de la curva estándar y para el inoculado del HO. El crecimiento de la bacteria se realizó en medio Caldo Luria Bertani, LB (SIGMA) a 37 °C por 250 rpm durante toda la noche en una incubadora con agitación, MaxQ 4000 (ThermoFisher Scientific). Se determinó la densidad óptica DO<sub>600</sub> a partir de la lectura tomada con un nano espectrofotómetro NanoDrop Lite (ThermoFisher Scientific) para conocer la concentración de células. A partir de estas concentraciones se diluyó el cultivo para obtener los valores de concentración requeridos para análisis posteriores.

### 3.1.3. Extracción del DNA bacteriano

Se extrajo el DNA bacteriano utilizando el kit comercial DNeasy ® Blood & Tissue de QIAGEN, siguiendo la metodología del fabricante con algunas modificaciones (Apéndice A). El producto de DNA total se cuantificó con el NanoDrop Lite, a una longitud de onda de 260 nm. También, se valoró la pureza del DNA, estableciendo la relación de absorbancia 260/280 y 260/230.

## 3.2. Cebadores del gen *LacZ*

La elección de los cebadores fue en función del gen *LacZ* por su uso en métodos de monitoreo convencionales, debido a que se basan en el producto de expresión  $\beta$ -galactosidasa del gen. Se sintetizaron cebadores con la empresa SIGMA-ALDRICH Química S.A. de C.V. Los cebadores utilizados para el fluorocromo SG se seleccionaron del estudio realizado por Molina IV y Lowe (2012) para muestras de agua, mientras que

---

<sup>1</sup>Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

<sup>2</sup>Organización Mundial de la Salud



los de la sonda de hidrólisis del trabajo de Koponen *et al.* (2002) ambos para la detección y cuantificación de coliformes fecales (Tabla 2).

Complementando la evaluación de los cebadores, se realizó un análisis en el programa CLC Sequence Viewer versión 7.5 (QIAGEN Company) para verificar la ubicación de los cebadores dentro del operón Lac, específicamente en el gen *LacZ* de *Escherichia coli*. Después, se descargó la secuencia del gen *LacZ* desde el banco de genes (GenBank) con el número de acceso JX072964 (Kalnins *et al.*, 1983). Asimismo se descargaron otras secuencias de este gen depositadas en el GenBank para comparación por alineamiento.

**Tabla 2: Cebadores para qPCR seleccionados para la cuantificación de coliformes fecales.**

Cebador	Secuencia	Referencia
LZL-389	5'-ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3'	Molina IV y Lowe (2012)
LZR-653	5'-GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA-3'	
lacZF1	5'-CCTGAGGCCGATACTGTCGT-3'	Koponen <i>et al.</i> (2002)
lacZR1	5'-TTGGTGTAG ATGGGCGCAT-3'	
lacZ1sonda	[FAM]-TCCCCTCAAACCTGGCAGATGCACG-[TAM]	

### 3.3. Curva estándar con DNA bacteriano y SYBR Green, SG

Una vez revisados los cebadores para SG, se inició el proceso para la obtención de la curva estándar a partir del DNA de *E. coli*. Se realizaron diluciones seriadas (1:4 y 1:8) desde una concentración normalizada de aproximadamente  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Seguidamente, la mezcla de la qPCR se preparó con un volumen final de  $25 \mu\text{l}$  y se adicionó: 1X de Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix, 0.25 mM de cada iniciador,  $8.3 \mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas y  $4 \mu\text{l}$  del DNA extraído de cada dilución como templado. Las condiciones de amplificación (modificadas de Molina IV y Lowe, 2012) consistieron en:  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 s y alineamiento/extensión a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 60 s. Después de que la qPCR finalizó, se realizó un análisis de la curva de disociación del producto de PCR para verificar su especificidad e identidad, desde  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  con una tasa de incremento en temperatura de  $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . El análisis se realizó en el termociclador en tiempo real Rotor-Gene Q (QIAGEN). También se visualizaron los productos de PCR en una matriz de agarosa por electroforesis (Apéndice C). Por último, la curva estándar se generó a partir de los valores de Ct de cada dilución contra la concentración de DNA correspondiente, la cuál se utilizó para la cuantificación absoluta más adelante.

### **3.4. Cuantificación bacteriana en HO y con SG**

#### **3.4.1. Método de lisis celular térmica (MLCT)**

Una vez que se obtuvo el HO (ver Sección 3.1.1) se tomaron dos alícuotas de 750  $\mu$ l de la dilución (1:10), sugerida por Blackstone *et al.* (2003), quienes la utilizaron en la detección de *Vibrio parahaemolyticus* en HO por qPCR. A cada alícuota se le adicionó una concentración conocida de cultivo bacteriano. Después se compararon los métodos, del DNA por kit comercial y el método de lisis celular térmica (MLCT) propuesto por Blackstone *et al.* (2003). Este último método consistió en calentar 1 ml de muestra a 95 °C por 15 min en una plancha de calentamiento Termoblock (VWR), después se centrifugó a 4 °C a 13,225 x *g* por 10 min en una centrifuga 5415R (Eppendorf). Finalmente, el sobrenadante se utilizó como templado en la qPCR, donde las condiciones para la mezcla maestra, la reacción y la curva de disociación fueron semejantes a los puntualizados en la Sección 3.3.

#### **3.4.2. Límite de detección**

Para conocer el límite de detección del SG, se prepararon muestras en las que se adicionó cultivo bacteriano. Para ello, se realizaron diluciones, (1:2) iniciando desde 3,500,000 hasta 43,750 cel·reacción<sup>-1</sup>, para después adicionarlas en alícuotas del HO (1:10).

Luego, de cada muestra (HO + células de *E. coli*) se utilizó el MLCT para la obtención del templado. Con respecto a las condiciones de la reacción, la mezcla de la reacción y la curva de disociación, se estableció la directriz de someter a las muestras bajo el mismo procedimiento que se describe en la Sección 3.3. En relación a la cuantificación absoluta por qPCR a partir de los valores de Ct de cada muestra y con la curva estándar (obtenida de la cepa de referencia), se conoció la concentración inicial en cada muestra evaluada.

#### **3.4.3. Ensayo de enriquecimiento bacteriano**

Con la finalidad de incrementar la cantidad de bacterias iniciales en la muestra del SG, se evaluó HO a una dilución 1:10 y 1:100 considerando el trabajo de

DePaola y Hwang (1995). Ellos indican que bajo estas diluciones se incrementa la cantidad de bacterias en las muestras, lo que permite una buena detección y cuantificación en concentraciones menores de *Vibrio cholerae* en ostiones por qPCR. González *et al.* (1999) y Takahashi *et al.* (2009) indican que el enriquecimiento, es decir, incubar un tiempo la muestra; incrementa la cantidad de bacterias iniciales con un límite de detección por debajo de  $10 \text{ cel}\cdot\text{g}^{-1}$  de ostión en la cuantificación de células de *Escherichia coli* en HO por qPCR.

Por lo tanto, en este estudio se incubaron las muestras a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 h con agitación suave (15 rpm), luego se empleó la misma metodología descrita en la Sección 3.3 para el desarrollo de la qPCR.

Finalmente, se realizó la cuantificación absoluta al sustituir el valor resultante de Ct perteneciente a la muestra (HO más DNA de *E. coli*) en la ecuación de la curva estándar (obtenida de la cepa de referencia), dando lugar a la cantidad inicial del número de copias de coliformes fecales en el homogenado de ostión que se encontró en la muestra problema.

### **3.5. Curva estándar con sonda de hidrólisis**

#### **3.5.1. Ensayo con DNA bacteriano**

Con el fin de corroborar la amplificación y detección con la sonda de hidrólisis del gen *LacZ*, primeramente se realizó una serie de diluciones (1:4) de DNA de *E. coli* obtenido a partir de la extracción de DNA. La preparación de la mezcla de qPCR se conformó de  $0.125 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  de Taq DNA Polimerasa, Kapa Biosystem, 1X amortiguador para PCR, 0.2 mM de dNTP's, 0.3 mM de cada cebador, 0.1 mM de la sonda,  $15.625 \mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas y  $4 \mu\text{l}$  de DNA extraído. Las condiciones de amplificación fueron:  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 s y alineamiento/extensión a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 60 s (Molina IV y Lowe, 2012). Todo lo anterior se realizó en el termociclador en tiempo real Rotor-Gene Q (QIAGEN).

### **3.5.2. Ensayo con cultivo bacteriano y MLCT**

Con fines de incrementar el gradiente para la detección de menores concentraciones, se generó una curva estándar con diluciones (1:8) realizando previamente el MLCT descrito en la Sección (3.4.1). La mezcla y las condiciones para la qPCR fueron similares a las descritas en la Sección 3.5.1.

### **3.6. Cuantificación bacteriana en HO y sonda de hidrólisis**

Para conocer el límite de detección de la sonda de hidrólisis se prepararon muestras con HO 1:10 con la adición de  $9,000,000 \text{ cel}\cdot\text{reacción}^{-1}$ , de las cuales se obtuvo una serie de diluciones 1:8 hasta  $274 \text{ cel}\cdot\text{reacción}^{-1}$  para obtener la cuantificación absoluta de las muestras.

Luego, en cada muestra (HO + células de *E. coli*) se aplicó el MLCT para la obtención del templado. Con respecto a las condiciones de la reacción, la mezcla de la reacción y la curva de disociación fueron similares a lo que se describe en la Sección 3.4.3. En relación a la cuantificación absoluta por qPCR a partir de los valores de Ct de cada muestra y con la curva estándar (obtenida de la curva de estándar de sonda de hidrólisis con dilución de cultivo bacteriano 1:8), se conoció la concentración inicial en cada muestra evaluada.

### **3.7. Comparación entre cuantificaciones**

Se compararon las curvas estándar elaboradas con SG y la sonda de hidrólisis de DNA bacteriano para diluciones seriadas 1:4, también aquellas que se realizaron con DNA y cultivo bacteriano bajo diluciones de factor 1:4 y 1:8, respectivamente y los límites de detección en la cuantificación de *E. coli* en HO con los dos fluorocromos. Para ello, se graficaron los valores de Ct contra las concentraciones de *E. coli* utilizando el programa Microsoft Excel (2013).

### **3.8. Análisis estadístico**

En cada ensayo se realizó el análisis de regresión para la comparación entre el recuento de las células y los valores promedio de Ct de cada muestra por duplicado con

la finalidad de conocer su relación. Las concentraciones de células se expresa en unidades logarítmicas (base 10).

La cuantificación absoluta de la carga bacteriana presente en el HO se calculó al interpolar los valores de Ct a partir de la curva generada con las diluciones seriadas de la cepa de referencia de *E. coli* antes mencionada. Lo que conllevó a la evaluación de la eficiencia de la reacción de la PCR, ésta se evaluó con la pendiente, la cual a su vez se empleó en la ecuación 1 (Lim *et al.*, 2011):

$$E = 10^{((-1/pendiente)-1)} \quad (1)$$

El análisis estadístico mencionado anteriormente se realizó en el programa Rotor-Gene Q versión 2.0.2.

Para la comparación entre las pendientes de las rectas obtenidas se empleó un ANCOVA con un nivel de significancia de  $P=0.05$  para determinar si los fluorocromos (SG y sonda de hidrólisis) se comportan de la misma forma en la detección y cuantificación de coliformes fecales en HO en la qPCR. Se utilizó el programa Rcmdr de R (versión R 3.1.2).

## Capítulo 4. Resultados y discusión

---

### 4.1. Material biológico

#### 4.1.1. Obtención del HO

Los ostiones obtenidos para la obtención del HO fueron de talla comercial con los siguientes valores promedio: largo de concha de  $10 \pm 0.75$  cm y peso total  $105.88 \pm 14.18$  g. El peso promedio del cuerpo blando del ostión más el líquido intervalval fue de 93.5 g,  $n=27$ . El peso total de los ostiones obtenidos en las biometrías estuvo por debajo de lo utilizado en otros estudios que abarcan rangos desde (160-290 g) (DePaola y Hwang, 1995) o hasta (200-250 g) (Blackstone *et al.*, 2003) de ostiones con un total de 10 a 12 ostiones. Sin embargo, con fines de este estudio los valores alcanzados fueron los adecuados para estandarizar el protocolo.

