

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Desarrollo de protocolo para la detección de genes
de resistencia a antibióticos betalactámicos en
muestras de saliva por medio de PCR

Trabajo de graduación por
José Antonio Lemus Saavedra
para optar al grado académico de Licenciado en
Bioquímica y Microbiología

Guatemala,
2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

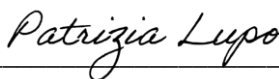


Desarrollo de protocolo para la detección de genes
de resistencia a antibióticos betalactámicos en
muestras de saliva por medio de PCR

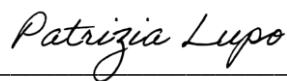
Trabajo de graduación por
José Antonio Lemus Saavedra
para optar al grado académico de Licenciado en
Bioquímica y Microbiología

Guatemala,
2024

Vo.Bo.:
(f)  _____ MSc. Luisa
Fernanda Mejía Rivera

(f)  _____ PhD. Patrizia
Lupo

Tribunal Examinador:
(f)  _____ MSc. Luisa
Fernanda Mejía Rivera

(f)  _____ PhD. Patrizia
Lupo

(f)  _____ MSc. Anna
Yunuen Soto Fernández

Fecha de aprobación: Guatemala, 5 de diciembre de 2024.

ÍNDICE

Lista de cuadros	iii
Lista de figuras	iii
Resumen de la investigación	iv
I. Introducción	1
II. Definición del problema	2
III. Justificación	4
IV. Objetivos	6
V. Marco teórico	7
VI. Marco metodológico	16
VII. Resultados	18
VIII. Discusión	29
IX. Conclusiones	32
X. Recomendaciones	33
XI. Referencias bibliográficas	34
XII. Anexo: PNO	42
XIII. Anexo: Documentos complementarios a los PNO	67

Lista de cuadros

Cuadro 1: Tabla 2X2	11
Cuadro 2: Fórmulas para evaluar sensibilidad, especificidad, el valor predictivo (VPP) y el valor predictivo negativo.	11
Cuadro 3: Procedimientos normalizados de operación para la detección molecular de genes de resistencia a antibióticos en muestras de saliva.	19
Cuadro 4: Resultados esperados de la electroforesis en gel de agarosa 1.2% para la detección de genes de resistencia a antibióticos en muestras de saliva mediante PCR convencional.	20
Cuadro 5: Costo de equipos para el PCR convencional	23
Cuadro 6: Costo por tubo de PCR para la amplificación en termociclador (1 reacción de PCR)	24
Cuadro 7: Costo de las puntas 10 μ L y 100 μ L para cada tubo de PCR	24
Cuadro 8: Costo por pocillo del gel de electroforesis	25
Cuadro 9: Costo de una corrida en el gel de electroforesis	25
Cuadro 10. Análisis de costos promedio por número de muestras procesadas.	27

Lista de figuras

Figura 1: Productos de PCR en gel de agarosa 1.2% para la detección del gen <i>bla</i> CTX-M.	20
Figura 2: Productos de PCR en gel de agarosa 1.2% para la detección del gen <i>bla</i> OXA	21
Figura 3: Productos de PCR en gel de agarosa 1.2% para la detección del gen <i>bla</i> TEM	21
Figura 4: Análisis comparativo de costos de distintos métodos de extracción de ADN	22
Figura 5: Variación de costo por muestra saliva en el PCR convencional en función del número de muestra procesadas por corrida	28

Resumen de la investigación

Este trabajo de graduación aborda el protocolo para la validación de una prueba molecular para la detección temprana en muestras de saliva de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos. Se desarrollaron los Procedimientos Normados de Operación (PNO) que cubren bajo un consentimiento informado la recolección de muestras de saliva humana, la extracción de ADN con un análisis de costos de varios métodos, llegando al diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes *bla*TEM, *bla*OXA y *bla*CTX-M. Se determinó que el costo unitario de las muestras de PCR convencional tiende a Q200.00 al aumentar el número de muestras a trabajar. Se recomienda la revisión periódica del protocolo e incluir otros genes de resistencia, así como implementar técnicas avanzadas de PCR para mejorar la eficiencia del proceso.

I. Introducción

El presente documento es un Trabajo de Graduación, en modalidad de trabajo profesional, de carácter descriptivo, con el cual se busca desarrollar un protocolo para la validación de una prueba molecular para la detección de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos en muestras de saliva. Para ello se elaboraron 4 Procedimientos Normados de Operación (PNO) de los cuales el primero trata el tema de recolección de muestras de saliva para diagnóstico molecular; el segundo PNO se refiere a la extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, por columna y por el método de precipitación salina; como tercer PNO se abordó el diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes *bla*TEM, *bla*OXA y *bla*CTX-M y por último se realizó un PNO sobre el consentimiento informado y requisitos para el manejo de muestras humanas. Lo anterior permitió establecer las bases técnicas para la elaboración de las pruebas, así como las bases éticas a cumplir para su realización en este tipo de estudio de una manera responsable y exitosa. Para ello se hizo una revisión bibliográfica de los manuales de QIAmp DNA Mini Kit, Norgen Saliva DNA Isolation Kit, Quick-DNA Miniprep Kit, manual de biología molecular y el artículo “Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR”. Así mismo se exploró en artículos científicos en los cuales se describe el uso de los cebadores que se proponen utilizar en este trabajo. Adicionalmente, se utilizó la ficha elaborada por la Universidad de Búfalo para el consentimiento informado. El principal aporte de este estudio es el desarrollo de un protocolo que abarca tanto aspectos técnicos como éticos. Este protocolo permite la detección temprana de bacterias resistentes a betalactámicos y de esta forma aborda la prevención de las complicaciones en aquellos pacientes que necesiten tratamiento antibiótico. Además, se realizó un análisis de costos de los métodos de precipitación salina, por un agente quelante y por columna, el cual permite determinar la metodología experimental más apropiada según las necesidades y recursos disponibles del laboratorio.

II. Definición del problema

Actualmente, la resistencia a antibióticos y en especial de los antibióticos betalactámicos se han vuelto un problema de salud pública a nivel mundial (Fariña, 2016). Debido a este inconveniente, surge la necesidad de detectar la resistencia a antibióticos utilizando métodos moleculares, ya que estos permiten realizar una detección temprana y certera de microorganismos. Lo que a su vez significa dar un diagnóstico oportuno para poder brindar la opción de un antibiótico que tenga mayor efectividad.

En un informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2022 se pone de manifiesto que hay “elevados niveles de resistencia en bacterias causantes de septicemias potencialmente mortales, así como una creciente resistencia a los tratamientos en varias bacterias que provocan infecciones comunes entre la población, según se desprende de los datos comunicados por 87 países en 2020” revelando “elevados niveles de resistencia (por encima del 50%) en bacterias que son causa frecuente de septicemia en hospitales”.(OMS, 2022)

El presente estudio propone implementar la saliva como herramienta para la detección de genes asociados a la resistencia a antibióticos betalactámicos. La elección de dicha herramienta se basa en la accesibilidad y naturaleza no invasiva de la recolección de saliva (Zhang et al., 2013). No obstante, es crucial reconocer que el empleo de muestras de saliva puede conllevar a ciertas limitantes que puedan incidir en la efectividad del proceso de detección. Estas restricciones deben ser abordadas, para así poder asegurar la validez y reproducibilidad de los resultados obtenidos en la investigación.

En el marco de las deficiencias y necesidades relacionadas con el problema, una de las deficiencias que presenta el estudio es el uso de saliva; ya que esta es una mezcla de proteínas, enzimas y restos celulares (Bhattacharya et al., 2020) que pueden interferir en la extracción de ADN y por lo tanto afectar el diagnóstico por PCR. Además, puede ser que la concentración extraída del material genético de interés sea indetectable. Es por esta razón que se visualizó la necesidad de desarrollar diversos protocolos que permitan la optimización y validación de los resultados de la detección. Aunado al aspecto de la eficiencia de recuperación de ADN, se debe tomar en consideración que las pruebas de PCR siguen siendo un método costoso (Schuurman et al., 2004), lo cual restringe su uso y de eso resulta la propuesta de optimizar distintos métodos que permitan al investigador obtener resultados confiables optimizando los costos del proceso.

Con relación a los antecedentes de este estudio, se tiene el artículo de José M. Casellas “Resistencia a los antibióticos bacterianos en América Latina”, en el cual se hace énfasis en la resistencia a los antibióticos debido al crecimiento del número de bacterias con esa característica de resistencia. En el artículo, se menciona el desafío que existe hoy en día, ya que las cepas que hay en la región son resistentes a múltiples fármacos y por lo tanto se dificulta la eficacia de los tratamientos convencionales. Por último, el autor aborda la necesidad de plantear nuevas estrategias y que también se requiere una vigilancia epidemiológica, al igual que un uso racional de los antibióticos, complementado con el desarrollo de nuevas terapias (Casellas, 2011).

En Guatemala, el MSPAS dio a conocer la aparición de las primeras enzimas carbapenemasas en el 2010, las cuáles han ido aumentando, en una magnitud que se desconoce (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2023). Esta situación ha llevado a un monitoreo más detallado de la resistencia en el país.

El año 2022, el Laboratorio Nacional de Salud solicitó las bases de datos de aislamientos de microorganismos a 35 entidades de salud. De estas, solamente se pudieron utilizar 22 bases de datos que fueron revisadas y validadas para su posterior análisis. Como resultado de lo anterior, se obtuvo información de 55,743 aislamientos bacterianos, de los cuales 11,630 provienen de hemocultivos y 13,313 provienen de urocultivos. El análisis de esta información fue publicado en el boletín sobre “Resistencia Antimicrobiana en patógenos prioritarios aislados en hemocultivos y urocultivos provenientes de la Red Nacional de Salud. (Laboratorio Nacional de Salud, 2022), lo cual se describe a continuación.

En el caso de los hemocultivos, los microorganismos Gram negativo más frecuentemente aislados fueron: *Klebsiella pneumoniae* (11.24%), *Escherichia coli* (8.50%), *Burkholderia cepacia* (5.78%), *Acinetobacter baumannii* (4.07%) y *Pseudomonas aeruginosa* (3.44%).

Entre estos microorganismos la presencia de bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido fue detectada en 38.93% de *Klebsiella pneumoniae* y 44.69% de *Escherichia coli*.

Por su parte, para los urocultivos el microorganismo con mayor presencia fue *Escherichia coli* y se detectó en las cepas de esta misma, que un 38.89% producen β -lactamasas de espectro extendido.

Aunque estos datos de la resistencia bacteriana no provengan del área bucal, es importante saber sobre los mismos ya que estas resistencias se dispersan en todo el cuerpo por medio del torrente sanguíneo. Esto es particularmente relevante cuando consideramos los diferentes tipos de resistencia antimicrobiana que se han documentado en la literatura biomédica.

Entre las resistencias se destaca la relativa a antibióticos betalactámicos. En el artículo “Resistencia Bacteriana a -betalactámicos, Evolución y Mecanismos”, elaborado por Martin N, G, se menciona que desde el siglo XX el uso desmedido de estos fármacos ha generado el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia por parte de las bacterias. Además, se ha observado la presencia de betalactamasas, las cuales inhiben a los betalactámicos y por lo tanto reducen su efectividad. Por último, indica que se han encontrado cambios en la estructura de las proteínas transportadoras de penicilina (PBP), así como mecanismos que reducen la concentración intracelular de antibióticos en las bacterias (Martin N, 2002).

Por ejemplo, en Guatemala, según el estudio de Mariana García, “Detección de los genes de β -lactamasas *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en aislamientos de *Escherichia coli* comunitarios” realizado en urocultivos, se detectó en los aislados de *E. coli* con betalactamasa de espectro extendido (ESBL) la presencia de los genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M los cuales son responsables de la resistencia de las cepas. Además, se encontró que el gen *bla*CTX-M estaba también presente en algunos aislados. Estos hallazgos son de suma importancia, ya que permiten tener un panorama de la situación que se vive en el país y también muestra la alta prevalencia de estos antibióticos (García et al., 2019).

En ese mismo sentido, pero enfocados en la materia de nuestro interés, según González en el artículo “Resistencia a antibióticos β -lactámicos y eritromicina en bacterias de la cavidad oral”, se ha encontrado resistencia a dichos antibióticos en la cavidad bucal. Además, en los aislados se encontraron presentes los genes *bla*TEM y *bla*VIM. Finalmente, menciona el autor que estos antecedentes son fundamentales para comprender la dinámica de la resistencia a los antibióticos en la microbiota bucal y sus implicaciones para la salud pública (González et al., 2020)

III. Justificación

El uso desmedido y la no correcta administración de los antibióticos para el tratamiento de las infecciones ha generado un crecimiento alarmante de bacterias resistentes a nivel mundial (Cabrera, 2009) y Guatemala no se escapa de ello.

En el caso de los antibióticos betalactámicos, según un estudio realizado en Colombia (González et al., 2020) ha habido un aumento en la resistencia a dichos fármacos, razón por la cual el desarrollo de un protocolo para la detección a nivel molecular es de suma importancia. Dicho protocolo emplea la saliva, ya que esta ofrece la ventaja de ser obtenida por métodos no invasivos, facilitando la recolección seriada. Sin embargo, la saliva contiene inhibidores de PCR que pueden afectar la sensibilidad de detección, pero que empleando métodos correctos de purificación y extracción permiten alcanzar la detección por PCR (Zarco et al., 2012).

La resistencia a dichos antibióticos representa un problema a nivel mundial, “porque ocasiona ineficacia en el tratamiento de enfermedades infecciosas” y con ello elevación del número de muertes según la OMS, la cual refiere que para el año 2050 habrá alrededor de 10 millones de muertes a nivel global (Giono-Cerezo et al., 2020). Para Guatemala esto es alarmante, debido a que esto se sumaría a los consabidos problemas en términos de salud pública y de acceso a la misma, ya que el PNUD señala limitaciones particularmente significativas en el sistema de salud tales como grandes carencias y desigualdades territoriales en infraestructura, equipamiento, acceso a medicamentos y personal de salud (PNDH, 2021).

El presente estudio tiene como principal objetivo desarrollar un protocolo para la validación de una prueba molecular para la detección de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos en muestras de saliva. En él se elaboraron 4 Procedimiento Normado de Operación, los cuales buscan elaborar una metodología para la recolección de saliva, extracción de ADN por 3 distintos métodos, el diagnóstico por PCR y por último el consentimiento informado para la toma y manipulación de muestras humanas.

La detección por PCR es de suma relevancia ya que permite detectar las bacterias orales que contienen el gen resistente al antibiótico betalactámico, lo que permitirá comprender la situación de cada paciente y su a vez entender la enfermedad epidémica de los antibióticos.

Este estudio es de suma relevancia y se viene a añadir a las investigaciones realizadas en Guatemala sobre el tema de la detección de genes de resistencias a antibióticos betalactámicos, ahora desde la perspectiva de realizarlo enfocado en la cavidad bucal. En la práctica clínica, la presente investigación permitirá realizar una detección temprana de la bacteria en los pacientes y a su vez llegar a brindar un tratamiento oportuno al conocerse el resultado.

Los recursos necesarios para la implementación de dicho diagnóstico, requiere de personal capacitado, reactivos, insumos y equipo de buena calidad, para poder hacer un análisis fiable. Fundamentalmente, se requiere cumplir una serie de PNO técnicos para la correcta manipulación y procesamiento de las muestras, así como presentar la información al paciente para contar con su aceptación y así cumplir con los márgenes éticos establecidos.

En síntesis, este protocolo servirá de herramienta para la detección rápida, sensible y específica a la resistencia, permitiendo superar las limitaciones de las pruebas fenotípicas tradicionales. Además de lo mencionado, al cumplir con los lineamientos éticos y un correcto diagnóstico, permitirá brindarle al paciente un tratamiento adecuado, luego de su detección. Para lograr lo anterior, esta investigación se basará principalmente en el estudio realizado por González, debido a que el mismo se asemeja, en cuanto a que aborda la resistencia a antibióticos betalactámicos en la cavidad oral utilizando muestras de saliva para la detección de los genes *bla*TEM, *bla*CTX-M y *bla*OXA.

IV. Objetivos

A. Objetivo general

Desarrollar un protocolo que permita la validación de una prueba molecular para la detección de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos en muestras de saliva.

B. Objetivos específicos

- Elaborar Procedimientos Normados de Operación para la obtención del consentimiento informado de los sujetos de estudio, la recolección y almacenamiento de muestras de saliva humana, la extracción de ADN mediante los métodos por columna, precipitación salina y agente quelante, y la detección molecular por PCR convencional de los genes de resistencia *bla*TEM, *bla*OXA y *bla*CTX-M.
- Realizar un análisis de costo-beneficio para la realización de una prueba molecular para la detección de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos en muestras de saliva.

V. Marco teórico

A. Microbiota bucal humana y enfermedades asociadas:

La microflora bucal está compuesta principalmente por bacterias, de las cuales se encuentran con mayor presencia los *Streptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Prevotella* y *Porphyromonas*. Estas bacterias en condiciones normales están en equilibrio en la microbiota. Un desequilibrio de esta comunidad bacteriana promueve el desarrollo de enfermedades como caries y periodontitis las cuales son muy usuales (Zarco et al., 2012).

En el caso de caries dental, estas son causadas por *Streptococcus mutans* y especies de *Lactobacillus* que metabolizan carbohidratos y producen ácidos que desmineralizan el esmalte dental (Takahashi & Nyvad, 2011). Específicamente *S.mutans*, al poseer enzimas glucosiltransferasa, puede sintetizar glucanos insolubles que permiten la adhesión de la bacteria al diente y así formar biopelículas (Loesche, 1986).

Las biopelículas representan un reto para la salud bucodental, debido a su resistencia a los agentes antimicrobianos como mecanismo de defensa del huésped (Ortega-Peña & Hernández-Zamora, 2018). Estas estructuras microbianas tienen la capacidad de perdurar y son de rápida regeneración, lo cual hace que se conviertan en un obstáculo persistente para el mantenimiento de una higiene oral óptima (Ortega-Peña & Hernández-Zamora, 2018). Además, actúan como plataformas que facilitan la transferencia horizontal, potenciando así la diseminación de las resistencias antimicrobianas (Ortega-Peña & Hernández-Zamora, 2018).