#### 4.1.2. Cultivo de la cepa de referencia

La cepa de cultivo *E. coli* (Top 10) se utilizó a las 18 h de cultivo en medio LB con valores de  $DO_{600} = 0.286$ , correspondientes a  $2.29 \times 10^8$  cel·ml<sup>-1</sup> (d.e.=  $4 \times 10^6$  cél·ml<sup>-1</sup>;  $n=9$ ). Estos resultados, indican que la bacteria se encontraba en la fase de crecimiento exponencial de acuerdo con Sezonov *et al.* (2007), quienes al estudiar el crecimiento de *E. coli* determinaron que valores cercanos de  $DO_{600} = 0.2$  es indicativo de esa fase.

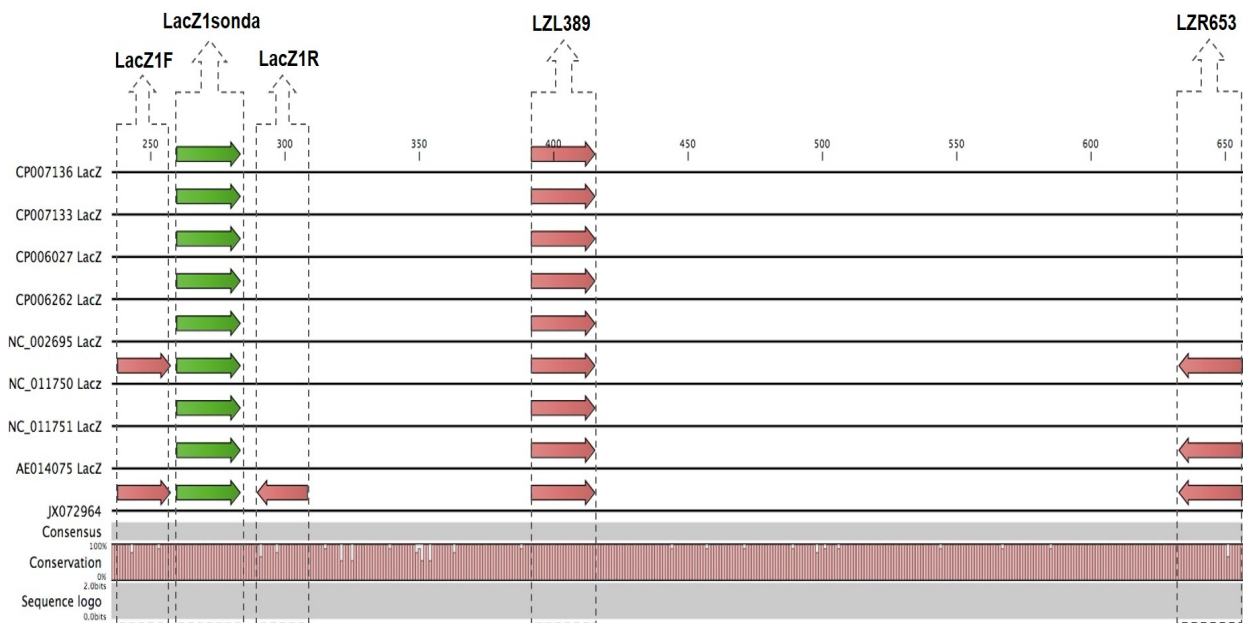
#### 4.1.3. Extracción del DNA bacteriano

Una vez obtenidos los cultivos de la cepa de referencia, se realizó la extracción de DNA, la cual alcanzó concentraciones de entre 20 a 94 ng·μL<sup>-1</sup> de DNA, cifra suficiente para el propósito del presente trabajo; de acuerdo a lo descrito en el Manual del Rotor-Gene Q (QIAGEN), se suelen necesitar valores  $\leq 100$  ng·μL<sup>-1</sup>. Con respecto a las relaciones de pureza (A260/A280) de la extracción de DNA, se mantuvieron dentro del intervalo de 1.87 a 2.0, similares a la relación (A260/A230) con 1.19 a 1.97. Autores como Olson y Morrow (2012) indican que los valores por arriba de 2.0 en la relación (A260/A280) y por debajo de 1.8 para la relación (A260/A230) son indicativos de la existencia de contaminación. Considerando lo anterior, en este estudio los valores de las

relaciones se mantuvieron dentro de los intervalos libres de contaminación, reflejando una buena calidad del DNA. Ossa *et al.* (2012) obtuvieron un porcentaje de eficiencia para extracción de DNA con el kit comercial (QIAGEN DNeasy <sup>®</sup> Blood&Tissue), superior al 72 %, frente al método tradicional de fenol: cloroformo: alcohol: isoamílico.

#### 4.2. Cebadores del gen *LacZ*

La ubicación y longitud de los cebadores (Figura 5) para los fluorocromos SG: LZR389 (400 a 424 , 24 pb), LZR653 (633 a 656, 24 pb) y sonda de hidrólisis: LacZ1F (238 a 257, 20 pb), LacZ1R (290 a 308, 19 pb) y LacZ1sonda (260 a 283, 24 pb) se localizaron en el gen *LacZ*. Sin embargo al analizar mas secuencias del gen *LacZ* se observó que había polimorfismo en los sitios de unión de los cebadores. Por lo que, para trabajos posteriores es necesario diseñar cebadores que consideren dichas variaciones y corroborar la amplificación. Es probable que se requieran cebadores degenerados con el fin de evitar falsos negativos cuando se presenten estas cepas de *E. coli*.



**Figura 5: Ubicación de los cebadores dentro del gen *LacZ* con número de acceso JX072964 en el GenBank. a) Cebadores para la sonda de hidrólisis: LacZ1F, LacZ1R y LacZ1sonda y b) Cebadores para el SG (LZR389 y LZR653). Las flechas indica la dirección (5'-3') de los cebadores y sonda. Aquellas secuencias que no tienen flecha, indican diferencias entre el cebador y la secuencia.**

Para diseñar los cebadores se deben tener en cuenta la longitud del cebador, el porcentaje de G+C y la longitud del fragmento a amplificar. Lim *et al.* (2011) mencionan que la longitud de los cebadores afecta directamente la especificidad, bajo la siguiente

primicia: la longitud debe de ser entre 16 a 24 nucleótidos, debido a que la probabilidad de que empaten una de las cuatro bases del DNA en cualquier fragmento de DNA es del 25 %. Por ejemplo, en este estudio los cebadores al contar con longitudes de 19, 20 y 24 pb presentan una probabilidad promedio de unirse a alguna secuencia de no interés de 1 en  $9 \times 10^{13}$ , lo que significa que son de especificidad alta. También el tamaño del amplicón al ser menor a 150 pb incrementa la eficiencia de la qPCR. No obstante lo anterior, el fragmento amplificado con el fluorocromo SG tuvo un tamaño de 264 pb (Rompré *et al.*, 2002; Molina IV y Lowe, 2012) y no presentó problemas de amplificación. El contenido de C+G en el cebador debe estar entre 40-60 % lo que aumentará su especificidad y temperatura de hibridación.

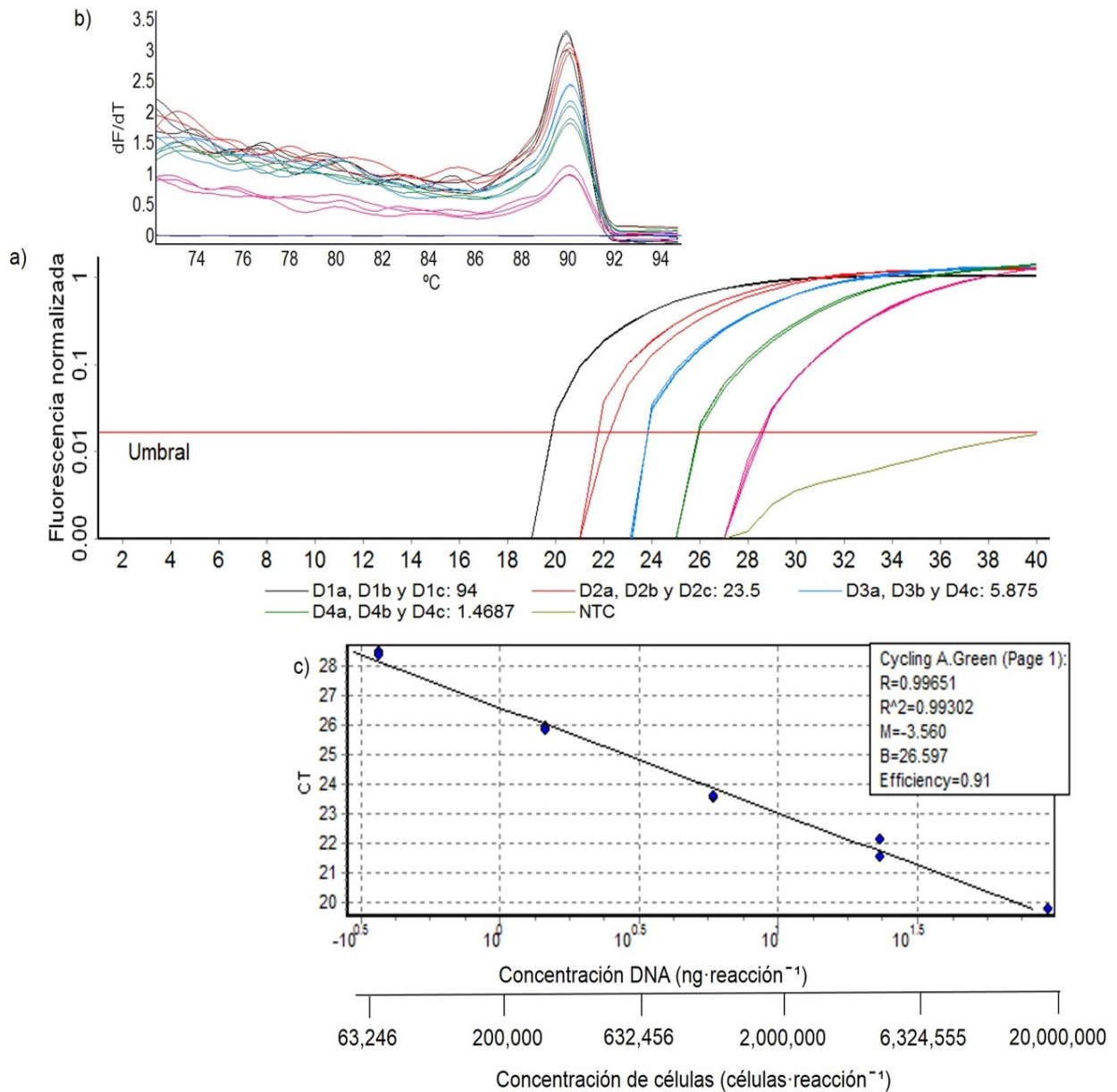
#### 4.3. Curva estándar con DNA bacteriano y SG

Para lograr el objetivo número uno, se utilizó una dilución seriada (1:4) de la concentración de DNA con SG y se obtuvieron curvas de amplificación con valores de Ct de 19.77 hasta 28.42 (Figura 6a). En las curvas de disociación correspondientes se observó una señal de disociación a los 90 °C (Figura 6b), sugiriendo la existencia de un solo fragmento amplificado y sin dímeros. La ecuación 2 obtenida de la curva estándar:

$$CT = -3.560 * \log(\text{conc}) + 26.597 \quad (2)$$

con una  $R^2=0.99302$  y una eficiencia del 91 % (Figura 6c). Los valores de DNA de 0.36 a 94 ng·reacción<sup>-1</sup> corresponden a  $7.2 \times 10^4$  y  $1.88 \times 10^7$  células, respectivamente; al utilizar el equivalente de 20 células contienen 100 fg de DNA (Luna *et al.*, 2012). La banda que se visualizó por electroforesis (Figura 7) presentó un tamaño de 264 pb.