Por otro lado, la periodontitis es una inflamación en los tejidos, la cual es provocada por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema*, que forman biopelículas que liberan endotoxinas y enzimas proteolíticas (Hajishengallis, 2015) La *P. gingivalis* produce lipopolisacáridos y proteinasas inflamatorias que destruyen el tejido conectivo (Holt & Ebersole, 2005).

Para evitar una posible enfermedad, se requiere de una correcta higiene, con el fin de mantener el equilibrio y la salud bucal. Si por el contrario se tiene una mala higiene esto influye en el aumento de patógenos en la boca, que incluso podrían esparcirse en el torrente sanguíneo y afectar otros órganos (Olsen, 2008).

Al no contar con un sistema inmunológico capaz de controlar la infección efectivamente, ya sea debido a su gravedad o persistencia, además de que los síntomas se vuelven severos, se ve la necesidad de emplear antibióticos para tratar al paciente y así solventar su problema. Pero cabe resaltar que el uso desmedido de dicho fármaco podría alterar la microbiota bacteriana y provocar el desarrollo de resistencia antibiótica (Rodríguez, 2022). Al respecto, según Ready et al. (2004), se menciona que el fenómeno de la resistencia antimicrobiana ha emergido como un tema de creciente inquietud en los ámbitos médicos, odontológicos y científicos. Además, menciona que el uso de antibióticos y la prescripción desproporcionada son los que promueven el aumento de la resistencia (Ready et al., 2004).

B. Generalidades de los antibióticos y su uso en la odontología:

La eliminación e inhibición bacteriana son las principales funciones de los fármacos (Fuchs et al., 1994). En el caso de la odontología, los fármacos se emplean como método preventivo y también para tratar infecciones (Salgado-Peralvo et al., 2019).

Como se ha indicado, en odontología se utilizan los antibióticos después de cirugías menores o más complicadas y aún más en pacientes que son inmunocomprometidos considerando la posibilidad de que se presenten infecciones. Entre las infecciones más comunes a encontrar a nivel bucal, tenemos los abscesos dentales, la periodontitis y las infecciones post extracción. A manera de ejemplo, con el fin de prevenir que genere endocarditis, dichos medicamentos se aplican de manera rutinaria en pacientes inmunodeficientes a quienes se les haya realizado cualquier procedimiento invasivo (Robles Raya et al., 2017); de la misma forma se emplea la profilaxis antibiótica en personas con antecedentes de algún problema del corazón (Wilson et al., 2007).

Los antibióticos comúnmente empleados por los odontólogos son la penicilina, cefalosporina, metronidazol, amoxicilina y clindamicina (Rodríguez-Núñez et al., 2009), siendo los últimos dos antibióticos mencionados los más frecuentados. En el caso de la amoxicilina, está se encuentra ya mezclada con ácido clavulánico para una mayor eficacia (Salgado-Peralvo et al., 2019).

Por lo tanto, para evitar desarrollar resistencia en la comunidad bacteriana se necesita que los odontólogos realicen una prescripción juiciosa de los antibióticos basándose en los resultados obtenidos de métodos microbianos u otros métodos, más rápidos (Salgado-Peralvo et al., 2019).

C. Resistencia a antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son de los fármacos más implementados en el ámbito clínico, debido a su amplio espectro de acción y su baja toxicidad (Drawz & Bonomo, 2010). Este grupo está conformado por diversos antibióticos, entre ellos la penicilina, cefalosporina, carbapenem o monobactam. Debido a su constante aplicación, las bacterias han desarrollado distintos mecanismos que generan resistencia a los antibióticos. Entre las bacterias resistentes se encuentran las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), las cuales tienen resistencia a la penicilina y a la cefalosporina de primera, segunda y tercera generación (Paterson & Bonomo, 2005).

Entre los mecanismos de resistencia conocidos, está la producción de enzimas betalactamasas que hidrolizan el anillo betalactámico y conduce a su vez a la degradación del medicamento (Paterson & Bonomo, 2005). Otro mecanismo es la sobreexpresión de bombas de eflujo que no permiten la llegada de los antibióticos al sitio de acción de la bacteria. Por último, está la modificación en las proteínas de unión a penicilinas (PBPs), que permiten a las bacterias disminuir la afinidad con los fármacos (Moreno M et al., 2009).

Las bacterias patógenas resistentes a los antibióticos betalactámicos que se han detectado clínicamente son: *Pseudomonas aeruginosas*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* (Alós, 2015).

En general se han detectado los genes *AmpC* en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemasas (Bush & Fisher, 2011), también el gen CTX-M que se ha encontrado en *Pseudomonas aeruginosas* y *Enterobacteriaceae*, así como los genes *blaKPC*, *blaVIM*, *blaNDM* y *blaOXA-48* que codifican para carbapenemasa (Nordmann et al., 2011) en *Pseudomonas aeruginosas* y *Acinetobacter baumannii* (Hawkey, 2009). Además, los genes

mexAB-oprM se han relacionado con codificar proteínas para la producción de PBPs (Drawz & Bonomo, 2010).

Debido a las asociaciones de los genes con las bacterias, se han implementado vigilancias epidemiológicas en las cuales se almacena información general de los genes en la plataforma Bacterial Isolate Genome Sequence Database (BIGSdb) (Jolley & Maiden, 2010).

Los genes que se sugiere estudiar en este protocolo son *blaOXA*., *blaCTX-M* y *blaTEM* los cuales presentan mecanismos de acción específicos. El *blaOXA*, tiene una especificidad en la hidroxilación de cefalosporina, oxacilina y carbapenémicos. El gen *blaTEM* tiene una especificidad en la inhibición por hidrólisis de las penicilinas y cefalosporina, además hidroliza para monobactámicos. Por último, los *blaCTX-M* tiene una especificidad en la inhibición de las cefalosporinas y monobactámicos (Urquiza Ayala et al., 2018).

D. Métodos para la detección de resistencia antimicrobiana:

Por el creciente aumento a nivel mundial de bacterias resistentes a antibióticos, se ha generado la necesidad de emplear métodos que permitan detectar fenotípica y molecularmente la resistencia (Van Belkum & Dunne, 2020).

Entre los métodos fenotípicos tradicionales están la difusión en agar, la microdilución en caldo y los sistemas automatizados. Estos permiten obtener una concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos en presencia de las bacterias. El único inconveniente es que estos métodos son laboriosos y poco estandarizados, ya que requieren de cultivos que necesitan aproximadamente 2 días de incubación. (March-Rosselló, 2017).

Como alternativa a las pruebas fenotípicas, se han desarrollado pruebas moleculares que permiten la detección de genes de resistencia, empleando el ADN bacteriano sin necesidad de aislamiento previo. Uno de los métodos alternativos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a través de la cual se pueden detectar genes blancos mediante cebadores específicos (Schmieder & Edwards, 2012).

Este método presenta distintas variantes, entre ellas el PCR multiplex, en tiempo real, convencional, etc. Estos tienen la facilidad de detectar un mismo fragmento o sección de gen en distintas muestras y además para su implementación se requiere la obtención previa de material genético.

Estos métodos permiten la caracterización de mutaciones puntuales en genes de resistencia asociadas a antibióticos en las muestras de ADN (van Belkum & Dunne, 2020).

Entre los PCR más empleadas en la detección molecular, se encuentran el PCR convencional y el qPCR, también conocido como PCR en tiempo real.

Para el abordaje completo, en el presente trabajo se describe a continuación los aspectos económicos de la detección molecular mediante PCR, los métodos de extracción de ADN en muestras de saliva, el funcionamiento del PCR convencional y la qPCR y por último la detección de genes de resistencia.

Antes de abordar en los procedimientos de extracción de ADN y el funcionamiento de la PCR, es crucial comprender el proceso de validación de los métodos analíticos.

E. Validación de una prueba molecular:

La validación de cualquier método analítico, incluyendo a la de un PCR convencional es

esencial para garantizar la confiabilidad de esta técnica molecular. Además, este proceso riguroso abarca varias fases claves como la evaluación de la especificidad y de la sensibilidad, y el análisis de reproducibilidad. Estas fases se detallan a continuación. (Smith, 2021)

La fase de evaluación de la especificidad es crucial para asegurar que sólo se amplifique la secuencia de ADN objetivo, evitando así falsos positivos.

Para evaluarla se utilizan varios controles negativos, tales como agua estéril, ADN de especies no relacionadas o el empleo de muestras negativas conocidas, entre lo cual se incluyen cepas de referencia que no tienen la secuencia objetivo. (Smith, 2021)

Uno de los métodos de análisis más común es la electroforesis en gel, que permite confirmar tanto el tamaño como la identidad del fragmento amplificado.

En la evaluación de la especificidad existen varios factores que pueden influir, tales como las condiciones de reacción, diseño de cebadores y el riesgo de contaminación. (Smith, 2021)

Desarrollar condiciones óptimas para la reacción es un paso clave que permite asegurar una amplificación eficiente y específica del ADN. Este proceso implica el ajuste sistemático de varios parámetros clave, que incluyen la temperatura de anillamiento, concentración de MgCl₂, primers, dNTPs hora y número de ciclos para lograr la amplificación pretendida. (Smith, 2021)D

Para encontrar dichas condiciones óptimas se utilizan técnicas como gradientes de temperatura y matrices de diseño, que permiten evaluar múltiples combinaciones de condiciones en experimentos paralelos. (Smith, 2021)

A su vez este proceso también considera factores adicionales, como el tipo de ADN polimerasa utilizada, las características específicas de la muestra y la presencia de posibles inhibidores que puedan interferir con la reacción.

Como se mencionó anteriormente el diseño de cebadores es un factor crucial en la especificidad. Este influye directamente en la eficacia de la amplificación. (Smith, 2021)

Para que los cebadores sean óptimos deben cumplir con ciertas características, tales como tener entre 18 y 24 nucleótidos, una temperatura de fusión similar, un contenido de GC entre 40% y 60%, y evitar secciones repetitivas o complementariedad entre ellos. (Smith, 2021)

La implementación de herramientas bioinformáticas, como BLAST, facilita el diseño de cebadores al permitir calcular propiedades de los oligonucleótidos y evaluar su especificidad frente a otras secuencias en el genoma. (Smith, 2021)

Es por esta razón, un diseño cuidadoso de los primers es fundamental para garantizar tanto la especificidad como la sensibilidad de la reacción, minimizando así la posibilidad de obtener falsos positivos o negativos, asegurando así resultados confiables en la amplificación del ADN objetivo. (Smith, 2021)

En cuanto al riesgo de contaminación, esto también se denomina pureza de la muestra, lo cual es determinante, ya que si se encuentra contaminada la muestra este hecho puede inhibir el PCR y dificultar así la detección del ADN molde. (Smith, 2021)

Por último, en materia de la especificidad, se resalta que es fundamental utilizar controles adecuados y realizar un análisis minucioso de los productos de amplificación para garantizar resultados confiables, debido a que una baja especificidad puede resultar en interpretaciones erróneas en diagnóstico y tratamiento. Además, la atención a todos estos detalles es esencial para el éxito en aplicaciones diagnósticas y de investigación molecular. (Smith, 2021)

En cuanto a la fase de evaluación de la sensibilidad, además de ser otro parámetro crítico, en el cual se mide la capacidad de la prueba para detectar correctamente las muestras positivas. Esto

se calcula mediante una fórmula que relaciona los resultados verdaderos positivos con los falsos negativos, lo cual se muestra posteriormente. (Smith, 2021)

Existen varios factores que pueden afectar la sensibilidad, tales como el diseño de cebadores y condiciones de reacción, además de la pureza de la muestra y el límite de detección. (Smith, 2021)

El diseño de cebadores, las condiciones de reacción y la pureza de la muestra bajo el nombre de riesgo de contaminación, son factores que han sido descritos con antelación vinculados a la evaluación de la especificidad. (Smith, 2021)

En cuanto a establecer el límite de detección, este es un proceso relevante que determina la menor cantidad de ADN que puede ser detectada de manera confiable por el equipo. (Smith, 2021)

Consiste en evaluar la sensibilidad de la prueba, permitiendo identificar pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, lo cual es fundamental para detectar infecciones en etapas tempranas o cuando la carga bacteriana es baja. (Smith, 2021)

Es importante saber que existen varios factores que influyen significativamente en el límite de detección, tales como la eficiencia de amplificación, la pureza de la muestra, el equipo de detección y las condiciones experimentales algunas de las cuales fueron mencionadas anteriormente. (Smith, 2021)

Para validar la sensibilidad, este proceso se lleva a cabo utilizando técnicas como diluciones seriales y análisis mediante electroforesis.

Además, considerar la variabilidad de la matriz de las muestras asegura que el límite de detección refleje adecuadamente la capacidad real de la prueba. Este enfoque meticuloso garantiza que se pueda detectar concentraciones bajas de ADN, mejorando así el diagnóstico y el manejo clínico. (Smith, 2021)

Con relación a la sensibilidad y especificidad, se deben realizar pruebas rigurosas y utilizar controles adecuados durante el proceso de validación. Es por ello que una tabla de 2X2 es una herramienta estadística útil en la validación del PCR ya que permite comparar los resultados de las pruebas con un método de referencia, clasificando los datos en cuadros.

Cuadro 1: Tabla 2X2

	PCR Positivo	PCR Negativo	Total
Muestras Positiva	Verdadero Positivo (VP)	Falso Negativo (FN)	Total, Positivos
Muestra Negativa	Falso Positivo (FP)	Verdadero Negativo (VN)	Total, Negativos
Total	Total, Positivos en la PCR	Total, Negativos en la PCR	Total, de muestras

Esta matriz facilita el cálculo de parámetros cruciales para evaluar la precisión de la prueba diagnóstica, tales como la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN), los cuales se detallan a continuación:

Cuadro 2: Fórmulas para evaluar sensibilidad, especificidad, el valor predictivo (VPP) y el valor predictivo negativo.

$$sensibilidad = \frac{Verdaderos\ Positivos}{Verdaderos\ positivos + Falsos\ negativos}$$

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP}$$

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

Al contrastar los resultados de la PCR con un método considerado gold standard, la tabla de 2 x 2 ayuda a determinar la capacidad de la prueba para identificar correctamente los parámetros necesarios. (Smith, 2021)

La interpretación adecuada de estos parámetros es esencial para informar que el experimento fue exitoso o no.

Como última fase del proceso, la reproducibilidad se refiere a la capacidad de obtener resultados consistentes, independientemente de las variabilidades de datos según factores externos, tales como operadores o en distintos laboratorios. (Smith, 2021)

Para evaluar la reproducibilidad se consideran dos aspectos principales que son la repetibilidad intra-ensayo y la reproducibilidad inter-ensayo. La repetibilidad intra-ensayo implica realizar múltiples réplicas de la misma muestra por un mismo operador en el mismo día, utilizando la misma instrumentación y analizando estadísticamente la dispersión de los resultados. (Smith, 2021)

La reproducibilidad inter-ensayo, por otro lado, involucra repetir el ensayo en diferentes días por distintos operadores y con diferentes lotes de reactivos, comparando los resultados obtenidos. (Smith, 2021)

En general, la importancia de la reproducibilidad radica en las confiabilidades de la prueba, ya que permite comparar resultados entre laboratorios y asegurar el cumplimiento de estándares de calidad.

Por esta razón, es fundamental conocer y estandarizar los diferentes procedimientos de laboratorio, especialmente en técnicas moleculares.

F. Métodos de extracción de ADN en muestras de saliva:

La extracción de material genético es el paso inicial previo a realizar un PCR, existen varias metodologías, pero en este estudio se propone utilizar tres métodos distintos de extracción de muestras de saliva. El primero de ellos es la metodología que emplea buffer de lisis-saliva, el cual consiste en agregar en un principio cloruro de sodio y detergente a las muestras de saliva recolectadas; esto facilita la lisis celular y liberación del material genético contenido en el núcleo. Luego la muestra se centrifuga para separar los restos celulares y posteriormente se agrega una solución de acetato de sodio, para así precipitar el ADN. Por último, se realiza un lavado con etanol al 70% y la resuspensión en un tampón para su posterior análisis en PCR (Küchler et al., 2012).

Un segundo método es la extracción por un agente quelante, el cual es el Chelex 100, que al ser comercial es fácil de emplear. Lo que se requiere es incubar la muestra con la solución de Chelex 100 a altas temperaturas, esto con el fin de provocar la lisis celular y liberación de ADN. Además, el Chelex actúa como agente quelante que captura los iones metálicos presentes, evitando así que las nucleasas degraden el ADN. Luego de haber incubado la mezcla, ésta es centrifugada para así separar el Chelex del ADN y se realizan varios lavados para eliminar impurezas. Por último, se incuban nuevamente las muestras a elevadas temperaturas para que se separe el ADN de la resina y así obtener un sobrenadante que contiene el ADN purificado, quedando listo para su utilización en PCR (Yerena & Ramirez, 2018).

El tercer método es el procedimiento por columnas, que inician lisando las células de la muestra de saliva utilizando tampón de lisis y proteinasa K, que digiere las proteínas y libera el ADN. Luego se añade una solución de unión para permitir que el ADN se una selectivamente a la membrana de sílice de la columna de purificación. Después de varios lavados para eliminar contaminantes, el ADN purificado se eluye de la columna con un tampón de elución. Este método minimiza la manipulación de muestras y reduce el riesgo de contaminación cruzada, lo que garantiza un ADN de alta calidad adecuado para métodos sensibles como el PCR (QIA9s Isolation of genomic DNA from saliva and mouthwash using the QIAamp DNA Blood Mini Kit).

Los tres métodos para emplearse cumplen la misma función la cual es extraer ADN, la primera técnica es la más común y la más simple de aplicar, el segundo es empleado en ciencias forenses para distintas muestras no solo de saliva; por último, el tercero son kits de extracción por columna.

G. PCR para la detección genes de resistencia:

Luego de la extracción de ADN, se procede con la amplificación. Este proceso implica tres etapas: la desnaturalización del ADN, donde se calienta a una temperatura entre 94-96°C para separar sus hebras; luego, se lleva a cabo el alineamiento, en el que la temperatura se reduce a 50-65°C, esto permite que los cebadores se unan a las regiones complementarias del ADN molde; y, por último, la extensión, donde la temperatura se eleva a 72°C para que el ADN se polimeriza y sintetizar nuevas hebras, creando copias de la región objetivo (amplicon). Estos pasos se repiten múltiples veces para generar numerosas copias del ADN de interés (Park et al., 2021).

En el método por PCR se requiere de ADN molde (ADN de interés), controles positivos de calidad para el procedimiento, cebadores específicos de 20-30pb, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), solución buffer, iones de magnesio (MgCl₂) y por último la Taq polimerasa (Mullis et al., 1986).

Para la interpretación de resultados de PCR, se requiere realizar una electroforesis en gel de agarosa, con el fin de observar la presencia de una banda de tamaño definido según el diseño de los cebadores.

Por otro lado, el PCR en tiempo real, también conocida como PCR cuantitativa (qPCR) realiza la detección como lo hace el PCR convencional, pero además cuantifica las secuencias de ADN de forma precisa y reproducible (Valasek & Repa, 2005), basándose en la detección de fluoróforos intercalantes de ADN conocido como SYBR Green. Este PCR requiere de un termociclador específico para la detección de fluorescencia, cebadores eficientes, sistema de enfriamiento y calentamiento rápido (Costa, 2004).

Para la cuantificación en la qPCR, se generan curvas estándar para concentraciones específicas del gen diana. Los controles positivos y negativos garantizan la especificidad. Los resultados se expresan como el umbral del ciclo (Ct) en el que se detecta fluorescencia por encima del límite inicial (Schmittgen & Livak, 2008).

Lo anterior permite la detección de genes de manera ultrasensibles en muestras clínicas; sin embargo, la presencia del gen no siempre se correlaciona con la gravedad del fenotipo de resistencia, por lo que debe complementarse con pruebas fenotípicas (Vohra et al., 2023).

H. Implementación de la saliva para la detección molecular de resistencia en PCR:

Se puede emplear cualquier tipo de muestra en el PCR, pero la saliva es una muestra clínica

prometedora para detectar marcadores de enfermedades, incluidos genes de resistencia a los antibióticos (Wigand et al., 2021). Estudios anteriores han detectado genes de resistencia a betalactámicos, tetraciclinas y macrólidos directamente en muestras de saliva mediante PCR, incluidos *mecA*, *ermB*, *tetM*, *blaTEM* y *blaCTX-M* (Iakhno, 2016). En comparación con los hisopados, tiene la ventaja de obtenerse de forma no invasiva, por lo que facilita la recolección y el monitoreo (Zhang et al., 2013). Además, varios estudios han demostrado una buena correlación entre los perfiles de resistencia antibiótica detectados en saliva versus aislamientos de patógenos de sitios estériles, respaldando su utilidad para la vigilancia (Anderson et al., 2023).

El único inconveniente que tiene la saliva es que posee inhibidores de PCR los cuales pueden influir en la sensibilidad de la detección. Estos son compuestos polifenólicos, proteínas y lipopolisacáridos que están presentes en la saliva (Bhattacharya et al., 2020). Para ello se requiere implementar técnicas de purificación y extracción de ADN para un ensayo de PCR adecuado. Ejemplo de esto sería utilizar columnas de afinidad o extracción con solventes orgánicos (Bridson et al., 2012). Por lo tanto, es recomendable evaluar y comparar distintos kits comerciales y protocolos de extracción no comerciales para seleccionar aquel que brinde el mayor rendimiento y pureza (Lopera-Barrero et al., 2008).

El uso de controles en el PCR es crucial para asegurar resultados confiables y reproducibles. Los controles son, en esencia, muestras adicionales que se incorporan a cada reacción para evaluar distintos propósitos: detectar posibles contaminaciones, verificar que los reactivos están funcionando adecuadamente y confirmar que la amplificación se está llevando a cabo. (Luis et al., 2018) Existen diversos tipos de controles que se emplean en el PCR. Entre ellos está el control positivo, el cual permite verificar que los reactivos y las condiciones de la reacción están en orden, este usualmente se trata de una muestra de ADN que contiene el gen que se desea detectar en las otras muestras. Por otro lado, el control negativo es importante para identificar alguna posible contaminación en la reacción, normalmente en el control negativo no se tiene ADN molde y por lo tanto no se esperaría ninguna amplificación. Por otro lado, se tienen los controles internos, los cuales son fragmentos de ADN de secuencia conocida, que se incorporan a cada muestra de PCR, sirviendo como un estándar de referencia, permitiendo evaluar la eficiencia de la extracción de ADN, la calidad de los reactivos y la eficacia de la amplificación. (Luis et al., 2018)

Adicional a lo anterior, también es importante incorporar tratamientos fisicoquímicos durante la extracción para eliminar inhibidores, como incubaciones con proteinasa K, lavados con etanol, utilización de columnas con resinas intercambiadoras de iones, entre otros (Sancho et al., 2022). Al mismo tiempo se requiere monitorear la presencia de inhibidores del PCR y la eficiencia de la amplificación en cada muestra de saliva mediante controles internos (genes housekeeping bacterianos) y spikes (ADN o RNA exógeno añadido) (Bhattacharya et al., 2020).

Para confirmar la ausencia de inhibidores, que se haya realizado mediante diluciones en serie, y para corroborar la calidad de la amplificación de los genes es ideal cuantificar y evaluar espectrofotométricamente la pureza del ADN aislado (*Banco ADN*, s. f.) lo cual permite garantizar la reproducibilidad de la detección de genes resistentes en muestras de saliva mediante PCR.

I. Aspectos éticos relacionados con estudios en muestras humanas:

Para llevar a cabo un estudio de investigación, se requiere obtener el aval del comité de ética de una institución determinada. Esto abarca el contar con el consentimiento informado de cada participante, al cual se le brinda una explicación detallada del estudio, así como de los objetivos, el procedimiento, los riesgos que puedan ocurrir y los beneficios del estudio (Arriaga Deza, 2019).

Para la manipulación y manejo de muestras, se necesita garantizar confidencialidad al

paciente y anonimato de los datos obtenidos de la prueba. Para ello se debe utilizar un identificador único en lugar de nombres, para así separar la información de la identidad de los participantes (Arriaga Deza, 2019).

Estos aspectos deben cumplir con las directrices éticas internacionales, como la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de las Buenas Prácticas Clínicas de la Conferencia Internacional de Armonización (Cantín, 2018).

Al cumplir estos estándares éticos, se está protegiendo la dignidad y los derechos de los voluntarios que participan en investigaciones biomédicas.

J. Aspectos económicos de la detección molecular mediante PCR:

Para el procesamiento de muestras, es habitual que un laboratorio que no cuente con equipo especializado para un análisis específico no invierta en ello y recurra a utilizar laboratorios de referencia, que cuenten con el equipo. Estos laboratorios especializados de referencia incluyen los laboratorios de universidades. El recurrir a ellos implica cubrir solamente los costos de cada análisis y así evitar la inversión en equipos e insumos costosos.

Si se desea realizar numerosas pruebas se justificaría la inversión. Para ello el costo inicial incluye la compra de equipos tales como un termociclador, una cámara de extracción de ADN y un sistema de detección, lo cual es una inversión importante (Yang & Rothman, 2004). A esto hay que adicionar otros costos, que incluyen el mantenimiento preventivo y correctivo de los equipos, así como los derivados de reactivos cebadores y sondas fluorescentes, siendo algunos de estos costosos como las enzimas (Schuurman et al., 2004).

Además, es esencial contar con espacio e infraestructura adecuada para garantizar la calidad de los resultados, evitar la contaminación y así poder cumplir con las buenas prácticas de laboratorio (Aguilar et al., 2020).

Es necesario a su vez contratar y formar personal altamente calificado en biología y diagnóstico moleculares, lo que incrementa los costes de recursos humanos (Sweet-Cordero & Santos-Preciado, 1997). La automatización de procesos puede ayudar a reducir costos al aumentar la productividad y la eficiencia (Yang & Rothman, 2004).

El hacer un análisis de costo por paciente dependerá del tipo de PCR implementado, pero al hacer un análisis de costo-efectividad puede mostrar que el precio de las pruebas se justifica por el impacto positivo que tiene en el área de salud pública, ya que permite un diagnóstico y tratamiento rápidos de las infecciones (Yang & Rothman, 2004).

VI. Marco metodológico

El presente documento consiste en un estudio descriptivo que sirve como guía para la elaboración de una prueba de PCR destinada a la detección de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos en muestras de saliva humana.

Se parte del hecho de que para todo procedimiento que se realice es fundamental contar con un marco ético. Por esa razón se abordó este aspecto luego de una investigación documental y habiendo seguido los parámetros éticos que deben estar presentes en un consentimiento informado de conformidad con lo elaborado por la Universidad de Búfalo. En tal sentido se pudieron establecer principios éticos sólidos que fueron usados en el protocolo del análisis de muestras de saliva y el tratamiento de la información relacionada. Además, se elaboró una ficha, la cual contiene el consentimiento informado de los participantes; en dicha ficha se aseguró la voluntariedad de los participantes respetando su privacidad mediante la codificación de muestras.

Añadido a lo anterior, en dicho marco metodológico se consideran los aspectos de capacitación del personal de laboratorio tanto para la realización del procedimiento, como para asegurar la confidencialidad de la información, el manejo de las muestras y otros aspectos. También se consideró un comité de ética independiente que supervise el proceso para proteger los derechos y bienestar de los participantes, respetando los principios éticos fundamentales y las regulaciones vigentes (Abajo Iglesias et al., 2008). Para ello se requiere contar previamente con un expediente el cual tiene que contener un formulario de solicitud, el protocolo de la investigación, el documento de consentimiento informado, el Curriculum Vitae de los investigadores, algún documento que pruebe la realización de un curso de bioética, un documento donde tenga el aval de la institución donde se realiza la investigación y un documento que explique el manejo de los datos de la investigación; todo esto tiene que ser presentado a dicho comité de ética.

Luego de abordar el tema ético, este estudio se enfocó en la metodología de un Procedimientos Operativos Estandarizados (POEs), también conocido como PNO, lo cual implicó en primer lugar la identificación de la tarea o proceso que se desea estandarizar. Para ello se recopiló información, habiendo luego determinado de forma precisa cada paso a realizar, incluyendo detalles relevantes como tiempos, temperaturas, cantidades, entre otros. Se estudió también que el PNO debía ser revisado y validado por personal experto con cierta frecuencia, para que, una vez aprobado, se implemente y se capacite al personal involucrado (Agencia Chilena para la Inocuidad y la Calidad Alimentaria, 2018)

Con esta información se procedió a elaborar los PNOs correspondientes, en los que se detalló de manera clara y concisa los pasos a seguir para la obtención de la aprobación del comité de ética, la obtención del consentimiento informado de los pacientes, la obtención de las muestras, el transporte y almacenamiento de las muestras, el procesamiento de las muestras incluyendo la extracción de ADN, el PCR, entre otros; así como para realizar una prueba diagnóstica y el análisis de costos. Los PNOs tuvieron como fundamento garantizar la consistencia, calidad y trazabilidad de los procesos (Software, 2024).

Particularmente para los PNO de obtención y tratamiento de la muestra, se realizó una revisión bibliográfica para determinar los mejores métodos para la recolección de saliva y para la extracción de ADN. Esta revisión se efectuó en el “manual de prácticas de biología molecular” y de QIAamp DNA mini kit, Norgen Saliva DNA Isolation Kit, Quick-DNA™ Miniprep Kit y de los artículos “Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphisms” y “Resistencia antibióticos betalactámicos y eritromicina en bacterias de la cavidad oral”.

Además, se requirió realizar una revisión exhaustiva de la literatura científica disponible para protocolo de detección. Para ello se utilizaron los artículos “Resistencia antibióticos betalactámicos y eritromicina en bacterias de la cavidad oral” (González et al., 2020), “Genes *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de paciente con infección intrahospitalaria” (García et al., 2019) y “Detección de carbapenemasas tipo OXA en aislados de *Acinobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas Venezuela” (Cuaical Ramos et al., 2012). Todo esto con la finalidad de poder identificar y seleccionar cebadores específicos que estuviesen validados para la detección mediante PCR de los genes *bla*TEM, *bla*CTX-M y *bla*OXA, los cuales se encuentran frecuentemente asociados a la resistencia a antibióticos betalactámicos en diferentes microorganismos patógenos.

Complementario a la descripción del Procedimiento Operativo Estandarizado se realizó un análisis de costos de reactivos para la extracción de ADN de muestras de saliva: Para esto, fue necesario considerar y realizar una lista de los reactivos y kits a emplear en todo el procedimiento. En ese sentido se realizó una búsqueda de costos en el mercado y principalmente se tomó como referencia el precio proporcionado por Merck, Bio Rad, Norgen Biotek, Qiagen y Zymo research, en sus respectivas páginas de internet. Teniendo contemplados los diversos costos, se puede realizar un análisis detallado, lo cual permite al usuario determinar el costo promedio de la prueba, en cuestión de reactivos.

VII. Resultados

La investigación consistió en la elaboración de documentos PNO para la planificación y posterior ejecución del proyecto experimental. En él se plantearon los resultados que se detallan a continuación:

La investigación sobre el uso de muestras biológicas humanas es un tema crítico que implica consideraciones éticas y metodológicas. A continuación, se presentan los aspectos clave relacionados con la obtención y manejo de estas muestras, así como los requisitos necesarios para garantizar su uso adecuado en proyectos experimentales.

Inicialmente, para presentar un consentimiento informado a los pacientes, el investigador principal tiene previamente que haber completado un curso de ética en investigación como el que se indica posteriormente; además deberá obtener el certificado de Registro de Organización de Investigación por Contrato, Organización de Manejo de Sitio, Sitio de Investigación, Comité de Ética en Investigación -DRCPFA- avalado por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de su país (MSPAS, s. f.) o bien el ente encargado de esta área de salud.

Después, se tiene que elaborar un expediente, el cual debe contener información del proyecto, su protocolo de estudio, el documento de consentimiento informado, los formularios de registro de datos, entre otras cosas. Este expediente tiene que ir dirigido a un comité de ética, quien tiene que revisar y aprobar dicho trabajo. A esto se suma el llenar formularios para la lista de verificación de elementos de protocolo, donde se evaluará el reclutamiento de los participantes, la confidencialidad y el consentimiento informado. Para ello se empleó como ejemplo un expediente de la Universidad Metropolitana de Educación, Ciencia y Tecnología (de Panamá) y otro expediente de la Universidad del Valle de Guatemala.

El expediente del Comité de Bioética de la Universidad Metropolitana de Educación, Ciencia y Tecnología (UMECIT) requiere una serie de documentos cruciales para el trabajo. En dicho expediente se requiere realizar una carta de solicitud en el que se debe detallar la información del investigador principal, el propósito del estudio propuesto, la metodología, la fundamentación para la ejecución del estudio en el contexto panameño y los datos de contacto del investigador. Además debe ir acompañado de una autorización emitida por la Dirección de Investigación (en caso de ser un proyecto estudiantil), así como la anuencia escrita por la institución anfitriona del estudio, el protocolo de investigación rubricado, la acreditación de Buenas Prácticas Clínicas (obtenida a través de la plataforma <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/elearning/>), el curriculum vitae de los investigadores participantes, una declaración jurada de ausencia de conflicto de interés, un compromiso formal de adhesión a los principios bioéticos, los formularios de consentimiento informado, la documentación informativa complementaria si fuese pertinente y la constancia de registro en la plataforma RESEGIS (UMECIT, 2022).

Dando un ejemplo nacional, en el comité de ética de la facultad de Ciencias y Humanidades de la Universidad del Valle de Guatemala, se solicita en el expediente información muy similar a la del ejemplo anterior, sólo que esta entidad presenta la posibilidad de realizar el curso de la

acreditación en Buenas Prácticas Clínicas por medio de distintas plataformas: https://ori.hhs.gov/education/products/montana_round1/research_ethics.html (gratuito, en inglés), <https://www.hhs.gov/ohrp/education-and-outreach/online-education/human-researchprotection-training/human-research-protection-foundational-training/index.html> (gratuito, en inglés) y por último el <https://phrptraining.com/> (con un costo de US\$50.00, pero que se puede cursar en inglés o español) (UVG, 2014).

Todo lo anterior, se encuentra explicado con detalle en el PNO 1.03 de consentimiento informado y los requisitos de manejo de muestras humanas (ver sección de anexos PNO).

Se ha trabajado en varios documentos de PNO, que detallan el proceso a seguir para el procesamiento de muestras recolectadas, considerando distintas metodologías, los cuales se encuentran en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Procedimientos normalizados de operación para la detección molecular de genes de resistencia a antibióticos en muestras de saliva.

No. PNO	Nombre del PNO	Descripción del Procedimiento
1.00	Recolección de muestras de saliva para diagnóstico molecular	Describe el proceso completo de recolección de muestras de saliva para los distintos métodos de extracción
1.01	Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, métodos por columna y el método de precipitación salina	Detallan los pasos necesarios de diferentes métodos para extraer ADN de muestras de saliva, incluyendo los reactivos, equipos y materiales de cada método.
1.02	Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M y <i>bla</i> OXA	Explica el proceso de amplificación de los genes resistencia a antibióticos mediante PCR convencional, incluyendo la preparación de reacción, las condiciones de amplificación y el análisis de los resultados mediante gel de electroforesis
1.03	Consentimiento informado y requisitos para el manejo de muestras humanas	Describe los aspectos éticos y legales relacionados con la investigación con seres humanos, incluyendo la obtención del consentimiento informado, la confidencialidad de los datos y el manejo adecuado de las muestras biológicas.

Se puede observar en la primera columna las numeraciones de los PNO que se realizaron,

en la segunda columna se encuentran los títulos de cada procedimiento y en la tercera columna se encuentra una breve descripción de lo que se realiza en cada paso.

Mediante los PNO detallados en el Cuadro 3, se puede llevar a cabo un estudio para identificar la presencia o ausencia de los genes de resistencia a antibióticos *bla*TEM, *bla*CTX-M y *bla*OXA en muestras de saliva, así como la recolección de estas muestras incluyendo las formas éticas y la extracción de material genético utilizando distintas metodologías. La utilización de distintos métodos de extracción permitirá al experimentador evaluar la eficiencia y reproducibilidad de cada técnica, considerando aspectos de calidad de la muestra y comparándolos con aspectos económicos del desarrollo de la prueba.

Siguiendo los PNO, se logra identificar la ausencia o presencia de genes de resistencia a antibióticos *bla*TEM, *bla*OXA y *bla*CTX-M en las muestras de saliva mediante un gel de agarosa 1.2%. Un ejemplo de ello es el Cuadro 4 que presenta la disposición de las muestras y controles dentro del gel de agarosa.