**Figura 6:** Curvas generadas a partir de diluciones seriadas 1:4 de DNA de *E. coli* utilizando SG (LZL389 y LZR653). a) Curva de amplificación (unidades de fluorescencia normalizada vs. ciclos) de los productos amplificados con respecto a las diferentes concentraciones ( $ng \cdot reacción^{-1}$ ), b) Curva de disociación ( $dF/dT$  vs. temperatura) especificidad del fragmento con un pico a los 90  $^{\circ}C$ , c) Curva estándar ( $C_t$  vs. concentración).

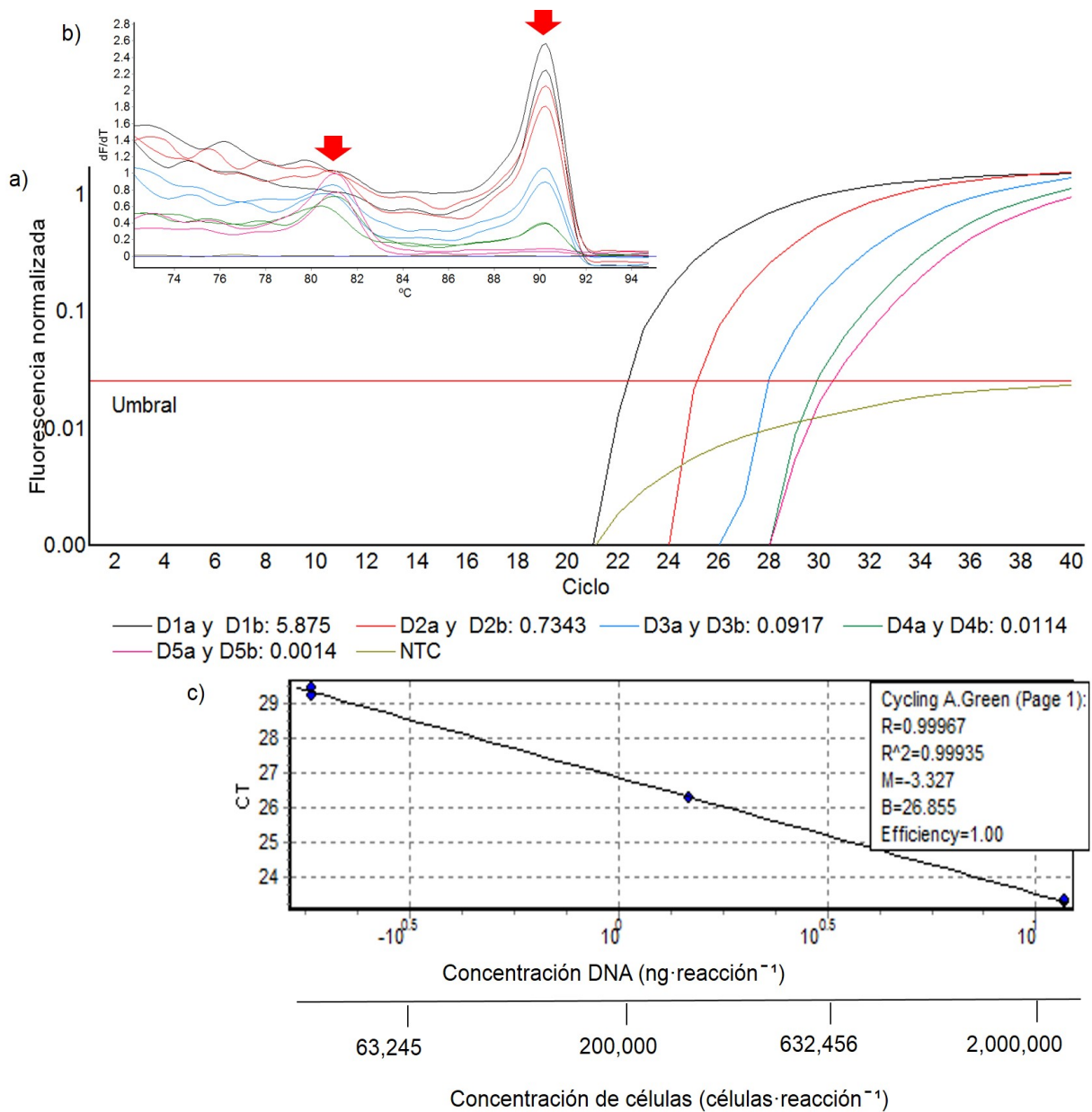


**Figura 7:** Productos de qPCR generados a partir de las diluciones seriadas 1:4 de DNA de *E. coli* con los cebadores LZL389 y LZR653 en gel de agarosa 1.5 %, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV. Donde: D1a y D1b=94; D2a y D2b=23.5; D3a y D3b=5.875; D4a y D4b=1.4687; D5a y D5b=0.3671. Todos en unidades de  $ng \cdot reacción^{-1}$ .

Con la finalidad de ampliar el intervalo de detección hacia valores de DNA menores y por consiguiente de número de células de *E. coli* detectadas en la curva estándar, se incrementó el factor de dilución a 1:8, bajo las mismas condiciones. Se obtuvo amplificaciones positivas (Figura 8a), los valores de Ct fueron de 22.26 hasta 30.31. Sin embargo, en la curva de disociación (Figura 8b) se observaron dos señales muy marcadas una a 81 °C y otra a 90 °C. En un inicio se desconoció el origen de esta señal, posteriormente se sugirió la presencia de amplificación inespecífica para la señal de la  $T_m=80$  °C. En las reacciones, las concentraciones más bajas fueron 0.0114 y 0.00114 ng DNA·reacción<sup>-1</sup> que correspondieron a 2,280 y 228 células, respectivamente. La señal de amplificación inespecífica se debió seguramente a la formación de dímeros de los cebadores. No obstante lo anterior, se obtuvo amplificación adecuada de DNA equivalente a  $1.8 \times 10^4$ - $1.8 \times 10^6$  cel·reacción<sup>-1</sup> con una ecuación 3 correspondiente al 100 % de eficiencia y una  $R^2=0.99935$  (Figura 8c).

$$CT = -3.327 * \log(\text{conc}) + 26.855 \quad (3)$$

La banda que se visualizó por electroforesis (Figura 9) presentó un tamaño de 264 pb, producto de los fragmentos amplificados por qPCR. Cabe destacar que apenas se alcanzó a observar el fragmento amplificado en las dos concentraciones más bajas.



**Figura 8:** Curvas generadas a partir de diluciones seriadas 1:8 de DNA de *E. coli* utilizando SG (LZL389 y LZR653). a) Curva de amplificación (unidades de fluorescencia normalizada vs. ciclos) de los productos amplificados con respecto a las diferentes concentraciones ( $ng$  de DNA  $\cdot$   $reacción^{-1}$ ) especificidad del fragmento con un pico a los  $90^{\circ}C$ , b) Curva de disociación ( $dF/dT$  vs. temperatura), las flechas indican los puntos que corresponden a la inespecificidad del fragmento con un pico a los  $81^{\circ}C$  y c) Curva estándar ( $C_t$  vs. concentración).



**Figura 9:** Productos de qPCR generados a partir de las diluciones (1:8) de DNA de *E. coli* con los cebadores LZL389 y LZR653 en gel de agarosa 1.5 %, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado con luz UV. Donde: D1a y D2b= 5.875; D2a y D2b= 0.7343 ; D3a y D3b= 0.0917; D4a y D4b= 0.0114; D5a y D5b= 0.0014. Todos en unidades de  $ng \cdot reacción^{-1}$ .

El protocolo antes descrito mostró amplificación para la detección de coliformes fecales con el uso del fluorocromo SG y el gen *LacZ* mediante qPCR. Estos resultados son similares al trabajo de Fukushima *et al.* (2003), quienes indican la detección de genes funcionales al utilizar este fluorocromo. También Heijnen y Medema (2006) observan que el empleo del SG para la detección de *E. coli* bajo la qPCR es apropiado por la especificidad, sensibilidad y facilidad en el manejo de la técnica dentro del intervalo de  $5 \times 10^{-5}$ - 5 ng de DNA·reacción<sup>-1</sup>. Los valores de las curvas estándar obtenidas con una M cercana a -3.3219 y una eficiencia cercana a la unidad están entre los valores aceptados para la qPCR (Higuchi *et al.*, 1993).

En este estudio se verificaron los fragmentos amplificados de la qPCR por electroforesis, los resultados con un tamaño de 264 pb concuerdan con el tamaño de los fragmentos indicados en los trabajos de Molina IV y Lowe (2012) y Rompré *et al.* (2002) para fragmentos de coliformes fecales. En contraste, Gliglio *et al.* (2003) hacen mención que no es necesario el proceso de electroforesis para la verificación de la amplificación debido a que la banda electroforética que se visualiza en la agarosa es análoga a la Tm que se obtiene de la curva de disociación. En este sentido, se recomienda obtener la curva de disociación con el fin de detectar alguna amplificación inespecífica durante la PCR. De esta forma no será necesaria la visualización de los fragmentos con electroforesis en agarosa. La presencia de dos Tm (80 y 90 °C) en la curva de disociación para la curva estándar con dilución 1:8, al presentar la característica de tener un pico más amplio para la Tm de menor temperatura en contraste a los productos de PCR de interés con un pico más estrecho en la Tm de mayor temperatura son indicadores de presencia de dímeros (Pfaffl, 2004). Los dímeros los describe Vinuesa (2009) como el producto de hibridación inespecífica de los cebadores. Por lo anterior, se puede considerar que la curva estándar se llevó a cabo satisfactoriamente para la detección de *E. coli*, en el intervalo de  $1.8 \times 10^4$ - $1.8 \times 10^7$  cel·reacción<sup>-1</sup>; por ende, su uso para la cuantificación absoluta es adecuada en este intervalo. Contrario a lo que encontraron Molina IV y Lowe (2012), quienes indican que tuvieron un límite de detección de 0.1 pg de DNA, que equivale a 200 cel·reacción<sup>-1</sup> y dado que no señalan si realizaron la curva de disociación, se considera que estos valores pueden estar asociados a la presencia de dímeros.

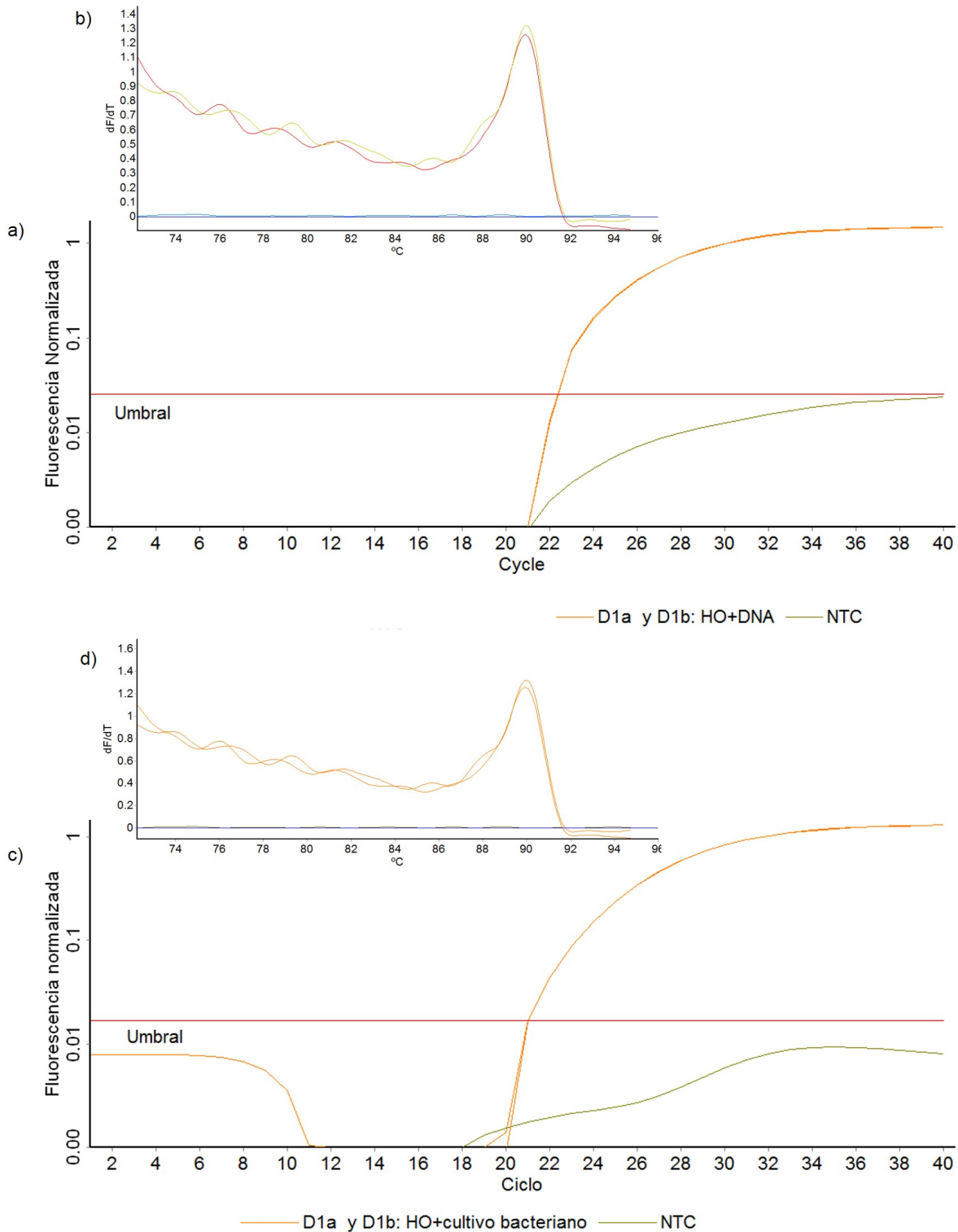
#### 4.4. Cuantificación bacteriana en HO y con SG

##### 4.4.1. Método de lisis celular térmica (MLCT)

Debido a que la extracción de DNA no es 100 % eficiente, Blackstone *et al.* (2003) utilizaron una dilución del HO, lo calentaron a 95 °C por 15 min, y posteriormente lo centrifugaron y enfriaron a 4 °C por 5 min. En el presente trabajo se utilizó este procedimiento con el fin de corroborar la amplificación con el HO + células de *E. coli* y HO previamente inoculado con DNA bacteriano. El resultado de la extracción de DNA del HO + DNA bacteriano mostró amplificación positiva con un Ct de 22.08 correspondiente para los 20 ng·reacción<sup>-1</sup> (Figura 10a). Mientras que el MLCT mostró amplificación positiva con un Ct 22.19 para el HO + 7.3x10<sup>7</sup> cel·reacción<sup>-1</sup> (Figura 10c). Se verificó la amplificación en ambos con la curva de disociación (Figura 10b y d) y se observó una T<sub>m</sub> a 90 °C.

Los resultados de la amplificación con el método de extracción de DNA para la muestra (HO + DNA) fueron positivos debido a que en la literatura, éste es el proceso que se realiza para asegurar la eliminación de inhibidores de PCR presentes en el DNA. Radstrom *et al.* (2003) mencionan que en muestras de comida uno de los componentes que funge como inhibidor es el colágeno. Dicho componente se encuentra presente en los moluscos bivalvos (Sriket, 2014). A pesar de ello, también se obtuvo amplificación con el MLCT, es decir, se logró la eliminación de los inhibidores de la PCR y se liberó el DNA bacteriano a la disolución sin la necesidad de someter la muestra a una serie de reactivos y filtros. Este resultado concuerda con el reportado en los trabajos de Blackstone *et al.* (2003), al emplearlo en la detección de *Vibrio parahaemolyticus*, así como en el trabajo de Blackstone *et al.* (2007), en la detección de *Vibrio cholera*, ambos utilizaron como matriz de alimento HO y qPCR. Por consiguiente, el empleo del MLCT se usó para la estandarización con la ventaja de la reducción en tiempo de dos horas en comparación con la extracción de DNA y a su vez la disminución en el costo de \$4000.00 MXN., valor de un kit comercial para 50 extracciones<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Revisado de: <https://www.qiagen.com/mx/shop/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-mini-kit/>, consultado en septiembre 2015.



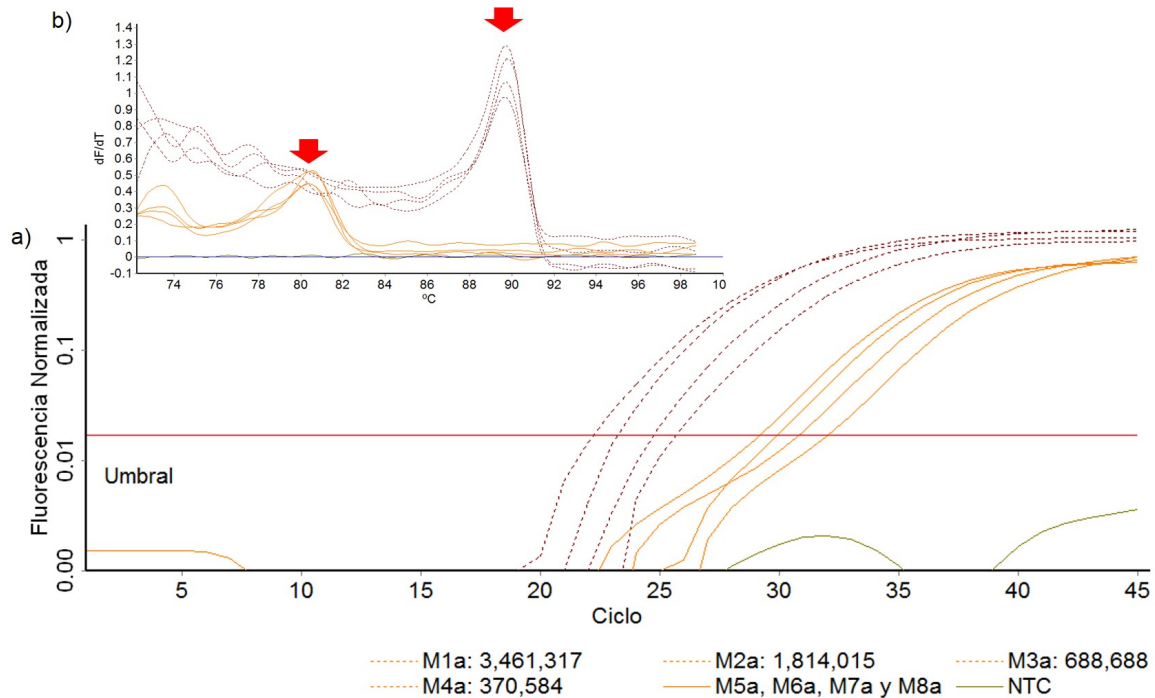
**Figura 10:** Curvas generadas a partir de la inoculación de  $20 \text{ ng}\cdot\text{reacción}^{-1}$ ) de DNA de *E. coli* utilizando SG con los cebadores LZL389 y LZR653. (a y c) Curva de amplificación (unidades de fluorescencia normalizada vs. ciclos) del producto amplificado con respecto a las diferentes concentraciones ( $\text{ng}\cdot\text{reacción}^{-1}$ ) y (b y d) Curva de disociación ( $dF/dT$  vs. temperatura) especificidad del fragmento con una  $T_m$  a los  $90^\circ\text{C}$ .

#### 4.4.2. Límite de detección

Con el fin de determinar el nivel mínimo de detección mediante la amplificación del gen *LacZ* utilizando HO con SG agregando cultivo bacteriano y el MLCT. Se inoculó el HO con diluciones seriadas de cultivo bacteriano. Se obtuvo una amplificación positiva en la curva de amplificación con un valor inicial de Ct de 22.22 hasta 25.69 (Figura 11a) correspondientes a la cantidad inicial de DNA (Tamay de Dios *et al.*, 2004). Los valores teóricos obtenidos al cuantificar espectrofotométricamente la densidad inicial de cultivo bacteriano y compararlos con el valor calculado con la Ecuación 3, tuvieron cierta correspondencia (Tabla 3). Las amplificaciones se corroboraron en la curva de disociación (Figura 11b), donde se presentó una Tm de 90 °C. Sin embargo, nuevamente se observó inespecificidad con una Tm de 80 °C en la curva de disociación para concentraciones de 38,710 a 6,047 cel·reacción<sup>-1</sup> señal de la formación de dímeros de cebadores. Contrario a lo que reportaron Molina IV y Lowe (2012) en la detección de coliformes fecales en muestras de agua sin la formación de dímeros de cebadores mediante qPCR y utilizando SG junto con los mismos cebadores (LZL389 y LZR653) empleados en el presente estudio. Por otro lado, se observó que el uso del HO a una dilución (1:10) con SG fue adecuado en la detección y cuantificación por qPCR de células de *E. coli*, lo que coincide con Bischoff *et al.* (2005). En relación a las amplificaciones positivas con el SG en este estudio coinciden con lo reportado por Pepin *et al.* (2008), quienes también obtuvieron valores positivos en la amplificación del Herpesvirus 1 en HO.

**Tabla 3: Cuantificación absoluta del HO (1:10) con inoculación de cultivo de *E. coli*, a partir de la ecuación  $CT = -3.560 \cdot \log(\text{conc}) + 26.597$ .**

Muestra	Ct	Teórico cel·reacción <sup>-1</sup>	Cuantificación absoluta cel·reacción <sup>-1</sup>
M1a	22.22	3,500,000	3,461,317
M2a	23.22	1,750,000	1,814,016
M3a	24.72	875,000	688,688
M4a	25.69	437,500	370,584



**Figura 11: Curvas generadas a partir de la inoculación de cultivo de *E. coli* en HO (1:10) utilizando SG con los cebadores LZL389 y LZR653. (a) Curva de amplificación (unidades de fluorescencia normalizada vs. ciclos) del producto amplificado con respecto a las diferentes concentraciones (cél-reacción<sup>-1</sup>). (b) Curva de disociación (dF/dT vs. temperatura) especificidad del fragmento con un pico a los 90 °C.**

#### 4.4.3. Ensayo de enriquecimiento bacteriano

Al observar que era posible detectar un gran número de bacterias de *E. coli* con el fluorocromo SG y el MLCT se consideró la posibilidad de incubar las muestras por un tiempo de 5 h (Fukushima *et al.*, 2003) debido a que *E. coli* se reproduce cada 20 min (Sezonov *et al.*, 2007) lo que sugiere que habrá unas 15 reproducciones en las 5 h lo que incrementaría en  $2^{15} = 32,768$  veces el número inicial de bacterias.

Por lo tanto, con el fin de incrementar el número de células bacterianas en las reacciones, se decidió incubar las muestras de HO + bacterias con SG siguiendo el protocolo de Fukushima *et al.* (2003) y Nam *et al.* (2005) con dos diluciones 1:10 y 1:100 de HO. De esta forma se pretendía incrementar el número de células bacterianas en el HO y sobrepasar el número mínimo de bacterias requeridas al utilizar el SG.