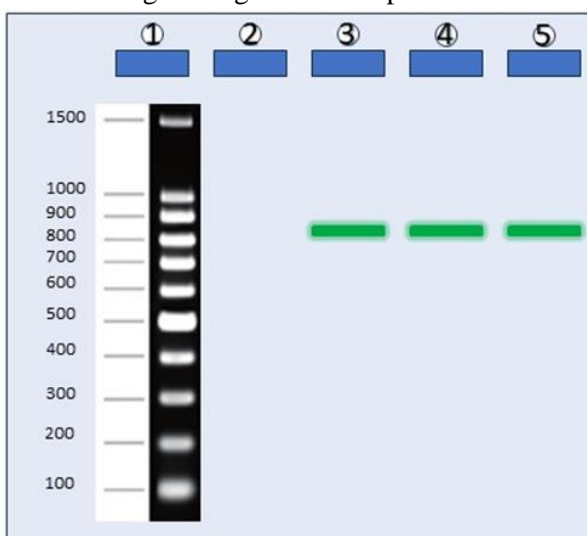
Cuadro 4: Resultados esperados de la electroforesis en gel de agarosa 1.2% para la detección de genes de resistencia a antibióticos en muestras de saliva mediante PCR convencional.

Pocillo no. / descripción	1	2	3-4	5	Identificación del gen de interés	
					Gen	No. pb
Gel al 1.2%	Escalera de ADN	Control Negativo	Controles Positivos	Muestra de saliva		
Figura 1	Presente	Ausencia	Presente	Presente	<i>bla</i> CTX-M	856
Figura 2	Presente	Ausencia	Presente	Presente	<i>bla</i> OXA	311
Figura 3	Presente	Ausencia	Presente	Presente	<i>bla</i> TEM	956

En este cuadro, en el pocillo 1 se observa la escalera de ADN de 1kb, en el pocillo 2 se encuentra el control negativo, en los pocillos 3 y 4 se encuentran los controles positivos y en el pocillo 5 se encuentra la muestra de ADN. La palabra presente significa que se puede visualizar bandas o una banda en el gel de agarosa. Al contrario, la palabra ausencia se refiere a la ausencia de bandas o banda en el gel.

La visualización de estos resultados obtenidos del gel de electroforesis se describe a continuación.

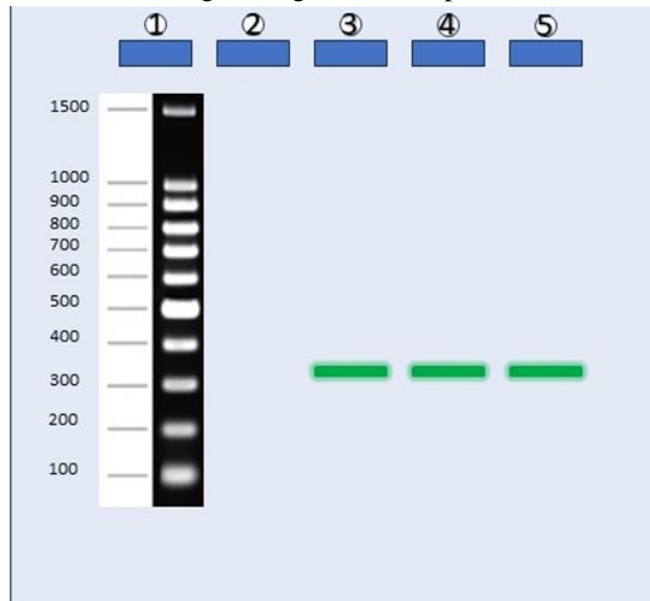
Figura 1: Productos de PCR en gel de agarosa 1.2% para la detección del gen *bla*CTX-M.



En el pocillo 1 se tiene la escalera de ADN de 1kb, en el pocillo 2 se encuentra el control negativo, en los pocillos 3 y 4 se encuentran los controles positivos, y en el pocillo 5 se ubica la muestra de ADN

En la Figura 1 se aprecia la presencia de una banda tanto en los controles positivos (pocillos 3 y 4) como en la muestra (pocillo 5) de aproximadamente 856 pb, lo cual corresponde al gen *blaCTX-M* y por lo tanto se puede decir que el gen está presente en la muestra.

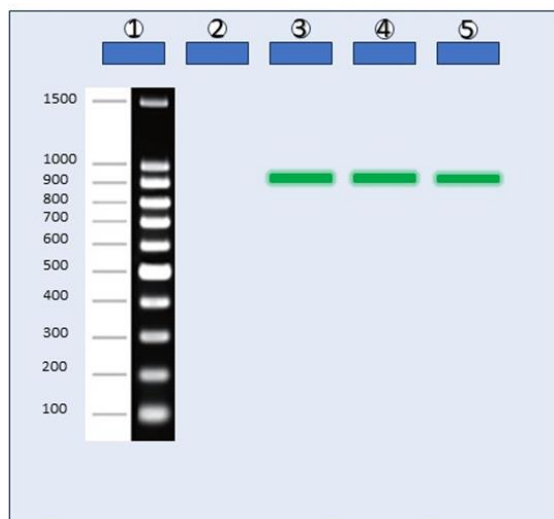
Figura 2: Productos de PCR en gel de agarosa 1.2% para la detección del gen *blaOXA*



En el pocillo 1 se ubica la escalera de ADN 1 kb, en el pocillo 2 está el control negativo, los pocillos 3 y 4 se encuentran los controles positivos y en el pocillo 5 se tiene la muestra de ADN.

Según esta figura, tanto la muestra como los controles positivos presentan una banda de aproximadamente 311 pb, esto indica la presencia del gen *blaOXA*.

Figura 3: Productos de PCR en gel de agarosa 1.2% para la detección del gen *blaTEM*



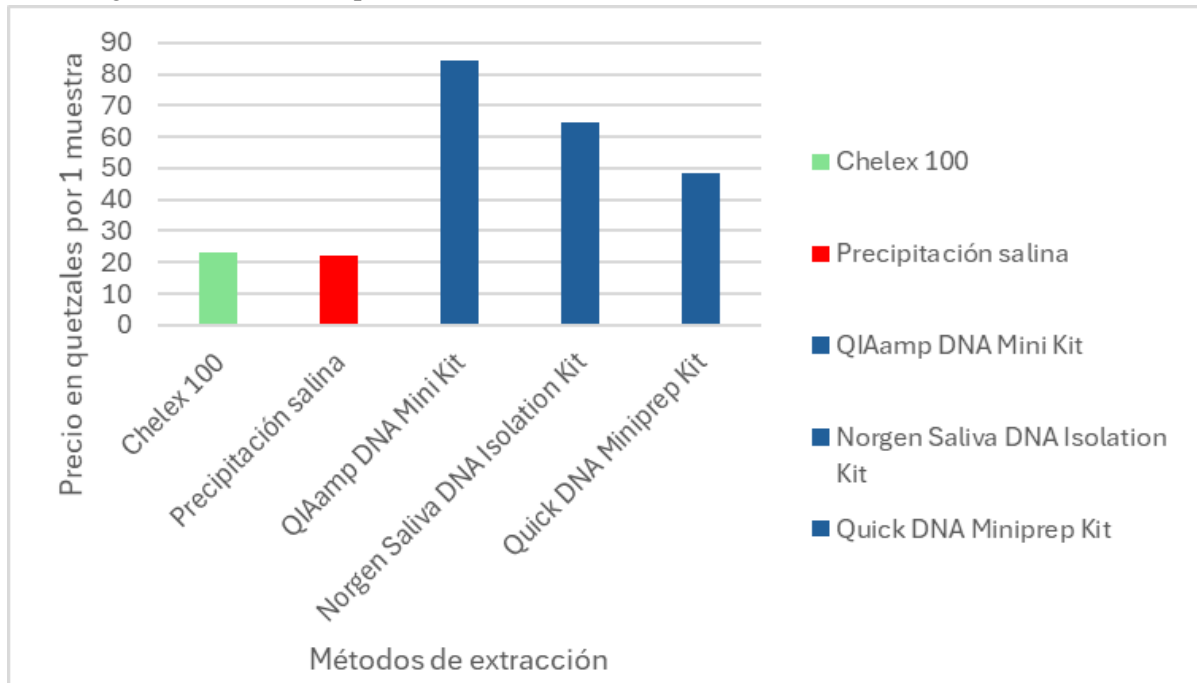
En el pocillo 1 se tiene la escalera de ADN de 1kb, en el pocillo 2 se encuentra el control

negativo, los pocillos 3 y 4 se encuentran los controles positivos y en el pocillo 5 la muestra de ADN.

La Figura 3 ilustra la revelación del gel de electroforesis, en el cual se puede observar bandas que corresponden a 956 pb, lo cual indica la presencia del gen *bla*TEM resistente en la muestra y en los controles positivos.

La identificación de los genes de resistencia a antibióticos betalactámicos es fundamental en el ámbito de la biología molecular, pero también lo es el análisis económico para la realización de una prueba por PCR convencional, ya que esto permite visualizar la posibilidad de su realización en términos de recursos. Esto se aborda a continuación.

Figura 4: Análisis comparativo de costos de distintos métodos de extracción de ADN



La Figura 4 presenta los costos de diversos métodos de extracción de ADN, entre ellos: Chelex 100 de color (verde), precipitación salina de (color rojo), y los métodos por columna (color azul) que son: QIAamp DNA Mini Kit, Norgen Saliva DNA Isolation Kit y Quick DNA Miniprep Kit. En el eje X se encuentran los métodos de extracción de ADN y en el eje Y se puede observar los precios en quetzales de los distintos métodos para el análisis de 1 muestra.

Esta figura permite realizar un análisis comparativo de costos de los diversos métodos de extracción de ADN en muestras de saliva. En ella se puede determinar que el método de precipitación salina resulta ser el más económico teniendo un costo por muestra de Q22.37, seguido del método de Chelex 100 con un costo por muestra de Q23.00; también se muestra que los métodos por columna son los más caros, debido a los procesos de purificación que lleva esta técnica que por contraparte proporciona el beneficio de que se obtiene un alto grado de pureza de ADN. Entre estos métodos por columna se encuentra el QIAamp DNA Mini Kit que resulta ser el de mayor costo por muestra con Q84.53 y el Quick DNA Miniprep Kit el más barato de los tres kits por este método con un costo de Q48.27. Se puede encontrar por lo anteriormente expuesto una relación directa entre los precios obtenidos de los distintos métodos con respecto de la calidad de ADN que se obtendría debido a los procesos de purificación involucrados.

Además del análisis de costos asociados a los métodos de extracción de ADN, es necesario estudiar los costos vinculados a la técnica de PCR convencional. A continuación, se detallan los

precios del equipamiento para su implementación.

Para ello se consultó en distintas fuentes con la finalidad de obtener los costos del procedimiento por PCR. En el caso de los reactivos, se consultó los precios de Merck, Biorad y Thermo Fisher. En el caso de los materiales, se consultó los que brinda Prolab. Los kits comerciales se obtuvieron de las empresas fabricantes Norgen Biotek, Qiagen y Zymo Research. De la misma forma los equipos se obtuvieron de las empresas ICB, Biorad, Edvotek Inc, IVYX Cientific, Megaequipamiento y de INTLAB.

Cuadro 5: Costo de equipos para el PCR convencional:

Equipo	Precio
Termociclador	Q110,000.00
Campana de flujo laminar	Q40,000.00
Caster Gel	Q1,500.00
Campana de electroforesis	Q2,850.00
Cámara UV	Q3,090.00
Centrifugadora	Q20,000.00
Vortex	Q260.00
Total equipo	Q177,700.00

Se aprecia en el Cuadro 5 los costos de los equipos para la realización del PCR convencional en este cuadro se desglosan los equipos empleados en este estudio. Estos equipos consisten en un termociclador para la amplificación del ADN siendo el equipo más costoso con un valor de 110,000 quetzales, una centrifuga, una campana de flujo laminar, además un sistema de electroforesis en gel de agarosa para la visualización de los productos del PCR el cual tiene 17 pocillos y por lo tanto una capacidad para trabajar 13 muestras de saliva (debido a que 4 pocillos son empleados para los controles y la escalera de ADN), una cámara de transiluminación UV para detectar las bandas y un vortex para la mezcla de los reactivos. Siendo estos los equipos mínimos necesarios para poder realizar una prueba de PCR. Se puede observar que el costo total del equipamiento para este estudio es de 177,700.00 quetzales y es una inversión que solo se requiere realizar una vez.

Si bien los equipos son fundamentales para la realización del PCR convencional, es igualmente crucial considerar los costos asociados a la amplificación de las muestras de saliva. Estos gastos recurrentes de reactivos y materiales se detallan en los siguientes apartados.

A continuación, en el Cuadro 6 se detallan los costos de los reactivos y materiales para la amplificación de una muestra con un volumen final de reacción de 20 μ L. En la columna 2 se encuentra el precio por el volumen o cantidad del reactivo y material, en la tercera columna se indican los microlitros o unidades de material que se requieren para la reacción y en la cuarta columna se establece el costo en quetzales. En cada una de las filas se detalla el costo por cada uno de los reactivos utilizados en la reacción. En la última fila, la fila 8 se presenta el costo total en quetzales para tener un volumen final de la reacción de 20 μ L.

Cuadro 6: Costo por tubo de PCR para la amplificación en termociclador (1 reacción de PCR)

Amplificación	Precio	cantidad	total
Agua	Q0.01	77.2 μ L	Q0.78
Taq polimerasa	Q32.09	0.8 μ L	Q25.68
Primers	Q10.00	8 μ L	Q80.00
dNTPS	Q5.45	2 μ L	Q10.90
Buffer PCR	Q2.50	10 μ L	Q25.00
Tubos PCR	Q0.57	1	Q0.57
	Total	materiales	142.93

Como puede apreciarse, para realizar una ampliación por PCR se requiere una variedad de reactivos y materiales cuyos costos se detallaron en el Cuadro 6. Entre los distintos reactivos empleados, se encuentra el Buffer de PCR, los dNTPS, la taq polimerasa, los Primers Reverse y Forward, y por último el agua libre de nucleasas. También se tiene que tomar en consideración de tubos para PCR (0.2mL). La selección de estos reactivos y materiales es crucial para garantizar la eficiencia y reproducibilidad del PCR, así como la correcta visualización de los productos de la ampliación por el gel de agarosa. Se determinó que el costo unitario para la ampliación asciende a 142.93 quetzales. Para efectos de cálculos posteriores y análisis de costos, este valor será denominado variable “v”.

Cuadro 7: Costo de las puntas 10 μ L y 100 μ L para cada tubo de PCR

Materiales	Precio	cantidad	total
Puntas 100 μ L	Q1.16	7	Q8.12
Puntas 10 μ L	Q1.16	1	Q1.16
	Total	materiales	Q9.28

El Cuadro 7 presenta los costos de las puntas de 10 μ L y 100 μ L necesarias para preparar la reacción de PCR. En la fila 2 para las puntas de 100 μ L, en la segunda columna se encuentra el precio por unidad, en la tercera columna se encuentra la cantidad que se requiere para la amplificación y en la cuarta columna el costo en quetzales de las puntas de 100 μ L para cada tubo; en la fila 3 se encuentra el precio de cada punta de 10 μ L, así como las unidades de puntas que se requiere para la reacción y en la última columna se tiene el costo en quetzales de las puntas de 10 μ L a invertir por tubo de PCR. Mediante el Cuadro 7 se ve que el costo de las puntas 10 μ L y 100 μ L para cada tubo de PCR resulta en una inversión de 9.28 quetzales, y a esto se le denomina la expresión “cte”.

Una vez analizado el presupuesto para la amplificación del ADN, es de suma importancia considerar los costos del análisis por el gel de electroforesis, ya que dicha técnica permite la

visualización y validación de los productos amplificados. Es por ello que en los siguientes cuadros se detallan los materiales y reactivos para su implementación.

Los costos detallados del gel se pueden ver a continuación, los cuales se describen con base a los pocillos y los costos que se realizan por corrida.

Cuadro 8: Costo por pocillo del gel de electroforesis

Reactivos y Materiales	Precio	cantidad	total
Loading Dye	Q2.44	2 μ L	Q4.88
Puntas 10 μ L	Q1.16	1	Q1.16
	Total	materiales	Q6.04

El Cuadro 8 presenta los costos de los reactivos y materiales para un pocillo en el gel de electroforesis para una muestra de saliva. En la fila 2 para el Loading Dye en la segunda columna se encuentra el precio por microlitro, en la tercera columna se tiene los microlitros que se requiere para la reacción y en la cuarta columna el costo en quetzales del Loading Dye para cada pocillo; en la fila 3 se encuentra el precio de cada punta de 10 μ L, así como las unidades de puntas que se requiere para la reacción y en la última columna se tiene el costo en quetzales de las puntas de 10 μ L a invertir por pocillo. Mediante el Cuadro 8 se ve que el costo por pocillo resulta en una inversión de 6.04 quetzales. Este costo incluye tanto el colorante como las puntas de 10 μ L que se emplean para una muestra de saliva. Para su uso posterior a este valor se denomina “c”.

Cuadro 9: Costo de una corrida en el gel de electroforesis

Gel de electroforesis	Precio	cantidad	total
TBE	Q1.01	200mL	Q101.00
Agar	Q76.26	1.2g	Q91.52
SYBR safe	Q3.08	4 μ L	Q12.32
Escalera ADN	Q1.73	10 μ L	Q1.73
Puntas 10 μ L	Q1.16	1	Q1.16
	Total	materiales	Q207.73

Los datos mostrados en el Cuadro 9 revelan los costos de los reactivos y materiales para realizar una corrida en el gel de electroforesis. En la columna 2 se encuentra el precio por el volumen o cantidad del reactivo y material, en la tercera columna se indican los microlitros o unidades de material que se requieren para la reacción y en la cuarta columna se establece el costo en quetzales. En cada fila se detalla un reactivo o material distinto. La última fila, contiene el costo total por corrida en quetzales.

El Cuadro 9 reveló el costo que tiene una corrida en el gel de electroforesis, el cual es de 207.73 quetzales. El agar utilizado para la formación del gel representó el gasto más significativo. Le siguen el Buffer TBE, esencial para mantener las condiciones óptimas durante la electroforesis. El SYBR safe, utilizado para visualizar el ADN y la escalera de ADN que sirve como marcador de tamaño. Este costo puede variar con el número de corridas que se vaya a realizar. Para su uso posterior a este valor se le denomina “k”.

Tomando en consideración todos los aspectos económicos abordados en los cuadros 6, 7, 8 y 9; se elaboraron distintas fórmulas que permiten al investigador saber el costo por muestra del PCR convencional.

Para ello, no se tomó en cuenta el costo de los equipos, ya que estos son inversiones que se realizan una sola vez y no es un gasto constante como lo es con los materiales y reactivos empleados en el estudio.

Habiendo estudiado los distintos costos de los reactivos y materiales para el PCR convencional, resulta fundamental obtener el precio por muestra. Esto se obtiene a partir de los cálculos que se abordan en los cuadros a continuación.

Debido a que el gel para la electroforesis consta de 17 pocillos y considerando que 4 de ellos son utilizados para la escalera de ADN, 2 controles positivos y uno negativo solamente quedan 13 pocillos para trabajar muestras de saliva.

Entonces, por cada grupo de muestras de 1 a 13 se deben producir 3 tubos dedicados a los controles, siendo dos positivos y uno negativo. Se debe primero establecer la cantidad de corridas que se requieren dependiendo el número de muestras “m “. Usando la función “parte entera” se puede establecer la cantidad de controles necesarios. Para ello se toma el número de muestras y restándole 1 se divide entre 13, el entero del cociente más uno determina “n” como número de corridas a realizar.

Ecuación 1: Número de geles de agarosa en función del número de muestras a trabajar.

$$n = \left[\frac{m - 1}{13} \right] + 1$$

Con este valor “n” se puede ahora calcular el costo del termociclador para lo cual se multiplica la cantidad de controles por cada corrida más el número de muestras multiplicado por el valor de cada tubo y los reactivos a emplear en cada uno, cuyo monto individual es” v”.

$$v(3n + m)$$

A esto se suma el valor de las puntas de 10ml a utilizar que serían una por cada muestra.

$$P_{10}m$$

Se añade ahora el monto constante “cte” que es el costo de las puntas de 10 µL para cada control positivo, así como el de las puntas para cada reactivo del Cuadro 8.

Con ello se llega a la fórmula siguiente:

Ecuación 2: Costo de la amplificación por el termociclador en función del número de muestras a procesar

$$T = v(3n + m) + P_{10}m + cte$$

Con este mismo razonamiento se puede ahora determinar los costos de la electroforesis.

Al usar 4 pocillos siendo ellos para los 2 controles positivos, el negativo y la escalera se debe agregar un pocillo por muestra, todo ello multiplicado por el valor de los insumos y puntas requerido por pocillo “c” con lo que se tendría lo siguiente:

$$(4n + m)c$$

Ahora se agrega el valor de los insumos por cada corrida “k” con la expresión k(n).

Al unir las expresiones anteriores se obtiene el costo de la electroforesis para “m” muestras.

Ecuación 3: Costo del gel de electroforesis en función del número de muestras a analizar

$$E = (4n + m)c + k(n)$$

Tomando el total del costo T y E antes descrito, se puede determinar el costo promedio por muestra de saliva “PPM “:

Ecuación 4: Costo promedio por muestra en función del número de muestras a estudiar.

$$PPM = \frac{T + E}{m}$$

Los costos asociados a la amplificación por PCR y electroforesis en gel se calcularon mediante las ecuaciones presentadas. El costo (T) de la amplificación depende directamente del número de muestras (m), del costo por tubo de PCR (v=Q142.93), el costo de las puntas de 10µL (P10=Q1.16) y del costo constante (cte=Q9.28). A su vez, el costo del gel de electroforesis € se determina en función del número de muestras, del costo por pocillo del gel (c=Q6.04), del número de corridas y de un costo fijo por corrida (k=Q207.73). Es importante destacar que se consideraron tres controles por muestra (dos positivos y uno negativo) y una escalera de ADN por corrida de gel.

Con estos valores y fórmula se elaboró en Excel el Cuadro 10, en el cual en la primera columna está el número de muestras “m”, en la segunda columna se encuentra el costo de la amplificación “T” con respecto a “m”, en la tercera columna se tiene el costo de la electroforesis en gel de agarosa “E” en función de “m”, en la cuarta columna se encuentra la suma de “T+E” (siempre en función de” m” cada una) y en la última columna se muestra el costo promedio por muestra” PPM” en función de “m”.

Cuadro 10. Análisis de costos promedio por número de muestras procesadas.

m	T	E	T+E	PPM
1	584.48	237.93	822.41	822.41
2	728.57	243.97	972.54	486.27
3	872.66	250.01	1122.67	374.22
4	1016.75	256.05	1272.8	318.20
5	1160.84	262.09	1422.93	284.59
6	1304.93	268.13	1573.06	262.18
7	1449.02	274.17	1723.19	246.17
8	1593.11	280.21	1873.32	234.17
9	1737.2	286.25	2023.45	224.83
10	1881.29	292.29	2173.58	217.36
11	2025.38	298.33	2323.71	211.25
12	2169.47	304.37	2473.84	206.15
13	2313.56	310.41	2623.97	201.84
14	2888.76	548.34	3437.1	245.51
15	3032.85	554.38	3587.23	239.15
16	3176.94	560.42	3737.36	233.59
17	3321.03	566.46	3887.49	228.68
18	3465.12	572.5	4037.62	224.31
19	3609.21	578.54	4187.75	220.41
20	3753.3	584.58	4337.88	216.89
21	3897.39	590.62	4488.01	213.71
22	4041.48	596.66	4638.14	210.82
23	4185.57	602.7	4788.27	208.19
24	4329.66	608.74	4938.4	205.77

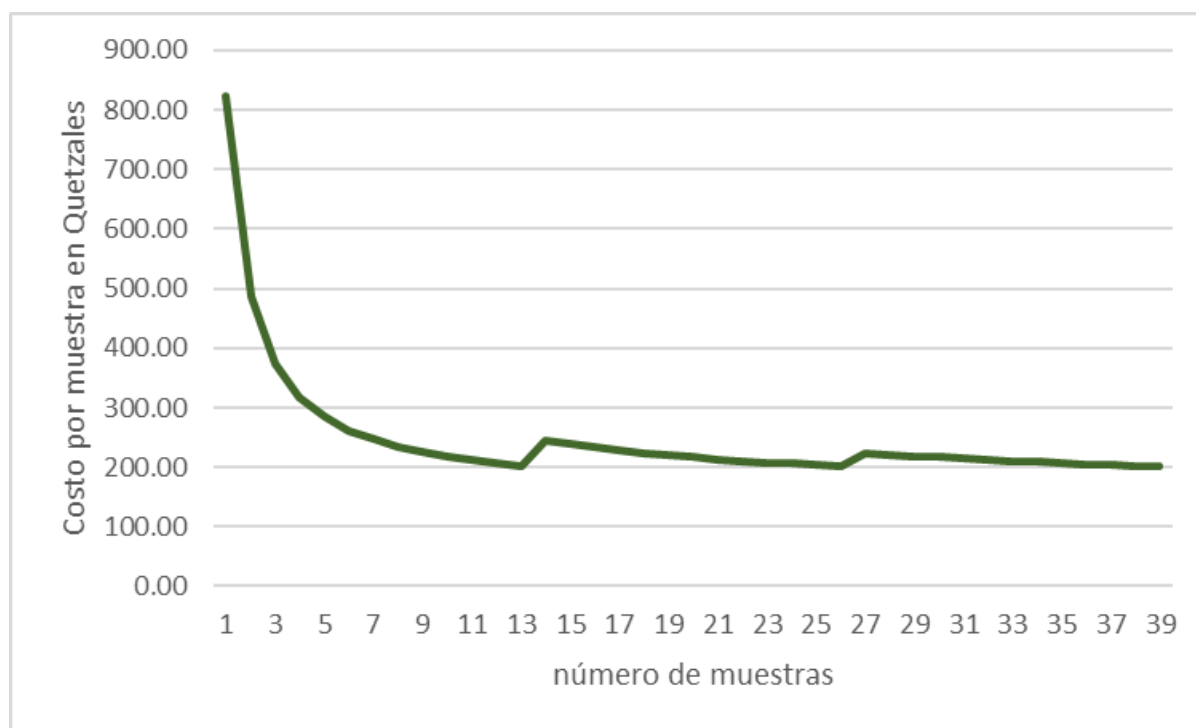
m	T	E	T+E	PPM
25	4473.75	614.78	5088.53	203.54
26	4617.84	620.82	5238.66	201.49
27	5193.04	858.75	6051.79	224.14
28	5337.13	864.79	6201.92	221.50
29	5481.22	870.83	6352.05	219.04
30	5625.31	876.87	6502.18	216.74
31	5769.4	882.91	6652.31	214.59
32	5913.49	888.95	6802.44	212.58
33	6057.58	894.99	6952.57	210.68
34	6201.67	901.03	7102.7	208.90
35	6345.76	907.07	7252.83	207.22
36	6489.85	913.11	7402.96	205.64
37	6633.94	919.15	7553.09	204.14
38	6778.03	925.19	7703.22	202.72
39	6922.12	931.23	7853.35	201.37
40	7497.32	1169.16	8666.48	216.66
41	7641.41	1175.2	8816.61	215.04
42	7785.5	1181.24	8966.74	213.49
43	7929.59	1187.28	9116.87	212.02
44	8073.68	1193.32	9267	210.61
45	8217.77	1199.36	9417.13	209.27
46	8361.86	1205.4	9567.26	207.98
47	8505.95	1211.44	9717.39	206.75

Extrapolando esta tabla se tiene lo siguiente:

m	T	E	T+E	PPM
100	17867.16	2459.12	20326.28	203.26
1000	177294.75	23895.53	201190.28	201.19
10000	1772863.98	238955.3	2011819.28	201.18
100000	17725538.5	2387929.77	20113468.28	201.13

Con los datos provenientes de los cálculos anteriormente mencionados para la obtención del precio por muestras del PCR convencional, se procedió a realizar un diagrama para visualizar los mismos.

Figura 5: Variación de costo por muestra saliva en el PCR convencional en función del número de muestra procesadas por corrida



Se puede observar en la figura que en el eje “Y” se muestra el costo en quetzales por muestra y que en el eje “X” se presenta el número de muestras procesadas.

La Figura 5 permite evidenciar una clara relación entre el número de muestras procesadas con respecto al costo por muestra en el método por PCR convencional. En ella se puede observar una marcada disminución del costo a medida que se incrementa el número de muestras procesadas. Se puede también percibir, que, a partir de procesar 15 muestras, esta disminución se vuelve menos pronunciada, estabilizándose el costo en un valor relativamente constante por arriba de los Q200.00.

VIII. Discusión

La investigación biomédica empleando el PCR convencional en muestras de saliva humana requiere de la elaboración de un marco ético sólido enfocado en la protección y la privacidad de la información genética, donde se captan datos tanto del participante como de sus familiares (Dove et al., 2017). Un elemento esencial es el consentimiento informado que se plasma en un formulario firmado por los participantes (Manson & O'Neill, 2007). Este documento describe el estudio que se va a realizar, detalla riesgos y beneficios de la investigación, así como el manejo adecuado de las muestras para su recolección, procesamiento y almacenamiento (Sun & Reichenberger, 2014).

En este trabajo de graduación se elaboraron PNOs con el objetivo de desarrollar procedimientos estandarizados que permitan la validación a futuro de una prueba diagnóstica por PCR para la detección de genes de resistencias a antibióticos betalactámicos en muestras de saliva, priorizando las normas éticas y de confidencialidad que involucran la manipulación de muestras humanas.

La comunicación precisa y comprensible al paciente sobre la investigación y los resultados propios de la misma, es clave, así como el comunicar las implicaciones psicológicas y sociales que estén relacionadas con el participante (Middleton et al., 2014). El participante debe conocer a detalle y autorizar cualquier procedimiento que involucre a su persona. En el PNO 1.03 se describen las consideraciones mencionadas anteriormente que están relacionadas con el planteamiento de este procedimiento experimental. En la sección de documentos complementarios al PNO, se plasmó la forma en que esta investigación aborda la comunicación con el paciente, en las fichas tituladas: JALS-02: Información para la aceptación del consentimiento informado y JALS-03: Ficha de aceptación del consentimiento del consentimiento informado.

En el abordaje experimental los PNOs son documentos esenciales en la investigación diagnóstico molecular (Burd, 2010), ya que garantizan la calidad, consistencia y reproducibilidad de los resultados. Estos procedimientos aseguran además la uniformidad en la ejecución, independientemente del operador o laboratorio, facilitando la detección de desviaciones y la implementación de medidas correctivas (Burd, 2010). Para garantizar lo antes mencionado, en este proyecto se elaboraron los PNO descritos en la sección de resultados y mencionados a continuación: 1.00 Recolección de muestras de saliva para diagnósticos molecular, 1.01 Extracción de ADN de saliva por medio de distintos métodos, 1.02 Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para detección de genes de resistencia y 1.03 Consentimiento informado. Este conjunto de PNOs describen detalladamente los aspectos tanto técnicos como éticos para realizar el estudio y garantizar la reproducibilidad de los resultados.

En el PNO 1.00 se investigó sobre distintos métodos de extracción, adicional, en el PNO 1.02 se plasmaron los posibles resultados obtenidos al momento de la ejecución experimental, esto con el fin de guiar al experimentador con mayor precisión. Los anterior se describe con mayor detalle a continuación:

En los resultados proyectados para la fase experimental se menciona la utilización de distintos métodos de extracción, ya que considerarlos permite tener una amplia variedad de técnicas, entre las cuales se pueden comparar variables indispensables, tales como el rendimiento de las

reacciones y la calidad del material genético obtenido, por lo tanto, la reproducibilidad del método de detección. Otro aspecto importante, es que esto permite que el experimentador pueda escoger entre los métodos ajuste el presupuesto que esté designado para el proyecto, ya que cada método tiene un costo de ejecución distinto, descrito con mayor precisión en la sección de costos.

En cuanto a la sección de amplificación, la cual permite la detección en las muestras de genes resistentes a antibióticos betalactámicos, en este paso se visualiza la escalera, así como los controles positivos y negativos y la presencia o ausencia del gen de interés. En el control negativo, si se observa la presencia de una banda, esto indicaría contaminación, tal como sucede con la contaminación cruzada entre muestras por ejemplo por la limpieza inadecuada de materiales utilizados en la fase experimental, como las micropipetas, o con la contaminación por la formación de aerosoles, los cuales son generados cuando se abren los tubos o se mezclan muestras que puedan contener material genético y por ende se contaminan otras muestras o bien los controles. (Kwok & Higuchi, 1989). Lo que se espera en este control sería ausencia de la banda de interés, lo que es un determinante de que no existe contaminación en el proceso, siendo esto lo esperado, ya que garantiza el correcto procesamiento de muestras. En cuanto al control positivo, por lo contrario, se espera la aparición de una banda, lo que indicará que los cebadores fueron diseñados correctamente para la detección de las secciones de interés. La ausencia de banda revelaría que los cebadores no fueron realizados adecuadamente durante la amplificación o que hay otros factores que influyeron en la reacción de PCR; un ejemplo de lo anterior sería las bajas o altas concentraciones de los reactivos del master mix, lo cual pueden tener repercusión en la no aparición de banda en el PCR (Bio-Rad, s. f.).

Con lo anterior se puede enfocar la atención en la aparición de bandas en el gel de agarosa en muestras correspondientes a pacientes, lo que indicará la presencia del gen en estudio y por lo tanto la resistencia a antibióticos betalactámicos. Esto se logra siguiendo los pasos del PNO 1.02 para visualizar los resultados de la amplificación por los cebadores *bla*TEM (956pb), *bla*OXA(311pb), *bla*CTX-M(856pb), lo cual se presenta en el Cuadro 4. En caso de que las muestras de saliva presentan el gen de resistencia, demostraría la presencia de bacterias resistentes a antibióticos. En este sentido, las implicaciones en el paciente si solo se detecta uno o más genes de resistencia mencionados, indicaría que él está infectado con una cepa bacteriana resistente a un subconjunto de antibióticos betalactámicos o que presenta bacterias de betalactamasas de espectro extendido. Esto significa que algunas opciones de tratamiento antibiótico seguirán estando disponibles o bien limitaría significativamente las opciones de tratamiento, por lo que en cualquiera de los dos casos se deberían evitar los fármacos a los que el microorganismo es resistente. Producto de lo anterior, serían necesarias pruebas de susceptibilidad antimicrobiana adicionales para identificar los antibióticos más eficaces, incluyendo el determinar si sería necesario considerar el uso de carbapenémicos u otros agentes de reserva (Alós, 2015).

Retomando el aspecto de las limitaciones económicas que tenga el ente investigador, se debe resaltar que, aunque la inversión inicial en equipos sea significativa, este método demuestra ser rentable a largo plazo, especialmente para laboratorios que manejan volúmenes altos de muestras (López-Fabal et al., 2018).

En cuanto a los costos de los métodos de extracción de ADN abordados (ver Figura 4), el método por precipitación salina destaca por sus reactivos económicos y accesibles, siendo el ideal para los laboratorios con recursos limitados, aunque se requiere de mayor tiempo de procesamiento (Riera et al., 2010); el Chelex 100 ofrece un proceso rápido y simple con bajos costos por extracción (Ascencio et al., 2017), particularmente eficiente para grandes volúmenes (García González et al., 2004), aunque puede comprometer la calidad de ADN; mientras que la extracción por columna, a pesar de su mayor costo inicial, proporciona ADN de alta pureza y resultados consistentes (Guevara-Vega et al., 2019), justificando su inversión en aplicaciones que requieren máxima precisión.

La elección del método debe considerar no solo costos directos, sino también el volumen de muestras y la calidad requerida de ADN y los recursos disponibles, además de evaluar la rentabilidad a largo plazo en función de la elaboración de repeticiones y la precisión diagnóstica necesaria (Guevara-Vega et al., 2019).

En materia de costos de la ampliación y la electroforesis en gel de agarosa, se pudo determinar que al trabajar pocas muestras los costos por cada una son altos (Promedio Por Muestra -PPM-), pero que convergen rápidamente a un monto muy próximo a Q200.00 según se ilustra en la Figura 5.