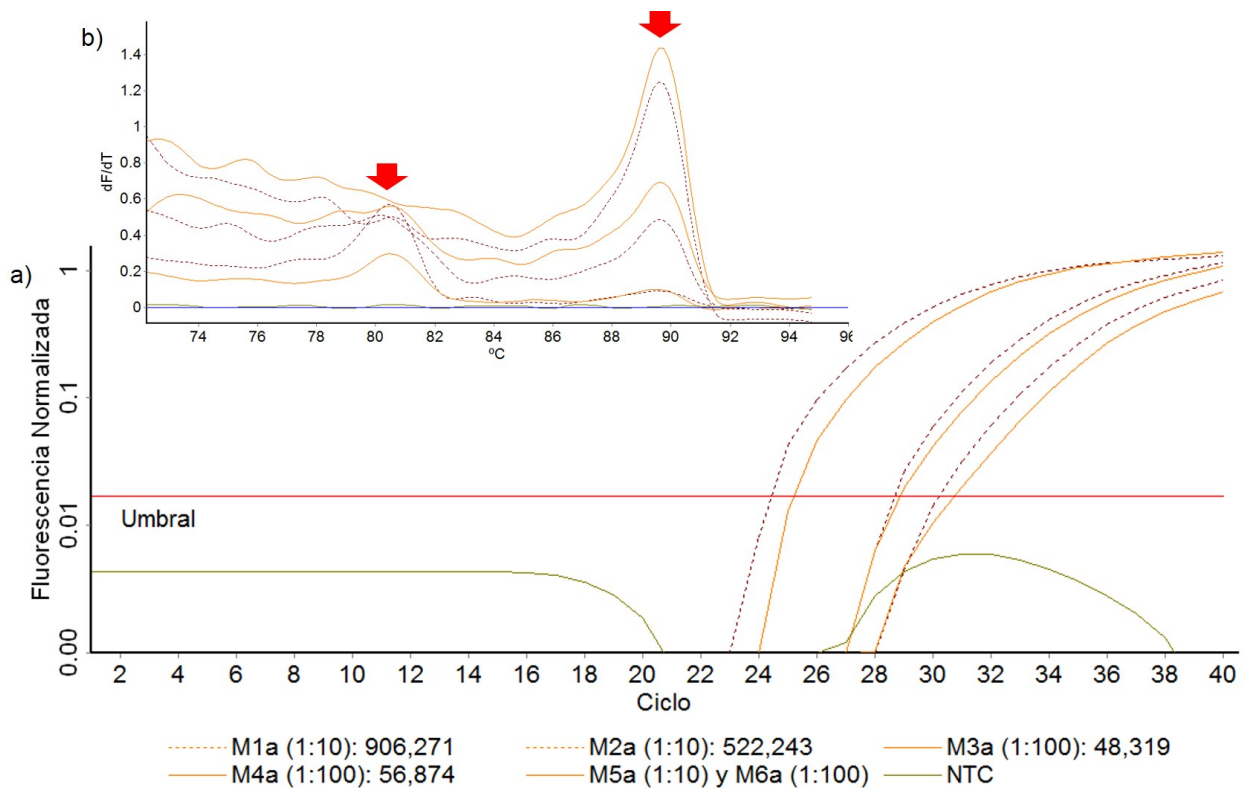
La evaluación de las diluciones mostró mayor sensibilidad en la dilución 1:10, ya que proporcionó la mayor señal de fluorescencia y por consiguiente el valor más bajo de Ct 24.30 en la curva de amplificación (Figura 12a) referente a (906,271 cel-reacción<sup>-1</sup>); este



valor se obtuvo de la cuantificación absoluta (Tabla 4). En relación al enriquecimiento de la muestra en este estudio no se logró la detección de bajas concentraciones, es decir, a concentraciones menores a  $48,319 \text{ cel-reacción}^{-1}$  se volvió a presentar dímeros de cebadores en la curva de disociación (Figura 12b).

**Tabla 4: Cuantificación absoluta del HO (1:10 y 1:100) con inoculación de cultivo bacteriano de *E. coli*, a partir de la ecuación  $CT = -3.572 \cdot \log(\text{conc}) + 26.642$ . Se utilizó SG con los cebadores LZL389 y LZR653.**

Muestra	Ct	Teórico $\text{cel-reacción}^{-1}$	Cuantificación absoluta $\text{cel-reacción}^{-1}$
M1a,1:10	24.30	700,000	906,271
M2a,1:10	28.59	43,750	48,319
M4a,1:100	25.15	700,000	522,243
M5a,1:100	28.85	43,750	56,874



**Figura 12: Curvas generadas a partir de la inoculación de células de *E. coli* en HO (1:10 y 1:100) utilizando SG con los cebadores LZL389 y LZR653. (a) Curva de amplificación (unidades de fluorescencia normalizada vs. ciclos) del producto amplificado con respecto a las diferentes concentraciones ( $\text{cél-reacción}^{-1}$ ). (b) Curva de disociación ( $dF/dT$  vs. temperatura) especificidad del fragmento con un pico a los  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ .**

En contraste a la dilución de homogenado de ostión 1:100, el cual presentó un Ct de 25.15 para ( $522,243 \text{ cel-reacción}^{-1}$ ), considerando que para ambas alicuotas se inicio con

una concentración de 700,000 cel·reacción<sup>-1</sup> lo que sugiere que hubo una disminución del número de bacterias en vez de aumentar.

En este estudio, el enriquecimiento de la muestra con dilución 1:10 de HO podría considerarse que fue la más adecuada en la detección de coliformes fecales que la dilución 1:100. Por el contrario, DePaola y Hwang (1995) concluyen que la dilución 1:100 del HO previo a un enriquecimiento de la muestra fue la más adecuada en comparación con la dilución del HO 1:10 en la detección de *V. cholerae*. Fukushima *et al.* (2003) y Nam *et al.* (2005) indican que el enriquecimiento incrementa la sensibilidad en la detección de bajas concentraciones. Wright *et al.* (2007) reportan valores de hasta 1 bacteria·g<sup>-1</sup> de ostión para la detección de *Vibrio vulnificus* por qPCR. Sin embargo, en este estudio, aunque se realizó enriquecimiento de la muestra, sólo se obtuvo un límite de detección de 48,000 cel·reacción<sup>-1</sup> con SG, por lo que se consideró inadecuado para los objetivos de detección de *E. coli* a concentraciones bajas y se descartó el SG para este fin.

#### 4.5. Curva estándar con sonda de hidrólisis

##### 4.5.1. Ensayo con DNA

Para lograr el objetivo dos se realizó la detección con sonda de hidrólisis con DNA, cultivo bacteriano con HO y MLCT.

Los resultados de la curva de amplificación (Figura 13a) utilizando el método de extracción de DNA de *E. coli* con diluciones 1:4 fueron de 0.09-94 ng de DNA·reacción<sup>-1</sup>. La detección con sonda de hidrólisis se hizo con el fin de determinar los niveles de cel·reacción<sup>-1</sup> menores, utilizando la sonda de hidrólisis y los cebadores lacZF1, lacZR1 y lacZ1sonda propuestos por Koponen *et al.* (2002). Se obtuvieron valores de Ct con un intervalo desde 17.16 hasta 26.73, correspondientes a 20,000-20,000,000 cel·reacción<sup>-1</sup>, respectivamente. La curva estándar (Figura 13c) mostró linealidad con un coeficiente de determinación R<sup>2</sup>=0.99069, una pendiente de M=-3.320 y una eficiencia de 100%. La ecuación 4 que se obtuvo de la curva estándar.

$$CT = -3.320 * \log(conc) + 23.280 \quad (4)$$

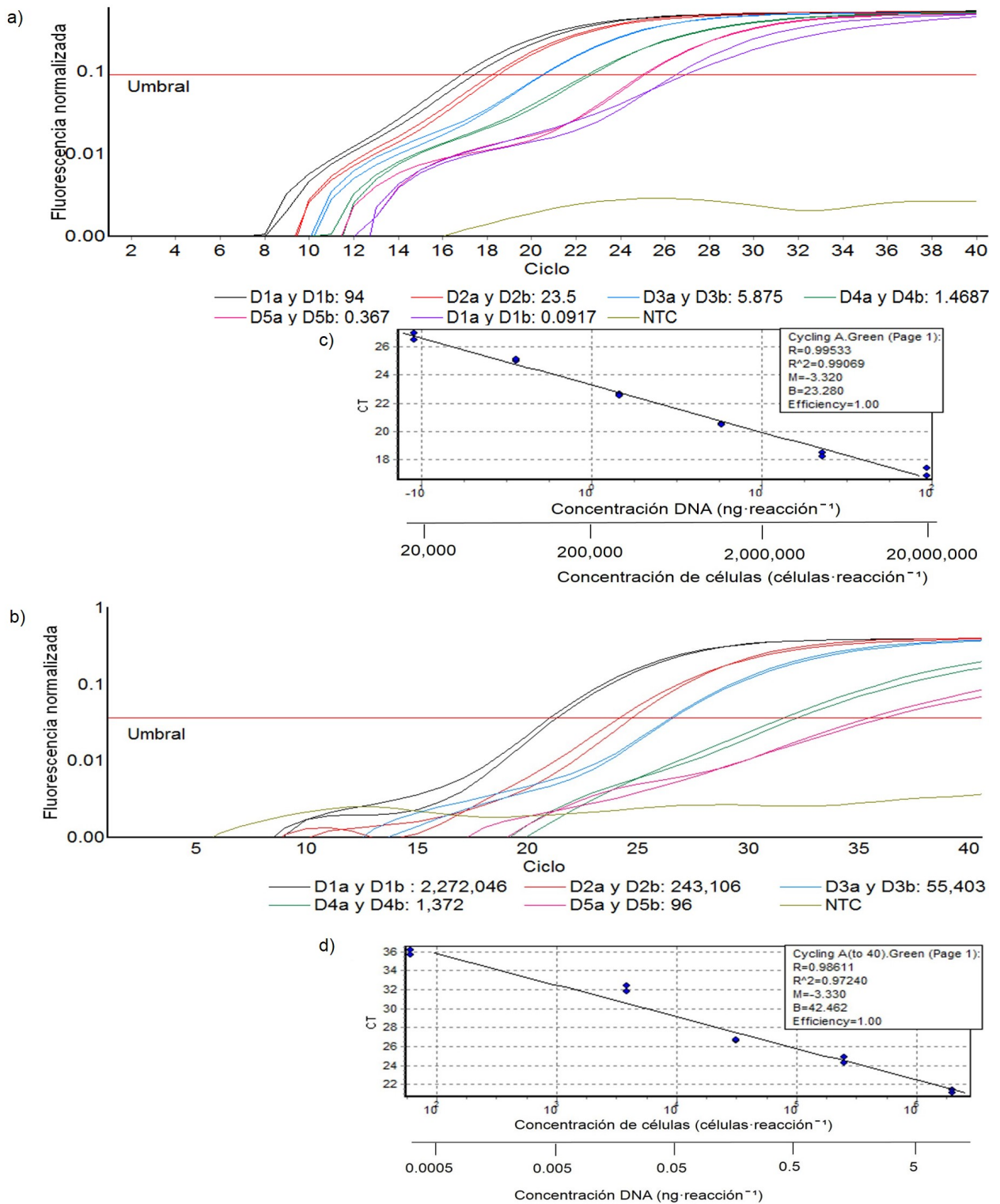


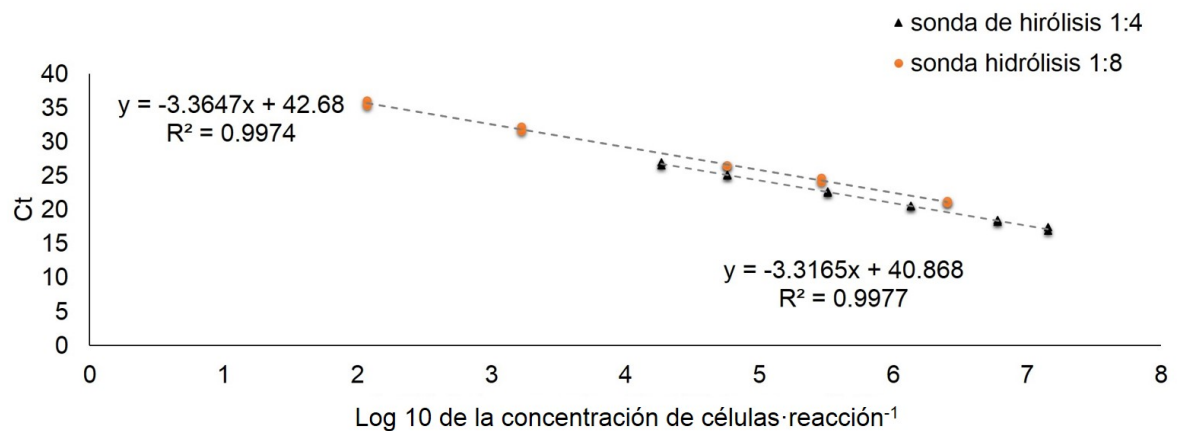
Figura 13: Curvas generadas a partir de diluciones seriadas 1:4 (a y c) y 1:8 (b y d) de DNA de *E. coli* utilizando sonda de hidrólisis con los cebadores LacZ1F, LacZ1R y LacZ1sonda. (a y b) Curva de amplificación (unidades de fluorescencia normalizada vs. ciclos) de los productos amplificados con respecto a las diferentes concentraciones ( $\text{ng}\cdot\text{reacción}^{-1}$ ) y (c y d) Curva estándar (Ct vs. concentración) junto con su equivalente en número de células.