Entendiendo que el poder establecer resultados rápidos y precisos reduce costos hospitalarios y previene tratamientos ineficaces (Teoh, 2022) (González Mendoza et al., 2019), el tener un protocolo para la detección de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos en muestras de saliva por PCR aporta esa rapidez y precisión en la obtención de resultados, lo cual puede incidir en la vigilancia de la resistencia a antibióticos y así proporcionar datos para cambios en las políticas en salud sobre el tema, todo lo cual redundará en beneficio de los pacientes. Además, la fiabilidad del método que se pretende lograr por dicho protocolo está condicionado por parámetros críticos de toda prueba clínica como lo son la sensibilidad y la especificidad, ya que con ello se podrá identificar correctamente tanto los casos positivos como negativos, permitiendo esto tomar decisiones terapéuticas apropiadas y oportunas que impactan directamente en la recuperación del paciente.

IX. Conclusiones

- Se describieron los pasos necesarios para la elaboración de un marco bioético; en el cual se aborda el contenido del expediente que se presenta al comité de ética, el consentimiento informado que se brinda al paciente y la ficha de aceptación. Esto se menciona en el PNO de "Consentimiento informado y requisitos para el manejo de muestras humanas.
- Se elaboraron los PNOs en los cuales se abordan los distintos pasos que hay que cumplir para la elaboración de un análisis por PCR convencional en muestras humanas, estos son: PNO 1.00 "Recolección de muestras de saliva para diagnóstico molecular", PNO 1.01 "Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina", PNO 1.02 "Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes blaTEM, blaOXA y blaCTX-M" y PNO 1.03 "Consentimiento informado y requisitos para el manejo de muestras humanas.
- Se determinó que el método de extracción más barato resulta ser el método por precipitación salina y el más costoso es el QIAamp DNA Mini Kit, además que en los métodos por columna el más barato resulta ser el Quick DNA Miniprep Kit.
- Se realizó un análisis de costos para la elaboración de una PCR convencional, el cual revela que, al incrementar el número de muestras, el costo unitario por muestra se va aproximando a Q200.00.

X. Recomendaciones

- Considerando los avances en las técnicas de detección molecular y la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia se recomienda que los protocolos sean sometidos a revisiones periódicas y actualizaciones frecuentes.
- Se recomienda el análisis de otros genes resistentes a antibióticos betalactámicos, tales como *blaSHV*, *blaVIM*, *blaKPC*, y otros. Esto permitiría una comprensión más completa de los patrones de resistencias presentes en la microbiota bucal y vendría a ayudar a brindar información valiosa para la vigilancia epidemiológica.
- Por último, para optimizar la detección, se recomienda la implementación de técnicas avanzadas de PCR, tales como el PCR en tiempo real (qPCR) y el PCR multiplex. El qPCR podría brindar información cuantitativa sobre la presencia de los genes y además permitirá mejorar la sensibilidad y precisión a los futuros estudios; por su parte el PCR multiplex permitirá mejorar la eficiencia del proceso, ya que en una sola reacción se puede detectar múltiples genes de resistencia y podría impactar el costo del proceso experimental. También se recomienda realizar un análisis comparativo entre los métodos de detección molecular en el cual se evalúa el costo-eficiencia de cada una de estas técnicas.

XI. Referencias bibliográficas

Abajo Iglesias, F. J. de, Feito Grande, L., Júdez Gutiérrez, J., Martín Arribas, M. C., Terracini, B., Pàmols Ros, T., Campos Castelló, J., Martín Uranga, A., Abascal Alonso, M., Herrera Carranza, J., & Sánchez Martínez, M. J. (2008). Directrices éticas sobre la creación y uso de registros con fines de investigación biomédica. *Revista Española de Salud Pública*, 82(1), 21-42.

Agencia Chilena para la Inocuidad y la Calidad Alimentaria. (2018). Manual-POE. <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/08/Manual-POE.pdf>

Aguilar Ramírez, P., Enriquez Valencia, Y., Quiroz Carrillo, C., Valencia Ayala, E., De León Delgado, J., Pareja Cruz, A., & Universidad de San Martín de Porres, Facultad de Medicina Humana, Instituto de Investigación, Centro de Investigación de Infectología e Inmunología. Lima, Perú. (2020). Pruebas diagnósticas para la COVID-19: La importancia del antes y el después. *Horizonte Médico (Lima)*, 20(2), e1231. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2020.v20n2.14>

Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: Una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>

Anderson, A. C., von Ohle, C., Frese, C., Boutin, S., Bridson, C., Schoilew, K., Peikert, S. A., Hellwig, E., Pelz, K., Wittmer, A., Wolff, D., & Al-Ahmad, A. (2023). The oral microbiota is a reservoir for antimicrobial resistance: Resistome and phenotypic resistance characteristics of oral biofilm in health, caries, and periodontitis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 22(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00585-z>

Arriaga Deza, E. V. (2019). El consentimiento informado para el manejo de muestras biológicas por personal de laboratorio clínico de un hospital de la región Lambayeque—2018. <http://tesis.usat.edu.pe/handle/20.500.12423/2421>

Ascencio, M., Jacobsen, M. O., Schnittger, L., & Rodriguez, A. E. (2017). Aplicación de un método de extracción de ADN a partir de sangre canina sensible y de bajo costo para el diagnóstico molecular de *Leishmania* sp. <https://doi.org/10.34073/15>

Banco ADN. (s. f.). Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN. Recuperado 26 de febrero de 2024, de <https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>

Bhattacharya, D., Parai, D., Rout, U. K., Nanda, R. R., Kanungo, S., Dash, G. C., Palo, S. K., Giri, S., Choudhary, H. R., Kshatri, J. S., Turuk, J., Mishra, B. K., Dash, S., & Pati, S. (2020). *Saliva as a potential clinical specimen for diagnosis of SARS-CoV-2* (p. 2020.09.11.20192591). medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.09.11.20192591>

Bio-Rad. (s. f.). PCR Troubleshooting | Bio-Rad. Recuperado 21 de noviembre de 2024, de <https://www.bio-rad.com/es-gt/applications-technologies/pcr-troubleshooting?ID=LUSO3HC4S>

Bridson, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). *PCR inhibitors – occurrence, properties and removal—Schrader—2012—Journal of Applied Microbiology—Wiley Online Library*. Recuperado 26 de febrero de 2024, de <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>

Burd, E. M. (2010). Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 550-576. <https://doi.org/10.1128/CMR.00074-09>

Bush, K., & Fisher, J. F. (2011). Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 455-478. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102911>

Cabrera, S. (2009). Uso racional y responsable de antimicrobianos. *Archivos de Medicina Interna*, 31(2-3), 74-80.

Cantín, M. (2018). World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human subjects. Reviewing the Latest Version. *International Journal of Medical and Surgical Sciences*, 1, 339-346. <https://doi.org/10.32457/ijmss.2014.042>

Cantón, R., & Gómez G. de la Pedrosa, E. (2017). Impacto económico de los métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica: Precio de la prueba o impacto clínico global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(10), 659-666. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.09.005>

Casellas, J. M. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: Consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica*.

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)

Cuaical Ramos, N. M., Delgado Borrero, Y. A., Anzola, Y. M., Marcano Zamora, D., & Torres, L. C. (2012). Detección de carbapenemasas tipo OXA en aislados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(2), 95-110.

Diz Mellado, O. M., & N Punto. (2020). TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. *TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS*, 100(100), 1-100.

Dove, E. S., Kelly, S. E., Lucivero, F., Machirori, M., Dheensa, S., & Prainsack, B. (2017). Beyond individualism: Is there a place for relational autonomy in clinical practice and research? *Clinical Ethics*, 12(3), 150-165. <https://doi.org/10.1177/1477750917704156>

Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160-201. <https://doi.org/10.1128/cmr.00037-09>

Fariña, N. (2016). Resistencia bacteriana: Un problema de salud pública mundial de difícil solución. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(1), 04-05. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(01\)04-005](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)04-005)

Fluit, A. C., Visser, M. R., & Schmitz, F.-J. (s. f.). *Molecular Detection of Antimicrobial Resistance | Clinical Microbiology Reviews*. Recuperado 26 de febrero de 2024, de <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/cmr.14.4.836-871.2001>

Fuchs, L. Y., Conde, L. C., González, V. M., Noguez, A. H., Calderón, E., Avonce, N., & Ovando, C. (1994). Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*,

36(4), Article 4.

García, M. H., Valdez, C. A., & Porta, T. V. (2019). Detección de los genes de β -lactamasas *bla*TEM, *bla*SHV y *bla*CTX-M en aislamientos de *Escherichia coli* comunitarios. *Revista Científica*, 28(2), 41-53. <https://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.v28i2.56>

García González, L. A., Rodrigo Tapia, J. P., Sánchez Lazo, P., Ramos, S., & Suárez Nieto, C. (2004). Extracción de ADN con resina chelex en el análisis de la amplificación oncogénica en carcinomas de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 55(3), 139-144. [https://doi.org/10.1016/S0001-6519\(04\)78497-6](https://doi.org/10.1016/S0001-6519(04)78497-6)

Gil, D. C. L. (s. f.). *CIENCIAS NUTRICIONALES*.

Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Rayo Morfín-Otero, M. del, Torres-López, F. J., Alcántar-Curiel, M. D., Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Rayo Morfín-Otero, M. del, Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de México*, 156(2), 172-180. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>

González Mendoza, J., Maguiña Vargas, C., & González Ponce, F. de M. (2019). La resistencia a los antibióticos: Un problema muy serio. *Acta Médica Peruana*, 36(2), 145-151.

González, N. E., Zapata, A. C., Sánchez-Henao, D. F., Chávez-Vivas, M., González, N. E., Zapata, A. C., Sánchez-Henao, D. F., & Chávez-Vivas, M. (2020). Resistencia a antibióticos β -lactámicos y eritromicina en bacterias de la cavidad oral. *Nova*, 18(34), 27-45. <https://doi.org/10.22490/24629448.3928>

Guevara-Vega, M., Vertel-Morinson, M., Paternina, L. E., Guevara-Vega, & Paternina, L. E. (2019). Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de garrapatas duras (Acari: Ixodidae). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(1).

Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nri3785>

Hawkey, P. M. (2009.). Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *British Journal of Pharmacology—Wiley Online Library*. Recuperado 26 de febrero de 2024, de <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/sj.bjp.0707632>

Holt, S. C., & Ebersole, J. L. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000*, 38(1), 72-122. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x>

HRP-090-SOP-Informed Consent Process for Research (1).docx. (s. f.).

Iakhno, S. (2016). *Antibiotic resistance in healthcare settings. Prevalence and levels of tet(M) resistance gene in saliva of dental students* [Master thesis, UiT Norges arktiske universitet]. <https://munin.uit.no/handle/10037/15501>

Ireland, M. M. (s.f.). SOP 2.6 Saliva Collection. Tomado de: <file:///C:/Users/HP/Downloads/SOP%202.06%20Saliva%20Collection.pdf>

Jolley, K. A., & Maiden, M. C. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 595. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>

Küchler, E. C., Tannure, P. N., Falagan-Lotsch, P., Lopes, T. S., Granjeiro, J. M., & Amorim, L. M. F. (2012). Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *Journal of Applied Oral*

Science, 20, 467-471. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000400013>

Kwok, S., & Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339(6221), 237-238. <https://doi.org/10.1038/339237a0>

Laboratorio Nacional de Salud. (2022). Boletín RAM 2022 – Resistencia Antimicrobiana en patógenos prioritarios aislados en hemocultivos y urocultivos provenientes de la Red Nacional de Servicios de Salud. Guatemala 2022 por parte del Laboratorio Nacional de Salud. – Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala. <https://cofaqui.com.gt/boletin-ram-2022-resistencia-antimicrobiana-en-patogenos-prioritarios-aislados-en-hemocultivos-y-urocultivos-provenientes-de-la-red-nacional-de-servicios-de-salud-guatemala-2022/>

Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, 50(4), 353-380. <https://doi.org/10.1128/mr.50.4.353-380.1986>

Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., & Silva Lopes, T. da. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: Extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e investigación agraria*, 35(1), 77-86. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202008000100008>

López Henríquez, C. (2004). Comparación de PCR de tiempo real y el cultivo bacteriológico, en la detección de *Salmonella typhimurium* desde pollos. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/132204>

López-Fabal, M. F., Gómez-Garcés, J. L., Lomba, M. L., & Bastián, M. R. (2018). Valoración de una técnica de PCR-múltiple en el diagnóstico rápido de la bacteriemia. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(3), 263.

Luis, S. H. J., Israel, P. O., Consuelo, H. S., Lilia, P. V., Alicia, C. L., Dina, V. G., Briceida, L. M., & Mónica, V. G. (2018). Evaluación de una prueba de PCR múltiple para la identificación del ADN bacteriano y fúngico en el diagnóstico de sepsis neonatal.

Manson, N. C., & O'Neill, O. (2007). *Rethinking Informed Consent in Bioethics*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511814600>

March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 182-188. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005>

Martin N, G. (2002). Resistencia Bacteriana a β -lactámicos: Evolución y Mecanismos. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 21(1), 107-116.

Mauro, S., Verga, F., Galiana, A., Vieytes, M., Godino, M., & Barbato, M. (2022). Utilidad del panel de PCR multiplex en el diagnóstico microbiológico temprano y adecuación antimicrobiana en pacientes críticos con neumonía. *Revista Médica del Uruguay*, 38(2). <https://doi.org/10.29193/rmu.38.2.3>

Melián-Rivas, A., Calcumil-Herrera, P., Boin-Bakit, C., & Carrasco-Soto, R. (2020). Detección de COVID -19 (SARS-CoV-2) Mediante la Saliva: Una Alternativa Diagnóstica poco Invasiva. *International journal of odontostomatology*, 14(3), 316-320. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2020000300316>

Método: Gel de electroforesis Agarosa. (2017, 26 octubre). Conogasi. <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>

Mellado, O. M. D. (2020). 5. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Middleton, A., Patch, C., Wiggins, J., Barnes, K., Crawford, G., Benjamin, C., Bruce, A.,

& Association of Genetic Nurses and Counsellors in United Kingdom and Ireland. (2014). Position statement on opportunistic genomic screening from the Association of Genetic Nurses and Counsellors (UK and Ireland). *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 22(8), 955-956. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.301>

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (2023). *Alerta-epid-pseudomonas-cir-no.001-23 (2).pdf*.

Moreno M, C., González E, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69(2), 185-192. <https://doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>

MSPAS. (s. f.). Catálogo de Trámites | Certificado de Registro de Organización de Investigación por Contrato, Organización de Manejo de Sitio, Sitio de Investigación, Comité de Ética en Investigación -DRCPFA-. Recuperado 13 de octubre de 2024, de <https://www.tramites.gob.gt/servicio/3183/index.html>

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>

Nambisan, P. (2017). Laboratory Biosafety and Good Laboratory Practices. An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology, 253. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809231-6.00011-9>

Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10), 1791-1798. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>

Olsen, I. (2008). Update on bacteraemia related to dental procedures. *Transfusion and Apheresis Science*, 39(2), 173-178. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2008.06.008>

OMS. (2022, diciembre 9). Un informe pone de relieve el aumento de la resistencia a los antibióticos en infecciones bacterianas que afectan al ser humano y la necesidad de mejorar los datos al respecto. <https://www.who.int/es/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data>

OMS. (2000).16-4: Procedimientos Operativos Estándar (POE). https://extranet.who.int/lqsi/sites/default/files/attachedfiles/LQMS%2016-4%20SOPs_0.pdf?form=MG0AV3

Ortega-Peña, S., & Hernández-Zamora, E. (2018). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 75(2). [https://doi.org/Luis, S. H. J., Israel, P. O., Consuelo, H. S., Lilia, P. V., Alicia, C. L., Dina, V. G., Briceida, L. M., & Mónica, V. G. \(2018\). Evaluación de una prueba de PCR múltiple para la identificación del ADN bacteriano y fúngico en el diagnóstico de sepsis neonatal.10.24875/BMHIM.M18000012](https://doi.org/Luis, S. H. J., Israel, P. O., Consuelo, H. S., Lilia, P. V., Alicia, C. L., Dina, V. G., Briceida, L. M., & Mónica, V. G. (2018). Evaluación de una prueba de PCR múltiple para la identificación del ADN bacteriano y fúngico en el diagnóstico de sepsis neonatal.10.24875/BMHIM.M18000012)

Park, S., Rana, A., Sung, W., & Munir, M. (2021). Competitiveness of Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) Technologies, with a Particular Focus on Detection of Antibiotic Resistance Genes (ARGs). *Applied Microbiology*, 1(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1030028>

Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). *Extended-Spectrum β -Lactamases: A Clinical Update | Clinical Microbiology Reviews*. Recuperado 26 de febrero de 2024, de <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/cmr.18.4.657-686.2005>

Pérez, C. O., Rivera, N. R., Sandoval López, X., & Hernández Ávila, C. E. (2021). Muestra

de saliva para diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR en población ambulatoria. Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud, 4(2), 38-45. <https://doi.org/10.5377/alerta.v4i2.11476>

PNDH. (2021, mayo 26). Panorama nacional: Desarrollo humano en Guatemala. PNUD. <https://indhguatemala.org/panorama-nacional-desarrollo-humano-en-guatemala/>

Popejoy, A. B., & Fullerton, S. M. (2016). Genomics is failing on diversity. *Nature*, 538(7624), 161-164. <https://doi.org/10.1038/538161a>

Prieto, Y. O. (2008). Buenas Prácticas de Laboratorio y las normas ISO 9001:2000.

Protocolo de la PCR convencional. (s. f.). Recuperado 31 de julio de 2024, de https://www.sigmaaldrich.com/GT/es/technical-documents/protocol/genomics/pcr/standard-pcr?srsltid=AfmBOopnSWjUf0RksK9G_n3w31cBkzMvFgoq5digBzt76O5sD6PTOIxt

QA19s Isolation of genomic DNA from saliva and mouthwash using the QIAamp DNA Blood Mini Kit spin (1).pdf. (s. f.).

Quick-DNA MiniPrep. (s. f.). Zymo Research International. <https://zymoresearch.eu/products/quick-dna-miniprep?srsltid=AfmBOoqOWJ031dzLZo6X1HeFIL9y7I6W-ZXynrDGjBlj4EMd5AwAyjE->

Ready, D., Lancaster, H., Qureshi, F., Bedi, R., Mullany, P., & Wilson, M. (2004). *Effect of Amoxicillin Use on Oral Microbiota in Young Children | Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Recuperado 26 de febrero de 2024, de <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.48.8.2883-2887.2004>

Riera, M. A., Rojas, M. E., & Zapata, P. D. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 14, 4-7.

Robles Raya, P., Javierre Miranda, A. P., Moreno Millán, N., Mas Casals, A., de Frutos Echániz, E., & Morató Agustí, M. L. (2017). Manejo de las infecciones odontogénicas en las consultas de atención primaria: ¿antibiótico? *Atención Primaria*, 49(10), 611-618. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2017.05.003>

Rodriguez, M. J. (2022). Resistencia antibiótica y cavidad oral. *Odontología Vital*, 2(37), Article 37. <https://doi.org/10.59334/ROV.v1i37.527>

Rodriguez-Núñez, A., Cisneros-Cabello, R., Velasco-Ortega, E., Llamas-Carreras, J. M., Tórres-Lagares, D., & Segura-Egea, J. J. (2009). Antibiotic Use by Members of the Spanish Endodontic Society. *Journal of Endodontics*, 35(9), 1198-1203. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.05.031>

Saliva DNA Isolation Kit | Norgen Biotek Corp. (s. f.). <https://norgenbiotek.com/product/saliva-dna-isolation-kit>

Salgado-Peralvo, Á.-O., Sanz-Esporrín, J., Mateos-Moreno, M.-V., Haidar-Wehbe, A., Blanco-Carrión, A., Velasco-Ortega, E., Salgado-Peralvo, Á.-O., Sanz-Esporrín, J., Mateos-Moreno, M.-V., Haidar-Wehbe, A., Blanco-Carrión, A., & Velasco-Ortega, E. (2019). Profilaxis antibiótica en implantología oral. Revisión crítica de la literatura. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 41(2), 80-90. <https://doi.org/10.20986/recom.2019.1011/2018>

Sancho, C., Jiménez, E. J., Molina, R., & Umaña, R. (2022). Incubación, pre-lisis y post-purificación en el rendimiento y pureza de ácidos nucleicos extraídos de sangre de cabras domésticas contenida en tarjetas FTA. Recuperado 26 de febrero de 2024, de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242022000100311&script=sci_arttext

Schmieder, R., & Edwards, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiology*, 7(1), 73-89. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.135>

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

Schuurman, T., de Boer, R. F., Kooistra-Smid, A. M. D., & van Zwet, A. A. (2004). Prospective Study of Use of PCR Amplification and Sequencing of 16S Ribosomal DNA from Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Bacterial Meningitis in a Clinical Setting. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 734-740. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.2.734-740.2004>

Smith, M. (2021). Validating Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays. *Encyclopedia of Virology*, 35-44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00053-9>

Software, K. (2024, febrero 23). Procedimientos Operativos Estándar (POE): Una guía para la estandarización de procesos en diferentes departamentos. *Kantan Software*. <https://www.kantansoftware.com/blog/procedimientos-operativos-estandar-poe-una-guia-para-la-estandarizacion-de-procesos-en-diferentes-departamentos/>

Sun, F., & Reichenberger, E. J. (2014). Saliva as a source of genomic DNA for genetic studies: Review of current methods and applications. *Oral Health and Dental Management*, 13(2), 217-222.

Sweet-Cordero, A., & Santos-Preciado, J. I. (1997). Avances en el diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 133(1).

Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives. *Journal of Dental Research*, 90(3), 294-303. <https://doi.org/10.1177/0022034510379602>

Teoh, T. K. (2022). The role and impact of molecular diagnostics in modern clinical microbiology [Thesis, University of Limerick]. <https://doi.org/10.34961/researchrepository-ul.21581841.v1>

UMECIT, mercadeo. (2022, julio 15). El Comité de Bioética de la Investigación de la UMECIT. Umecit - Universidad en Panamá. <https://blog.umecit.edu.pa/el-comite-de-bioetica-de-la-investigacion-de-la-umecit/>

UVG. (2014). Reglamento.pdf. <https://res.cloudinary.com/webuvg/image/upload/v1548974627/WEB/comite-de-etica/reglamento.pdf>

Urquiza Ayala, G., Arce Chuquimia, J., & Alanoca Mamani, G. (2018). RESISTENCIA BACTERIANA POR BETA LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO: UN PROBLEMA CRECIENTE. *Revista Médica La Paz*, 24(2), 77-83.

Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), 151-159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>

Van Belkum, A., & Dunne, W. M. (2020). Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(7), 2018-2024. <https://doi.org/10.1128/jcm.00313-13>

Vohra, M., Babariya, M., Parmar, J. S., Kamath, N., Warghane, A., & Zala, D. (2023). Integration of phenotypic, qPCR and genome sequencing methodologies for the detection of antimicrobial resistance and virulence in clinical isolates of a tertiary hospital, India. *3 Biotech*, 13(11), 368. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03797-4>

Wigand, J., Tansirichaiya, S., Winje, E., & Al-Haroni, M. (2021). Functional screening of a human saliva metagenomic DNA reveal novel resistance genes against sodium hypochlorite and chlorhexidine. *BMC Oral Health*, 21(1), 632. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-02000-5>

Wilson, W., Taubert, K. A., Gewitz, M., Lockhart, P. B., Baddour, L. M., Levison, M., Bolger, A., Cabell, C. H., Takahashi, M., Baltimore, R. S., Newburger, J. W., Strom, B. L., Tani, L. Y., Gerber, M., Bonow, R. O., Pallasch, T., Shulman, S. T., Rowley, A. H., Burns, J. C., ... null, null. (2007). Prevention of Infective Endocarditis. *Circulation*, *116*(15), 1736-1754. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.183095>

Yang, S., & Rothman, R. E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*, *4*(6), 337-348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01044-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01044-8)

Yerena, C. E., & Ramirez, J. (2018). Guia-de-Biologia-Molecular-Aplicada.pdf. <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Guia-de-Biologia-Molecular-Aplicada.pdf>

Zarco, M., Vess, T., & Ginsburg, G. (2012). The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Diseases*, *18*(2), 109-120. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x>

Zhang, A., Sun, H., Wang, P., & Wang, X. (2013). Salivary proteomics in biomedical research. *Clinica Chimica Acta*, *415*, 261-265. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.11.001>

XII. Anexo: PNO

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.00 Versión:1 Fecha: 2024
Recolección de muestras de saliva para diagnóstico molecular	Páginas totales: 2 Autorizado: Preparado por: José Lemus

1) Propósito

Obtener muestras de 3 mL de saliva de manera efectiva, con capacidad de ser trabajadas mediante biología molecular.

2) Aplicación

Recolección de muestras para extracción de ADN y posterior detección de genes de resistencia a antibióticos. Este es un método no invasivo y no va a perjudicar al paciente.

3) Referencias

- Gil, D. C. L. (s. f.). CIENCIAS NUTRICIONALES
- Ireland, M. M. (s.f.). SOP 2.6 Saliva Collection. Tomado de: <file:///C:/Users/HP/Downloads/SOP%202.06%20Saliva%20Collection.pdf>
- Küchler, E. C., Tannure, P. N., Falagan-Lotsch, P., Lopes, T. S., Granjeiro, J. M., & Amorim, L. M. F. (2012). Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *Journal of Applied Oral Science*, 20, 467-471. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000400013>

4) Terminología y abreviaturas

ADN Ácido Desoxirribonucleico
SOP Protocolo operativo estándar
mL: mililitro
°C: grados Celsius

5) Principio

Recolección de muestras de saliva destinadas a análisis de biología molecular. El seguimiento detallado de este PNO permite obtener una muestra para el procedimiento que se aplicará.

6) Documentos asociados

PNO 1.01 Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, QIAamp Mini Kit y el método de precipitación salina.

7) Seguridad

Seguir las buenas prácticas de seguridad (ver JALS-01: Seguridad para las buenas prácticas de laboratorio)

8) Equipos, materiales y reactivos

A) Equipos

Congelador a -20°C

B) Materiales

Tubo de 10mL

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.00 Versión:1 Fecha: 2024
Recolección de muestras de saliva para diagnóstico molecular	Páginas totales: 2 Autorizado: Preparado por: José Lemus

Agua esterilizada

Hielera

Hielo

Pipeta Pasteur de plástico

Micropipeta P1000

Puntas para micropipeta

C) Reactivos

Solución salina (Agua destilada con sal)

9) Procedimiento

1. Verificar que se haya cumplido el procedimiento de consentimiento informado y requisito para el manejo de muestras (ver JALS-02: Información para la aceptación del consentimiento informado) y que se tenga la hoja de consentimiento firmada (ver JALS-03: Ficha de aceptación del consentimiento informado).
2. Presentarse con el paciente.
3. Explicar el procedimiento de recolección de saliva al paciente.
4. Verificar que el participante no haya ingerido alimentos, ni bebidas, ni haber masticado chicle ni fumado en un periodo de 30 minutos antes de la toma de muestra (aplica para la extracción con Chelex y por método de columna).

Nota: Para la precipitación salina, en vez de 30 minutos es 1 hora.

5. Rotular el tubo de recolección de saliva con el código de identificación de la muestra que se encuentra en. ANEXO: Documentos complementarios a los PNO JALS-04: Codificación de muestras
6. Pedir al paciente que se enjuague la boca con agua estéril durante 10 segundos y que luego la expulse en un recipiente de descartes (Aplica a métodos de extracción por Chelex, Norgen y QIAamp Kits).

Nota:

- a. Para la precipitación salina, enjuagar con 10mL de una solución salina por 60 segundos y regresar la solución a un tubo cónico de 15mL.
 - b. Para Quick DNA Miniprep Kit, enjuagar con 10mL de una solución salina por 30 segundos y regresar solución a un tubo cónico de 15mL.
7. Pedir que escupa saliva en un tubo cónico de 15mL hasta tener 3mL de saliva
 - a. En el caso del método por Chelex 100, el investigador tiene que añadir 1mL de la muestra en un tubo falcon de 50mL usando pipeta Pasteur para transferir saliva.
 - b. Para el QIAamp DNA Mini Kit, el investigador tiene que agregar 1 mL de saliva en un tubo falcon de 50mL usando pipeta Pasteur para transferir saliva

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.00 Versión:1 Fecha: 2024
Recolección de muestras de saliva para diagnóstico molecular	Páginas totales: 2 Autorizado: Preparado por: José Lemus

- c. Para el Norgen Saliva DNA Isolation Kit, pasar 250µL de saliva a un microtubo de microcentrífuga estéril

Nota: Este paso se aplica exclusivamente para los métodos de QIAamp DNA Mini Kit, Chelex 100 y Norgen Saliva DNA Isolation Kit

8. Tapar el tubo que contiene la muestra.
9. Almacenar y transportar muestras de saliva a laboratorio (ver JALS-05: Almacenamiento y transporte de muestras de saliva)

10) Cálculos

No aplica

11) Control de calidad

Verificar que los frascos en los que se colectaron las muestras sean estériles

También para evitar alguna contaminación de la muestra se aplican las buenas prácticas de laboratorio como el correcto lavado de manos, que el área de trabajo esté limpia, que los equipos estén limpios, etc. (ver JALS-01: Seguridad para las buenas prácticas de laboratorio).

12) Reportes de datos y documentos utilizados

Registrar datos sobre el paciente y su número de identificación/codificación que se le asigna a la muestra de saliva del paciente en un documento tipo Excel (ver JALS-04: Codificación de muestras sección a).

Esta información se asociará con el CUI del paciente y se tabular de la forma siguiente:

Cuadro no. 1: Recolección de muestras de saliva

CODIGO	CUI	Nombre Completo	Tomador de Muestra
----	-----	-----	-----
240805025	1677672591604	John Doe	Dr. Brown
240805026	1034867390123	Dave Miller	Nurse White
----	----	----	---
240908001	3216549870123	Alex Rodriguez	Technician Green
240908002	1348022114823	Jessica Parker	Dr. Black
240805026	1234567890123	Jane Smith	Technician Blue
----	-----	-----	-----

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

1) Propósito

Brindar un procedimiento detallado de la extracción de ADN, mediante distintos métodos, entre ellos Chelex 100, por columna y por precipitación salina.

2) Aplicación

Tiene como fin ser empleado en la investigación para la extracción de ADN de saliva para luego analizarlo para diagnóstico molecular y detectar genes de resistencia a antibióticos betalactámicos. A ello se aplican 3 distintos métodos de extracción en los cuales el investigador puede seleccionar según sus necesidades y según la calidad del material genómico obtenido.

La diferencia entre los métodos radica en que el método por columna es la técnica más costosa y eficiente para la extracción de ADN en muestras de saliva, ya que tiene protocolos para uso en saliva. El método por Chelex 100 es ampliamente usado en ciencias forenses, debido a que puede extraer ADN de distintas muestras, es rápido la obtención de resultados y costo es menor al del método por columna. Por último, el método por precipitación salina puede emplearse en distintas muestras y tiene un costo bajo.

3) Referencias

- QA19s Isolation of genomic DNA from saliva and mouthwash using the QIAamp DNA Blood Mini Kit spin (1).pdf. (s. f.).
- Yerena, C. E., & Ramirez, J. (2018). Guia-de-Biologia-Molecular-Aplicada.pdf. <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Guia-de-Biologia-Molecular-Aplicada.pdf>
- Küchler, E. C., Tannure, P. N., Falagan-Lotsch, P., Lopes, T. S., Granjeiro, J. M., & Amorim, L. M. F. (2012). Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *Journal of Applied Oral Science*, 20, 467-471. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000400013>
- Banco ADN. (s. f.). Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN. Recuperado 26 de febrero de 2024, de <https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- Saliva DNA Isolation Kit | Norgen Biotek Corp. (s. f.). <https://norgenbiotek.com/product/saliva-dna-isolation-kit>
- Quick-DNA MiniPrep. (s. f.). Zymo Research International. <https://zymoresearch.eu/products/quick-dna-miniprep?srsId=AfmBOoqOWJo31dzLZo6X1HeFIL9y7I6W-ZXynrDGjBlj4EMd5AwAyjE->

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

4) Terminología y abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

mL: mililitros

Tris-HCl: Clorhidrato de tris (hidroximetil) metilamina

mM: milimolar

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos

SDS: Sulfato Dodecyl de Sodio

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

μL: microlitro

°C: grados Celsius

rpm: revoluciones por minuto

g: fuerzas g

5) Principio

El método por Chelex 100, emplea resinas queladoras que permiten lisis de las células y proteger el ADN de la degradación (Yerena & Ramirez, 2018). El método por columna radica en la implementación de una columna de sílice, que permite unión selectiva de ADN por las sales catiónicas, luego prosigue realizar lavados y diluciones (QA19s Isolation of genomic DNA from saliva and mouthwash using the QIAamp DNA Blood Mini Kit spin (1).pdf, s. f.).

Por último, el método por precipitación salina se basa en las distintas solubilidades de ADN y proteínas en soluciones concentradas, la cual está precipitando las proteínas con sal y luego el ADN con alcohol (Küchler et al., 2012)

6) Documentos asociados

PNO 1.00 Recolección de muestras de saliva para diagnóstico molecular

PNO 1.03 Consentimiento informado y requisito para el manejo de muestras

7) Seguridad

Seguir las buenas prácticas de seguridad (ver JALS-01: Seguridad para las buenas prácticas de laboratorio)

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

8) Equipos, materiales y reactivos

Chelex100

A) Equipos

Parrilla

Baño de agua con control de temperatura o estufa

Centrífuga

Microcentrífuga

Vortex

Micropipeta P1000, P100 y P10

Congelador a -20°C

B) Materiales

Recipientes herméticos de boca ancha

Vaso de precipitado

Tubos de 1.5mL estériles

Gradillas para tubos 1.5mL

Puntas para micropipetas de 1000 μ L, 100 μ L y 10 μ L

C) Reactivos

Etanol absoluto

Chelex al 10 %

Proteinasa K (20 mg/ml)

Isopropanol absoluto

Etanol al 70 %

Solución amortiguadora TE

Agua desionizada (MiliQ)

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

Buffer de lisis (50 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, sacarosa 50 mM, NaCl 100 mM, SDS al 1%)

QIAamp DNA Mini Kit

A) Equipos

Gradilla

Centrífuga

Vortex

Columna de centrifugación QIAamp

Tubos de recolección de 2mL

Incubadora

Micropipetas P1000, P100 y P10

Microcentrífuga

Pipeta Pasteur de plástico

B) Materiales

Tubo de 50mL

Tubo de microcentrífuga de 1.5mL

Puntas para micropipetas de 1000 μ L, 100 μ L y 10 μ L

C) Reactivos

Buffer AL

Proteasa QIAGEN

Etanol (96-100%)

Buffer AW1

Buffer AW2

Buffer AE

PBS

Norgen Saliva DNA Isolation Kit

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

A) Equipos

Microcentrifugadora

Incubadora

Vortex

B) Materiales

Tubo cónico

Tubos de microcentrífuga estériles

Micropipetas P1000 y P100

Tubos de microcentrifugas estériles

Columnas de centrifugación

Tubos de recolección

Tubos de elución

Puntas de 1000 μ L y 100 μ L

C) Reactivos:

Buffer de Lisis F

Proteinasa K en buffer de almacenamiento

Buffer de unión B

Solución de lavado A

Buffer de elución B

Etanol 100%

Isopropanol

Quick-DNA™ Miniprep Kit:

A) Equipos

Microcentrífuga

Vortex

Columna Zymo-Spin™ IICR

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

Centrífuga

B) Materiales

Tubos de microcentrífuga

Tubos de recolección

Tubos de 50 mL

Micropipetas P1000 y P100

Puntas de 1000 μ L y 100 μ L

C) Reactivos

Buffer de lisis genómica

Buffer de prelavado de ADN durante la purificación del ADN.