#### 4.5.2. Ensayo con cultivo bacteriano y MLCT

Con estos resultados, se decidió utilizar concentraciones menores (dilución 1:8) con el MLCT para la obtención de la curva estándar con el fluorocromo sonda de hidrólisis por qPCR. En la curva de amplificación (Figura 13b) se observaron amplicones en un Ct de 21.15 hasta 35.73 con una concentración final de  $96 \text{ cel}\cdot\text{reacción}^{-1}$ . En la curva estándar (Figura 13d) se registró una eficiencia de 100 %, un coeficiente de determinación  $R^2=0.97240$  y una pendiente de  $M=-3.330$ . La ecuación 5 que se obtuvo de la curva estándar.

$$CT = -3.330 * \log(\text{conc}) + 42.462 \quad (5)$$

Por lo anterior, se decidió graficar los valores de Ct obtenidos con sonda de hidrólisis de ambas curvas estándar (Figura 14) para visualizar el rango alcanzado. Se observó un intervalo desde  $10^2$  hasta  $10^7 \text{ cel}\cdot\text{reacción}^{-1}$  con el uso de la sonda de hidrólisis por qPCR. La detección de niveles bajos de células (del orden de magnitud de  $10^2$ ) es consecuencia de la alta especificidad que ofrece la sonda de hidrólisis como fluorocromo para la qPCR sin la formación de dímeros de cebadores (Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996)



**Figura 14:** Gráfica generada a partir de diluciones seriadas 1:4 de DNA y 1:8 de células de *E. coli* utilizando la sonda de hidrólisis con los cebadores LacZ1F, LacZ1R y LacZ1sonda.

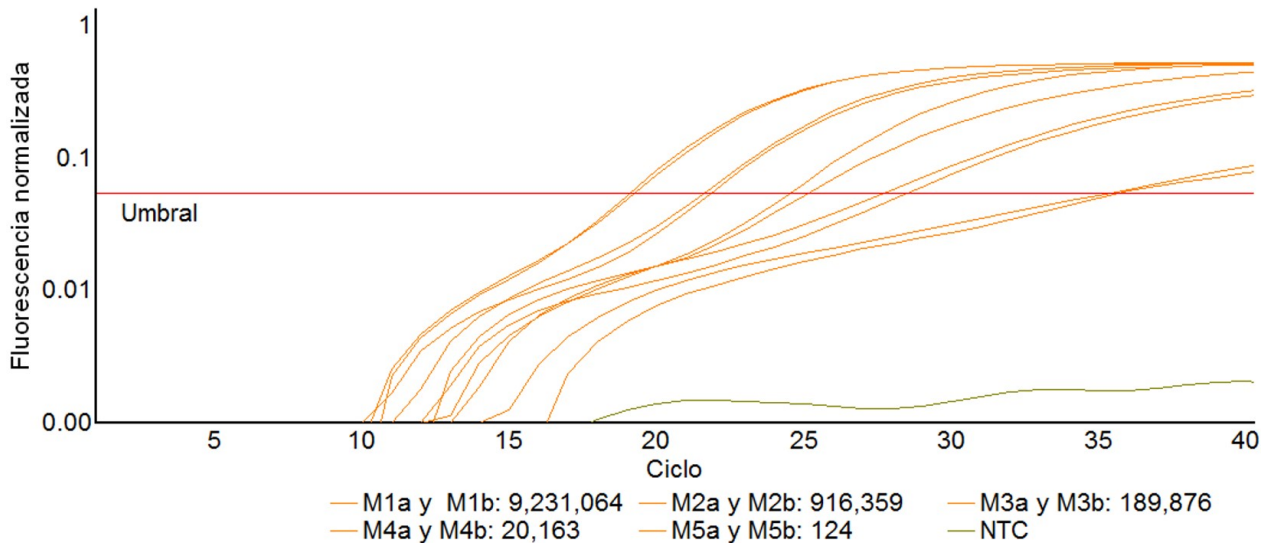
#### 4.6. Cuantificación bacteriana en HO y sonda de hidrólisis

Los resultados en la curva de amplificación (Figura 15) dieron positivos, siendo el valor de Ct de 19.13 para la mayor concentración detectada en las muestras ( $9,000,000 \text{ cel-reacción}^{-1}$ ) y 35.32 para la menor concentración de bacterias presente en la muestra ( $274 \text{ cel-reacción}^{-1}$ ). Con el fin de determinar los límites de detección, se empleo el proceso de la cuantificación absoluta por qPCR descrito por Dorak (2014). De forma que se utilizó la ecuación 4 de la curva estándar realizada con cultivo bacteriano de *E. coli* y sonda de hidrólisis para la interpolación de la cantidad detectada de material genético bacteriano en cada muestra, alcanzando  $124-9,231,064 \text{ cel-reacción}^{-1}$  (Tabla 15)

Por otro lado, el tiempo requerido en este estudio para la cuantificación absoluta empleando la sonda de hidrólisis por qPCR fue de 6 h repartido de la manera siguiente: 2 h para la preparación del homogenado de ostión con sus respectivas adiciones de concentraciones de cultivo bacteriano para su posterior detección, 30 min para el método de lisis celular térmica y para la obtención del material genético total de la muestra, 1:30 h para la preparación de la mezcla y las muestras por duplicado a evaluar por qPCR, y 2 h para el desarrollo de la qPCR. Este lapso fue menor al reportado por Takahashi *et al.* (2009) quienes hacen mención que el proceso de la qPCR con el uso de la sonda de hidrólisis tarda un total de 9 h: 7 h de enriquecimiento, 30 min para la extracción de DNA y 1.5 para el desarrollo de la qPCR.

**Tabla 5: Cuantificación absoluta del homogenado de ostión (1:10) con inoculación de células de *E. coli*, a partir de la ecuación  $CT = -3.330 \cdot \log(\text{conc}) + 42.462$ . Se utilizó sonda de hidrólisis con los cebadores LacZ1F, LacZ1R y LacZ1sonda.**

Muestra	Ct	Teórico $\text{cel-reacción}^{-1}$	Cuantificación absoluta $\text{cel-reacción}^{-1}$
M1a y M1b	19.13	9,000,000	9,231,064
M2a y M2b	21.68	1,125,000	916,359
M3a y M3b	24.76	140,625	189,876
M4a y M4b	28.02	17,578	20,163
M5a y M5b	35.32	274	124



**Figura 15:** Curva de amplificación generada a partir de la inoculación de células de *E. coli* en HO (1:10) utilizando el MLCT y sonda de hidrólisis con los cebadores LacZ1F, LacZ1R y LacZ1sonda.

#### 4.7. Comparación entre cuantificaciones

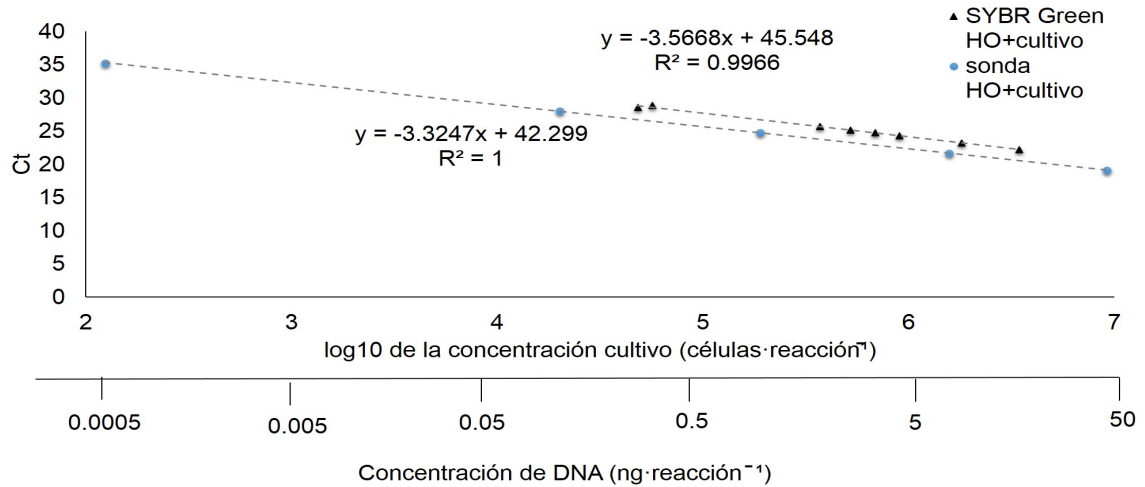
Finalmente, para lograr el objetivo tres se realizó la comparación en la detección de células de *E. coli* en HO (1:10) con SG y sonda de hidrólisis mediante el MLCT por qPCR.

En la Figura 16 se observó que el límite de detección con el SG estuvo en el orden de magnitud de hasta  $10^5$  debido a la presencia de dímeros; en cambio, con la sonda de hidrólisis se alcanzó un orden de magnitud de  $10^2$  células por reacción en el HO.

Por lo tanto, se concluye que el SG fue el menos conveniente en el límite de detección de *E. coli* al dar lugar a la formación de dímeros de cebadores. En este estudio se hizo evidente el límite a los  $0.2415 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , equivalente a  $48,319 \text{ cel} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  lo que se atribuye al inadecuado diseño de los cebadores tal como lo menciona Lim *et al.* (2011) al hacer énfasis en que el adecuado uso de cebadores y fluorocromos dan lugar a una mejor especificidad y confiabilidad de los resultados. Por lo tanto, al comparar con la sonda de hidrólisis, se observó que el aumento en la especificidad le permitió alcanzar un límite de detección en concentraciones menores de hasta  $124 \text{ cel} \cdot \text{reacción}^{-1}$  ( $0.0006 \text{ ng} \cdot \text{reacción}^{-1}$ ). Lo anterior es similar a lo reportado por Olson y Morrow (2012) con un límite de detección en la qPCR de  $5.72 \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  que corresponde a  $1,144 \text{ cel} \cdot \text{reacción}^{-1}$  de *E. coli* al emplear la sonda de hidrólisis.<sup>2</sup>

<sup>2</sup>La estimación de células se obtuvo a partir de la relación: 20 células de *E. coli* equivalen a 100 fg (Luna *et al.*, 2012)

El resultado de la prueba estadística ANCOVA mostraron que las pendientes no presentan diferencias significativas, es decir, se comportan de la misma forma los fluorocromos (SG y sonda de hidrólisis) en la detección y cuantificación de coliformes fecales en HO en la qPCR.



**Figura 16:** Gráfica generada a partir de los valores de Ct obtenidos con SG y sonda de hidrólisis con HO inoculado con células de *E. coli*.

## Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

---

### 5.1. Conclusiones

- El método de lisis celular térmica, calentamiento a 95 °C por 15 min y enfriamiento a 4 °C por 5 min, permite la detección de *E. coli* por qPCR, sin realizar la extracción ni purificación de DNA.
- Se logró desarrollar el protocolo de detección de *E. coli* en homogenado de ostión (1:10) con SYBR Green y qPCR para: a) DNA bacteriano con un intervalo de 17.30 a 0.28 ng DNA·reacción<sup>-1</sup>. b) Método de lisis celular térmica equivalentes a  $7.3 \times 10^7$  a 48,000 cel·reacción<sup>-1</sup>.
- La presencia de dímeros, de los cebadores no permitió detectar valores menores a 48,000 cel·reacción<sup>-1</sup> de concentraciones de coliformes fecales en homogenado de ostión, por lo que un mejor diseño de otros cebadores con SG, podría ayudar a detectar concentraciones menores de DNA y células con el método de lisis celular térmica.
- Es indispensable el uso de la curva de disociación para detectar amplificaciones inespecíficas cuando se use SG u otro fluorocromo para DNA de doble cadena.
- Se logró desarrollar el protocolo de detección de *Escherichia coli* con con el método de lisis celular térmica y la sonda de hidrólisis por qPCR dentro del intervalo 46 a 0.0006 ng de DNA bacteriano·reacción<sup>-1</sup>, correspondientes a 9,231,064 y 124 cel·reacción<sup>-1</sup>, respectivamente.
- El tiempo de detección por estos procedimientos es menor a ocho horas lo que puede ser útil en el seguimiento de los procesos de verificación de la depuración de moluscos bivalvos.



## 5.2. Recomendaciones

- Diseñar cebadores degenerados para el segmento 238-308 o cebadores y una sonda de hidrólisis en regiones conservadas del gen *LacZ*.
- Realizar el método convencional, NMP paralelamente con la qPCR para evaluar los límites de detección alcanzados que permitan generar mayor confiabilidad del método molecular utilizado en este estudio y a su vez contribuya con el proceso de depuración.
- El empleo de controles negativos (NTC) en los ensayos evidenció que no existió presencia de contaminación, como ha ocurrido en otros estudios, a pesar de ello es muy importante hacer uso de las medidas de bioseguridad para el manejo de muestras y reactivos.
- Se propone un trabajo en conjunto con el sector comercial para facilitar la obtención de moluscos bivalvos y someterlos a un procesos de depuración en una planta piloto que propicien futuras investigaciones enfocadas a acortar el tiempo de espera para la salida al mercado del producto alimenticio con la implementación del protocolo propuesto en este estudio.

## Lista de referencias bibliográficas

- Bischoff, C., Lüthy, J., Altwegg, M., y Baggi, F. (2005). Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, **61**(3): 335–341.
- Blackstone, G. M., Nordstrom, J. L., Vickery, M. C. L., Bowen, M. D., Meyer, R. F., y DePaola, A. (2003). Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, **53**(2): 149–155.
- Blackstone, G. M., Nordstrom, J. L., Bowen, M. D., Meyer, R. F., Imbro, P., y DePaola, A. (2007). Use of a real time PCR assay for detection of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of Mobile Bay. *Journal of Microbiological Methods*, **68**(2): 254–259.
- Borbón-Orozco, M. A., Segovia-Zavala, J. A., Delgadillo-Hinojosa, F., y Barbosa-Muñoz, A. (1994). Estudio bacteriológico de agua de mar para el cultivo de moluscos bivalvos en Baja California. *Ciencias Marinas*, **20**(2): 183–198.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, **25**(2): 169–193.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., y Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, **55**(4): 611–622.
- Cáceres-Martínez, J. y Vásquez-Yeomans, R. (2014). *Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo de moluscos bivalvos*. OIRSA-OSPESCA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria-Organización del Sector Pesquero y Acuícola del Istmo Centroamericano. pp. 1–143.
- COFEPRIS (2009). Programa mexicano de sanidad de moluscos bivalvos. *Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios*, (Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/az/documents/guiapmsmb2009.pdf>).
- COFEPRIS (2011). Método de prueba para la estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable (NMP), detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* CCAYAC-M-004/8. *Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios*, (Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/CCAYAC-M-004.PDF>).
- Cornejo-Romero, A., Serrato-Díaz, A., Rendón-Aguilar, B., y Rocha-Munive, G. M. (2014). *Prácticas, Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales e Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. pp. 1–143.
- De Abreu-Corrêa, A., Albarnaz-Dutra, J., Moresco, V., Poli, C. R., Teixeira, A. L., Oliveira Simões, C. M., y Monte Barardi, C. R. (2007). Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Marine Environmental Research*, **63**(5): 479–489.

- DePaola, A. y Hwang, G.-C. (1995). Effect of dilution, incubation time, and temperature of enrichment on cultural and PCR detection *Vibrio cholerae* obtained from the oyster *Crassostrea virginica*. *Molecular and Cellular Probes*, **9**: 75–81.
- Dombek, P. E., Johnson, L., Zimmerley, S. T., y Sadowsky, M. (2002). Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(6): 2572–2577.
- Dorak, M. T. (2014). *Real-time PCR*. Taylor Francis. pp. 1–333.
- Foulds, I. V., Granacki, A., Xiao, C., Krull, U. J., Castle, A., y Horgen, P. A. (2002). Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 5-nuclease PCR. *Journal of Applied Microbiology*, **93**(5): 825–834.
- Fukushima, H., Tsunomori, Y., y Seki, R. (2003). Duplex real-time SYBR Green PCR assays for detection of 17 species of food or waterborne pathogens in stools. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(11): 5134–5146.
- Gliglio, S., Mois, Paul, T., y Saint, C. P. (2003). Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research*, **31**(22): 1–5.
- González, I., García, T., Fernández, A., Sanz, B., Hernández, P., y Martín, R. (1999). Rapid enumeration of *Escherichia coli* in oysters by a quantitative PCR-ELISA. *Journal of Applied Microbiology*, **86**: 231–236.
- González, R. A. y Noble, R. T. (2014). Comparisons of statistical models to predict fecal indicator bacteria concentrations enumerated by qPCR- and culture-based methods. *Water Research*, **48**(1): 296–305.
- Gosling, E. (2003). *Bivalve Molluscs, Biology, Ecology and Culture*. Fishing News Books. pp. 1–443.
- Heid, C., Stevens, J., Livak, K. J., y Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**(10): 986–994.
- Heijnen, L. y Medema, G. (2006). Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. *Journal of Water and Health*, **4**(4): 487–498.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., Larson, A., Anson, H., y J., E. D. (2006). *Principios integrales de Zoología*. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. pp. 1–143.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., y Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Publishing Companies*, **11**(9): 1026–1030.
- Hood, M. a., Ness, G. E., y Blake, N. J. (1983). Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**(1): 122–126.

- Kalnins, A., Otto, K., Rüther, U., y Müller-Hill, B. (1983). Sequence of the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, **2**(4): 593–597.
- Koponen, J. K., Turunen, A.-M., y Ylä-Herttua, S. (2002). *Escherichia coli* DNA contamination in AmpliTaq Gold polymerase interferes with taqman analysis of *lacZ*. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **5**(3): 220–222.
- Larkin, E. P. y Hunt, D. A. (2014). Bivalve mollusks: Control of microbiological contaminants. *BioScience*, **32**(3): 193–197.
- Leal Diego, A. G., Dores Ramos, A. P., Marques Souza, D. S., Durigan, M., Greinert-Goulart, J. A., Moresco, V., Amstutz, R. C., Micoli, A. H., Romeu Cantusio, N., Monte Barardi, C. R., y Franco Bueno, R. M. (2013). Sanitary quality of edible bivalve mollusks in southeastern Brazil using an UV based depuration system. *Ocean and Coastal Management*, **72**: 93–100.
- Lee, C. L., Ow, D. S. W., y Oh, S. K. W. (2006). Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **65**(2): 258–267.
- Lim, J., Shin, S. G., Lee, S., y Hwang, S. (2011). Design and use of group-specific primers and probes for real-time quantitative PCR. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*, **5**(1): 28–3.
- Liu, Y. J., Zhang, C. M., y Wang, X. C. (2009). Simultaneous detection of enteric bacteria by qPCR in surface waters located in an urban area. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, **15**(5): 1033–1048.
- Luna, G. M., Dell'Anno, A., Pietrangeli, B., y Danovaro, R. (2012). A new molecular approach based on qPCR for the quantification of fecal bacteria in contaminated marine sediments. *Journal of Biotechnology*, **157**(4): 446–453.
- Mackay, I. M. (2007). *Real-time PCR in Microbiology: from Diagnosis to characterization*. Caister Academic Press. p. 454.
- Márquez, B. y Jiménez, M. (2002). Moluscos asociados a las raíces sumergidas del mangle rojo *Rhizophora mangle*, en el golfo de Santa Fe, estado Sucre, Venezuela. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, **50**(3): 1101–1112.
- Molina IV, D. y Lowe, K. L. (2012). Use of quantitative PCR of functional genes to monitor coliforms and enteric bacteria in a constructed, urban wetland. *Biological Society*, **83**(4): 136–144.
- Muhamad, P., Chaijaroenkul, W., Congpuong, K., y Na-Bangchang, K. (2011). SYBR Green I and TaqMan quantitative real-time polymerase chain reaction methods for the determination of amplification of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-1 gene PFMDR1. *The Journal of parasitology*, **97**(5): 939–942.
- Nam, H.-M., Srinivasan, V., Gillespie, B. E., Murinda, S. E., y Oliver, S. P. (2005). Application of Sybr Green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *International Journal of Food Microbiology*, **102**(2): 161–171.

- Nazaret, M., Elena, R., Bastardo, V. D., y Bettina, L. (2005). *Escherichia coli* enteropatógena en moluscos crudos y cocidos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, **15**(2): 163–167.
- Nolan, T., Hands, R., Ogunkolade, W., y Bustin, S. (2006). SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Analytical Biochemistry*, **351**: 308–310.
- Olson, N. D. y Morrow, J. B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*, **5**(1): 1–668.
- Ossa, P. A., Giraldo-M., J. M., López-G., G. A., Dias, L. G., y Rivera-P., F. A. (2012). Colecciones biológicas: una alternativa para los estudios de diversidad genética. *Boletín Científico Centro de Museos: Museo de Historia Natural*, **16**(1): 143–155.
- Pepin, J. F., Riou, A., y Renault, T. (2008). Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, **149**(2): 269–276.
- Pfaffl, M. W. (2004). A-Z of quantitative PCR: Quantification strategies in real-time PCR. *International University Line*, pp. 87–112.
- Poma, H. R., Davies, C., Gutiérrez-Cacciabue, D., Mora, M. C., Brasombrío, M. A., y Rajal, V. B. (2012). Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos kits comerciales y empleando la qPCR: Efecto de las sustancias inhibitoras. *Revista Argentina de Microbiología*, **44**: 144–149.
- Radstrom, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Dahlenborg, M., y Lofstrom, C. (2003). *PCR Detection of microbial pathogens: Pre-PCR Processing of samples*. A product of Humana Press. pp. 1–336.
- Rees, G., Pond, K., Kay, D., Bartram, J., y Santo Domingo, J. (2010). *Safe Management of Shellfish and Harvest Waters*. World Health Organization e IWA publishing. pp. 1–360.
- Riisgard, H. U. (1988). Efficiency of particle retention and filtration rate in 6 species of northeast american bivalves. *Marine Ecology Progress Series*, **45**: 217–223.
- Rippey, S. R. (1994). Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews*, **7**(4): 419–425.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de Roubin, M.-R., y Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, **49**(1): 31–54.
- Rosas, I., Yela, A., y Baez, A. (1985). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en ostión (*Crassostrea virginica*) durante su desarrollo y procesamiento en el mercado. *Contaminación Ambiental*, **1**: 51–64.
- Ryu, H., Elk, M., Khan, I. U. H., Harwood, V. J., Molina, M., Edge, T. A., y Domingo, J. S. (2014). Comparison of two poultry litter qPCR assays targeting the 16s rRNA gene of *Brevibacterium* sp. *Water Research*, **48**(1): 613–621.

- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., y D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, **189**(23): 8746–8749.
- Sriket, C. (2014). Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention. *International Food Research Journal*, **1**(21): 433–445.
- Takahashi, H., Kimura, B., Tanaka, Y., Shinozaki, J., Suda, T., y Fujii, T. (2009). Real-time PCR and enrichment culture for sensitive detection and enumeration of *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, **79**(1): 124–127.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, **22**(5): 299–305.
- Vinueza, C. (2009). PCR en tiempo real: la nueva era de la información genética celular (real time PCR : the new age of cellular genetic information). *Revista Electrónica de Veterinaria*, **10**(2): 1–13.
- Wright, A. C., Garrido, V., Debuex, G., Farrell-Evans, M., Mudbidri, A. A., y Otwell, W. S. (2007). Evaluation of postharvest-processed oysters by using PCR-based most-probable-number enumeration of *Vibrio vulnificus* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(22): 7477–7481.
- Zhang, J.-H., Wang, F., y Wang, T.-Y. (2011). A simple and effective superbuffers for DNA agarose electrophoresis. *Gene*, (487): 72–74.

## Apéndice A. Protocolo de extracción de DNA con el DNeasy Blood and Tissue de QIAGEN

---

1. Colocar 1 ml de cultivo de *E. coli* en un tubo de 1.5 ml de capacidad. Centrifugar durante 10 minutos a 4,402 x *g*. Una vez concluido el tiempo descartar el sobrenadante.

2. Resuspender el material del fondo del tubo (también conocido como botón), al añadir 180  $\mu$ l de amortiguador ATL, 20  $\mu$ l de Proteinasa K y mezclar mediante mezclador de vórtice. Incubar a 56 °C dando vórtex ocasionalmente hasta que termine la lisis de la célula que tarda aproximadamente 2 horas.

3. Anadir 200  $\mu$ l de amortiguador AL, volver a mezclar con el mezclador de vórtice y nuevamente dejar a la misma temperatura de incubación por 10 minutos.

4. Agregar 200  $\mu$ l de etanol al 96 %. Mezclar con el mezclador de vórtice durante 15 segundos.

5. Pipetear la mezcla dentro del filtro "DNeasy Mini spin column" situada en un tubo de colecta de 2 ml de capacidad, proporcionado por el fabricante. Centrifugar a 5,008 x *g* por 1 minuto. Desechar el tubo de colecta.

6. Colocar el filtro en un nuevo tubo de colecta y agregar 500  $\mu$ l de amortiguador AW1. Dejar reposar por 2 minutos. Centrifugar a 5,008 x *g* por 1 minuto. Descartar el tubo colector.

7. Nuevamente transferir el filtro en un nuevo tubo colector y agregar 500  $\mu$ l de amortiguador AW2. Dejar reposar por 2 minutos. Centrifugar a 13,225 x *g* por 3 minutos. Descartar el tubo colector.

8. En un tubo de 1.5 ml de capacidad colocar el filtro. Eluir el DNA con 100  $\mu$ l de amortiguador AE (añadir directo a la membrana del filtro). Dejar reposar durante 5 minutos. Centrifugar a 5,008 x *g* por 1 minuto. Repetir la elución.

## Apéndice B. Amortiguador de fosfato

---

Ingredientes: 34 g de  $KH_2PO_4$  y 500 ml de agua destilada [0.5 M].

1. Sobre una plancha de agitación se colocó un frasco dentro de este, se introdujo un imán para que se lleve a cabo la disolución del fosfato en agua destilada del fosfato, ajustando el pH a 7.2 con solución de hidróxido de sodio 1.0 N, lo anterior, se aforó a un litro de agua destilada. Se esterilizó durante 15 minutos a 121°C.

2. De la solución obtenida en el paso 1, se tomaron 1.25 ml y se aforó a un litro de agua destilada [0.25 M].



## Apéndice C. Protocolo para electroforesis

---

Mediante la técnica de electroforesis se visualizaron los productos de PCR (2  $\mu$ L) en un gel de agarosa al 1.5 % teñido en Bromuro de Etidio. Acorde al tamaño de los amplicones esperados (264 pb), se empleó un marcador de peso molecular Direct Load Step Ladder (Sigma) de 50-3000 pb. El corrido electroforético, se realizó a 90 V durante 30 min, utilizando SUPER Buffer al 1 % (Zhang *et al.*, 2011). Se visualizaron los fragmentos utilizando un transiluminador GelDocXR System (BioRad) de luz UV.

## Apéndice D. Costos de producción

---

El análisis preliminar de costos de producción para muestras de HO por el qPCR (Figura D.1a) se elaboró considerando los siguientes supuestos:

a) Las muestras se realizaron en un laboratorio de Microbiología, por consiguiente solo se considera los costos para la implementación del análisis.

b) Se empleará el fluorocromo sonda de hidrólisis por su especificidad reportada en este estudio.

c) Se proyecta analizar 1,500 muestras al mes.

Los resultados mostraron que el costo de producción para muestras de HO por la qPCR es de \$ 1,005,423.79 MXN y el costo unitario por muestra de \$ 777.53 MXN. El tiempo de entrega de los análisis es de 1 día.

Por otro lado, considerando que la Norma Oficial Mexicana (NOM-242-SSA1-2009 <sup>1</sup>) indica que el proceso de depuración, su duración no debe ser inferior a las 48 h. La empresa Consorcio Experimental Mandinga, S.A. de C.V. encargada de una planta de depuración de ostiones en Veracruz establece un costo de depuración por lote (costal con 300 piezas de ostiones) de \$ 192.22 MXN (Figura D.1b).

Finalmente, se consideró un costo por muestra de agua \$ 371.2 MXN para el análisis de coliformes totales y fecales por el NMP, los valores se obtuvieron del Laboratorio de Calidad del Agua de la Comisión Estatal del Agua de Jalisco (CEA). El tiempo de entrega de los análisis es de 5 días. El costo puede variar ya que el laboratorio certificado (Consultores y Servicio en Calidad de Alimentos S.A. de C.V.) por parte de la COFEPRIS para análisis de moluscos bivalvos aún no publica sus costos (Figura D.1c).

En conclusión se observa que el costo del análisis por qPCR es \$ 406.3 MXN más caro que la evaluación de las muestras por el NMP. Sin embargo, el costo beneficio en el

---

<sup>1</sup>NOM-242-SSA1-2009 Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Disponible en: <http://dof.gob.mx>

tiempo es de 4 días, lo que permite la salida del lote de ostiones para su comercialización en menor tiempo.

a) Costo de análisis de muestras de HO por el qPCR.



Material laboratorio			
Descripción	Canti	Precio unitario	Precio total
Agua para PCR.	1litro	\$ 129.00	\$ 149.64
Bolsa con tubos de 1.5 ml (c/1000).	1	\$ 172.86	\$ 200.52
Bolsa con tubos PCR 200 µl Corning (c/100)	1	\$ 1,220.00	\$ 1,415.20
Bolsa con puntas de 10 µl (c/1000).	1	\$ 250.00	\$ 290.00
Bolsa con puntas de 200 µl (c/1000).	1	\$ 380.00	\$ 440.80
Bolsa con puntas de 1000 µl (c/1000).	1	\$ 350.00	\$ 406.00
Caja de guantes de nitrilo (c/200).	1	\$ 280.00	\$ 324.80
Rollo de toallas para secar.	1	\$ 25.00	\$ 29.00
Cloro para desinfectar.	1	\$ 30.00	\$ 34.80
Agua destilada (9.46 l).	1	\$ 35.00	\$ 40.60
<b>TOTAL (COSTO VARIABLE)</b>			<b>\$ 3,331.36</b>
Equipo			
Rotor-Gene Q Qiagen.	1	\$ 500,000.00	\$ 580,000.00
Nano Drop 2000/2000c Thermo Scientific.	1	\$ 187,387.90	\$ 217,369.96
Benchmark BSC 1006-R centrifuga.	1	\$ 3,946.75	\$ 4,578.23
Centrifuga 5415R Eppendorf.	1	\$ 115,749.34	\$ 134,269.23
Congelador -20 °C Whirlpool.	1	\$ 8,000.00	\$ 9,280.00
Refrigerador Whirlpool.	1	\$ 4,000.00	\$ 4,640.00
VWR Block Heater Analog.	1	\$ 357.94	\$ 415.21
Incubadora.	1	\$ 27,014.11	\$ 31,336.37
<b>TOTAL (COSTO FIJO)</b>			<b>\$ 981,889.01</b>
Equipo			
Electricidad.		\$ 2,500.00	\$ 2,900.00
Desechos a recolectar.		\$ 1,000.00	\$ 1,160.00
Personal capacitado.		\$ 10,000.00	\$ 11,600.00
<b>TOTAL (COSTO FIJO)</b>			<b>\$ 15,660.00</b>
Reactivos para qPCR utilizando SYBR Green			
Rotor-Gene Q Quiagen PCR Kit (80/reacc	1	\$ 2,174.00	\$ 2,521.84
Cebador síntesis: LZR 653.	1	\$ 198.00	\$ 229.68
Cebador síntesis: LZL 389.	1	\$ 198.00	\$ 229.68
<b>TOTAL (COSTO VARIABLE)</b>			<b>\$ 2,981.20</b>
Reactivos para qPCR utilizando sonda de hidrólisis.			
DNTP Kapa Biosystem (500 µl).		\$ 1,650.00	\$ 1,914.00
Taq DNA polimerasa Kit (2500 U).	1	\$ 347.00	\$ 402.52
Cebador síntesis: LacZ1F.	1	\$ 165.00	\$ 191.40
Cebador síntesis: LacZ1R.	1	\$ 156.75	\$ 181.83
Cebador síntesis: LacZ1sonda.	1	\$ 1,598.00	\$ 1,853.68
<b>TOTAL (COSTO VARIABLE)</b>			<b>\$ 4,543.43</b>
<b>Costo de producción.</b>			<b>\$ 1,005,423.79</b>
<b>Costo unitario, proyectar a analizar 1,500 muestras al mes (triplicado).</b>			<b>\$ 670.28 \$ 777.53</b>

b) Costo de 300 piezas de ostiones (costal) para depuración.

Consorcio Experimental Mandinga, S.A. de C.V.

Calle Nueva s/n, esquina Calle Principal, en Mandinga Veracruz, CP 95291  
Planta: (297) 973 7133.

Recuperado de <http://www.soyentrepreneur.com/ostiones-depurados.html>

Material laboratorio			
Descripción.	Cantidad	Precio unitario	Precio total
Enfriador de agua convencional	1	\$ 18,000.00	\$ 20,880.00
Lámpara de rayos ultravioleta.	8	\$ 50,000.00	\$ 58,000.00
Generador de ozono.	8	\$ 32,000.00	\$ 37,120.00
Estanques de decantación.		\$ 1,000,000.00	\$ 1,160,000.00
Construcción de las tinas.			
Áreas de lavado.		\$ 1,899,917.44	\$ 2,203,904.23
Almacenamiento.			
Oficinas.			
<b>TOTAL</b>			<b>\$ 3,479,904.23</b>
<b>Costo de producción.</b>		<b>\$</b>	<b>3,479,904.23</b>
Costo por costal (300 piezas), proyectar a purificar 21,000 ostiones al día.			
Precio de venta de cada ostión.		<b>\$ 165.71</b>	<b>\$ 192.22</b>
<b>Temporada alta (70 costales)</b>			
<b>Precio de venta de cada ostión.</b>		<b>\$ 0.55</b>	<b>\$ 0.64</b>
Costo por costal (300 piezas), proyectar a analizar 7,000 ostiones al día.			
Precio de venta de cada ostión.		<b>\$ 497.13</b>	<b>\$ 576.67</b>
<b>Temporada baja (23 costales)</b>			
<b>Precio de venta de cada ostión.</b>		<b>\$ 1.66</b>	<b>\$ 1.92</b>

c) Costo de análisis de muestra de agua por el NMP.

Laboratorio de Calidad del Agua de la Comisión Estatal del Agua de Jalisco (CEA).



Análisis de muestras de agua.

Descripción.	Cantidad	Precio unit.	Precio total
Coliformes fecales.	1	\$ 160.00	\$ 185.60
Coliformes totales.	1	\$ 160.00	\$ 185.60
Km recorrido (\$5.37) para recolectar muestra de agua.	100 km	\$ 537.00	\$ 622.92

**Figura D.1: Análisis preliminar del costo de producción para muestras de HO por la qPCR, ostiones para depuración y análisis de agua por el NMP.**