Buffer de lavado de g-ADN

Buffer de elución de ADN

Beta-mercaptoethanol

Solución salina

Precipitación salina:

A) Equipos

Centrífuga

Vortex

Micropipetas P1000

B) Materiales

Puntas para micropipetas de 1000 μ L

Tubos de microcentrífuga

C) Reactivos

Buffer de lisis (50 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, sacarosa 50 mM, NaCl 100 mM, SDS al 1%)

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

Acetato de amonio (10M)

Buffer TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 1 mM)

Etanol absoluto

Etanol al 70%

9) Procedimiento

Previamente rotular los tubos (ver JALS-01: Seguridad para las buenas prácticas de laboratorio sección b)

Chelex 100:

1. Agregar 500µL buffer de lisis a lo que se extrajo de saliva para este procedimiento (ver JALS-06: Preparación de reactivos para extracción de ADN. Sección 4)
2. Agregar 1mL de etanol al 100%, mezclar y transferir la mezcla a un tubo Eppendorf de 1.5mL.
3. Centrifugar la mezcla a 14,000 rpm durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante.
4. Añadir 200 µL de Chelex al 10% (ver JALS-06: Preparación de reactivos para extracción de ADN. sección 1), asegurando que cubran el pellet
5. Añadir 2 µL de proteinasa K a la mezcla y agitar en vortex.
6. Luego incubar lo anterior a 56°C por 30 minutos.
7. Agitar mediante el vortex y centrifugar a 14,000 rpm durante 3 minutos.
8. Luego de haber pasado el tiempo, incubar en agua hirviendo por 8 minutos y centrifugar nuevamente.
9. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, añadir 300 µL de isopropanol frío. Mezclar lo anterior e incubar a -20°C por 1 hora.
10. Centrifugar el tubo por 20 minutos a 13,000 rpm a una temperatura de 4°C. Desechar el sobrenadante y lavar con etanol al 70% (ver JALS-06: Preparación de reactivos para extracción de ADN sección. 2) dos veces, centrifugando 5 minutos a 13,000 rpm en cada lavado.
11. Secar pellet y resuspender en 100-300 µL de solución amortiguadora TE (ver JALS-06: Preparación de reactivos para extracción de ADN sección 3), incubándolo a 37°C.
12. Medir concentración de ADN en el Nanodrop (ver JALS-08: Uso del Nanodrop)

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

13. Almacenar ADN (ver JALS-07: Almacenamiento de muestras de ADN)

QIAamp DNA Mini Kit:

1. Transferir 1 mL de saliva a un tubo falcon de 50mL
2. Añadir 4 mL de PBS a la muestra recolectada y centrifugar a 1,800 g por 5 minutos.
3. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 180µL de PBS
4. Agregar 20µL de QIAGEN Proteasa, también añadir 200µL de Buffer AL y mezclar inmediatamente por 15 segundos.
5. Incubar la mezcla a 56°C por 10 minutos.
6. Agregar al lisado 200 µL de etanol al 96-100% y mezclarlo en el vortex.
7. Colocar una columna de centrifugación QIAamp en tubos de recolección de 2 mL
8. Añadir a ello la mezcla del paso seis, para luego centrifugar a 6,000 g durante 1 minuto.
9. Para los lavados, agregar 500 µL de Buffer AW1 a la columna y centrifugar 6000 g por 1 minuto.
10. Luego colocar la columna en un tubo recolector de 2 mL y desechar el filtrado
11. Añadir 500 µL de Buffer AW2 y centrifugar a máxima velocidad por 3 minutos.
12. Para la elución de ADN, se requiere colocar una columna de centrifugación QIAamp en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y desechar el tubo de recolección.
13. Seguido de lo anterior, se necesita abrir la columna y eluir el ADN con 150 µL de Buffer AE, incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugar a 6000 g durante 1 minuto.
14. Realizar una segunda elución utilizando el primer eluido, para obtener una mayor concentración de ADN.
15. Medir concentración de ADN en el Nanodrop (ver JALS-08: Uso del Nanodrop)
16. Almacenar ADN (ver JALS-07: Almacenamiento de muestras de ADN)

Norgen Saliva DNA Isolation Kit

1. Añadir 250µL de Buffer de Lisis F a lo que se de saliva para este procedimiento y mezclar en el vortex

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

2. Agregar 20µL de Proteinasa K (vortex antes de usar) y mezclar
3. Incubar a 55°C por 10 minutos
4. Pasado el tiempo, adicionar 200µL de Buffer de unión B, mezclar e incubar a la misma temperatura anterior por 5 minutos y 44 segundos.
5. Por otro lado, armar columna con uno de los tubos de recolección
6. En la columna, añadir 760µL del lisado y centrifugar a 6,000 rpm durante 1 minuto
7. Desechar el flujo y volver ensamblar la columna con su tubo de recolección
8. Aplicar 500µL a la columna de solución de lavado A y centrifugar a 8,000 rpm durante 1 minuto
9. Desechar flujo y volver a ensamblar columna. Repetir este paso una vez más
10. Centrifugar la columna por 2 minutos a máxima velocidad para secar la columna
11. Colocar columna en un nuevo tubo de elución de 1.7mL
12. Agregar 100µL de Buffer de elución B e incubar a la misma temperatura anterior por 5 minutos
13. Pasado el tiempo, centrifugar durante 2 minutos a 2,000 rpm, seguido de un segundo giro por 1 minuto a máxima velocidad.
14. Medir concentración de ADN en el Nanodrop (ver JALS-08: Uso del Nanodrop)
15. Almacenar ADN (ver JALS-07: Almacenamiento de muestras de ADN)

Quick-DNA™ Miniprep Kit:

1. Añadir 500µL de Buffer de lisis al pellet y agitar durante 4-6 segundos en el vortex
2. Reposar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos
3. Traspasar mezcla a una columna Zymo-Spin™ IICR en un tubo de recolección
4. Centrifugar a más de 10,000 g por 1 minuto y descartar el tubo de recolección con el flujo adentro
5. Traspasar la columna a un nuevo tubo de recolección y adicionar 200µL de ADN de Buffer de prelavado. Centrifugar a 10,000g durante 1 minuto
6. Agregar 500µL de g-ADN Buffer de lavado y centrifugado a 10,000 g por 1 minuto
7. Transferir la columna a una microcentrífuga limpia, añadir 50µL de ADN Buffer de elución, incubar durante 2-5 minutos y centrifugar a 10,000 g por 30 segundos

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

8. Medir concentración de ADN en el Nanodrop (ver JALS-08: Uso del Nanodrop)
9. Almacenar ADN (ver JALS-07: Almacenamiento de muestras de ADN)

Precipitación salina:

1. Centrifugar tubo a 550 g por 10 minutos a temperatura ambiente a lo que se extrajo de saliva para este procedimiento
 2. Descartar sobrenadante en recipiente con cloro
 3. Resuspender el precipitado con 1mL de buffer de lisis
 4. Incubar muestra over night
 5. Agregar 400 µL de acetato de amonio (ver JALS-06: Preparación de reactivos para extracción de ADN sección 5)
 6. Mezclar por inversión 20 veces
 7. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente
 8. Traspasar 750 µL del sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL rotulado (ver JALS-04: Codificación de muestras sección b)
 9. Agregar 750 µL de etanol absoluto frio
 10. Incubar a -20°C por 20 minutos
 11. Centrifugar a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C
 12. Lavar pellet con 1mL de etanol al 70%
 13. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C
 14. Dejar secar el pellet sobre una servilleta por 25 minutos
 15. Resuspender el pellet en 100 µL de buffer TE
 16. Medir concentración de ADN en el Nanodrop (ver JALS-08: Uso del Nanodrop)
 17. Almacenar ADN (ver JALS-07: Almacenamiento de muestras de ADN)
- 10) Cálculos

Volumen etanol al 70%:

$$V1 = \frac{C2 * V2}{C1} \rightarrow V1 = \frac{70\% * 100mL}{96\%} = 72.92mL \text{ de etanol al } 96\%$$

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

Gramos de Chelex 100 para que esté al 10%:

$$\text{Chelex}(\text{gramos}) = \text{Porcentaje} (10\text{g}/100\text{mL}) * \text{Volumen} (100\text{mL}) = 10\text{g}$$

Gramos de acetato de amonio 10M:

$$\begin{aligned} \text{Gramos } C_2H_7NO_2 &= \text{Masa molar } C_2H_7NO_2 * \text{Volumen final deseado} \\ &\rightarrow 10\text{moles/L} * 77.05\text{g/mol} * 1\text{L} = 770.5 \end{aligned}$$

$$\text{gramos de } C_2H_7NO_2$$

Cantidad de Tris-HCl a 10mM:

$$\begin{aligned} \text{Gramos de Tris HCl} &= \text{Moles de Tris} - \text{HCl para 1L} * \text{Masa molar Tris} - \text{HCl} \\ &\rightarrow 0.010\text{mol} * \frac{121.14\text{g}}{\text{mol}} = 1.2114. \end{aligned}$$

Cantidad de EDTA 1mM:

$$\begin{aligned} \text{Gramos de EDTA} &= \text{Moles de EDTA para 1L} * \text{Masa molar EDTA} \rightarrow \frac{0.001\text{mol}}{\text{L}} * \frac{372.24\text{g}}{\text{mol}} \\ &= 0.37224 \end{aligned}$$

Cantidad de Tris-HCl 50 mM

$$\begin{aligned} \text{Gramos de Tris HCl} &= \text{Moles de Tris} - \text{HCl para 1L} * \text{Masa molar Tris} - \text{HCl} \\ &\rightarrow 0.05\text{mol} * \frac{121.14\text{g}}{\text{mol}} = 6.057. \end{aligned}$$

Cantidad de EDTA 50 mM:

$$\begin{aligned} \text{Gramos de EDTA} &= \text{Moles de EDTA para 1L} * \text{Masa molar EDTA} \\ &\rightarrow 0.05\text{mol/L} * 372.24\text{g/mol} = 18,612 \end{aligned}$$

Cantidad de sacarosa 50 mM:

$$\begin{aligned} \text{Gramos de sacarosa} &= \text{Moles de sacarosa para 1L} * \text{Masa molar sacarosa} \\ &\rightarrow \frac{342.3\text{g}}{\text{ml}} * 0.05\text{mol} = 17.115 \end{aligned}$$

Cantidad de NaCl 100mM

$$\begin{aligned} \text{Gramos de NaCl} &= \text{Moles de NaCl para 1L} * \text{Masa molar NaCl} \rightarrow 58.44\text{g/ml} * 0.1\text{mol} \\ &= 5.844 \end{aligned}$$

Cantidad de SDS 1% en 1L:

$$1\% = 1 \text{ gramo por } 100 \text{ mL de solución} \rightarrow \text{Para } 1\text{L} = x \text{ gramos de SDS}$$

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.01 Versión:1 Fecha: 2024
Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, método por columna y el método de precipitación salina	Páginas totales: 5 Autorizado: Preparado por: José Lemus

$x = 10$ gramos de SDS

11) Control de calidad

Emplear el espectrofotómetro (Nanodrop), para verificar si la muestra no está contaminada y es óptima (el ratio A260/280 >1.6 y un ratio A260/280 > 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra) para el análisis mediante biología molecular.

12) Reportes de datos y documentos utilizados

Registra datos de las muestras identificadas y su respectiva concentración obtenida en una hoja de Excel.

Ejemplo Cuadro no. 2: Concentraciones de ADN:

CODIGO	Extracción de ADN ng / μ L
----	-----
2408050251	86.26
2408050262	90.75
----	----
2409080013	163.00
2409080021	160.25
2408050262	66.50
----	-----

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.02 Versión:1 Fecha: 2024
Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> OXA y <i>bla</i> CTX-M	Páginas totales: 3 Autorizado: Preparado por: José Lemus

1) Propósito

Ampliar un fragmento específico de ADN, para obtener millones de copias y así poder determinar genotípicamente la presencia de los genes.

2) Aplicación

Permite detectar la presencia de genes de resistencia a antibióticos betalactámicos. Esta detección permite realizar el diagnóstico de forma rápida, se podría informar al tratante un día después de la recolección de la muestra. Esto último dependerá del volumen de muestras atendidas. Este método lo que permitirá es que se brinde un tratamiento temprano al malestar del mencionado paciente, debido a su rápida detección.

3) Referencias

- Fluit, A. C., Visser, M. R., & Schmitz, F.-J. (s. f.). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance | Clinical Microbiology Reviews. Recuperado 26 de febrero de 2024, de <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/cmr.14.4.836-871.2001>
- Método: Gel de electroforesis Agarosa. (2017, 26 octubre). Conogasi. <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>
- Banco ADN. (s. f.). Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN. Recuperado 26 de febrero de 2024, de <https://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>
- Protocolo de la PCR convencional. (s. f.). Recuperado 31 de julio de 2024, de https://www.sigmaldrich.com/GT/es/technical-documents/protocol/genomics/pcr/standard-pcr?srsltid=AfmBOopnSWjUf0RksK9G_n3w31cBkzMvFgoq5digBzt76O5sD6PTOIxt
- González, N. E., Zapata, A. C., Sánchez-Henao, D. F., Chávez-Vivas, M., González, N. E., Zapata, A. C., Sánchez-Henao, D. F., & Chávez-Vivas, M. (2020). Resistencia a antibióticos β-lactámicos y eritromicina en bacterias de la cavidad oral. *Nova*, 18(34), 27-45. <https://doi.org/10.22490/24629448.3928>

4) Terminología y abreviaturas

Pmol: Picomol:

μL: microlitro

μM: micro molar

mM: milimolar

ng: nanogramos

U: Unidad

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.02 Versión:1 Fecha: 2024
Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes blaTEM, blaOXA y blaCTX-M	Páginas totales: 3 Autorizado: Preparado por: José Lemus

°C: Centígrados Celsius

ADN: Ácido desoxirribonucleico

pg: Picogramos

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfatos

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris Borato EDTA

5) Principio

Este método se basa en la amplificación exponencial de un fragmento de ADN en específico mediante ciclos repetitivos de temperatura. Para ello se requiere de cebadores y enzimas Taq que permiten seleccionar las secuencias de interés que se desee replicar; también los cambios de temperatura. Además, se lleva a cabo la desnaturalización del ADN, la hibridación de cebadores y la extensión de una nueva cadena. Esto permite generar muchas copias del fragmento de interés para el diagnóstico molecular a partir de la amplificación de pequeñas cantidades de ADN (Fluit et al., s. f.),

6) Documentos asociados

PNO 1.01 Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, el método por columna y el método de precipitación salina

7) Seguridad

Seguir las buenas prácticas de seguridad (ver JALS-01: Seguridad para las buenas prácticas de laboratorio)

8) Equipos, materiales y reactivos

A) Equipos

Termociclador

Cámara de electroforesis

Centrífuga

Vortex

Transiluminador UV

Caster gel

Erlenmeyer

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.02 Versión:1 Fecha: 2024
Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> OXA y <i>bla</i> CTX-M	Páginas totales: 3 Autorizado: Preparado por: José Lemus

B) Materiales

Micropipetas P1000, P100 y P10

Puntas para micropipeta de 1000 µL, 100 µL y 10 µL

Tubos para PCR

Gradilla

C) Reactivos

Buffer 10X

dNTPS

Primers

ADN

Agua libre de nucleasas

Taq polimerasa

Buffer TBE 1X

Agarosa en polvo

SYBR Green

Loading dye

9) Procedimiento:

1. Antes de empezar el procedimiento es necesario lavarse las manos, colocarse guantes y limpiar la campana con etanol.
2. Limpiar campana (ver JALS-09: Procedimiento de uso y limpieza de campana)
3. Rotular los tubos con su número de identificación (ver JALS-04: Codificación de muestras sección b)
4. Descongelar todos los reactivos, entre ellos el ADN extraído, el Buffer 10X, los primers, el dNTPs, Taq polimerasa y realizar un spin down
5. Ordenar la disposición de la colocación de las muestras y los controles (ver JALS-10: Orden de colocación de muestras y controles en el termociclador)

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.02 Versión:1 Fecha: 2024
Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes <i>blaTEM</i> , <i>blaOXA</i> y <i>blaCTX-M</i>	Páginas totales: 3 Autorizado: Preparado por: José Lemus

6. Añadir a varios tubos (muestras, control positivo y negativo), Buffer de PCR a una concentración final 1X, dNTPs a 0.2mM, Primers (ver JALS-11: Secuencias Forward y Reverse de los primers) a 2.5pmol, Taq polimerasa a 0.6U, agua ultrapura y por último 10ng de ADN en tubo de 25 µL

Nota: Se monta el master mix dentro de la campana. Además, el control negativo no se le coloca ADN

7. Mezclar en un vortex y centrifugar brevemente afuera de la campana
8. Amplificar muestras mediante un termociclador según los ciclos y temperaturas presentes en la tabla
9. mencionada:

Cuadro 3: Parámetros cíclicos para la amplificación de los genes *blaTEM*, *blaOXA* y *blaCTX-M*

Desnaturalización inicial	94°C	4 minutos	
Desnaturalización	94°C	45 segundos	30 ciclos
Anillamiento	<i>TEM-1</i> : 67°C, <i>OXA-10</i> : 60°C y <i>CTX-M9</i> : 60°C	45 segundos	30 ciclos
Elongación	72°C	1 minutos	30 ciclos
Elongación final	72°C	10 minutos	

10. Realizar un gel de agarosa al 1.2% para verificar la ampliación del ADN:
 - a. Pesar 1.2g de agarosa y disolver en 100mL de buffer TBE 1X en un recipiente de vidrio.
 - b. Calentar la mezcla en un horno de microondas cada 30 segundos hasta que quede homogénea. **IMPORTANTE:** Tener siempre presente que el recipiente está caliente.
 - c. Agregar 4 µL de SYBR SAFE.
 - d. Verter la mezcla lentamente en un caster gel y colocar inmediatamente un peine.

IMPORTANTE: Para verter la mezcla al caster gel, se requiere que la temperatura del recipiente permita agarrarlo con las manos.

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.02 Versión:1 Fecha: 2024
Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes <i>blaTEM</i> , <i>blaOXA</i> y <i>blaCTX-M</i>	Páginas totales: 3 Autorizado: Preparado por: José Lemus

- e. Dejar enfriar hasta que polimeriza el gel.
- f. Retirar el peine cuidadosamente y trasladar el gel a una cámara de electroforesis.
- g. Agregar el buffer de corrida hasta sumergir el gel.
- h. Antes de cargar las muestras, controles (negativo y positivo) y escalera de ADN (1kb) en los pozos, realizar mezcla de 10 μ L de ADN (muestra, control positivo o escalera) y control negativo con 2 μ L de loading dye
- i. En cada pozo agregar la mezcla (ADN y loading dye)

NOTA: Antes de cargar los pozos realizar un mapa de cómo será la distribución. Ejemplo:

Cuadro 2: Mapa de la distribución de muestras en el gel de agarosa para la corrida

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
M	C-	C+a	C+b	Mx1	Mx2	Mx3	Mx4	Mx5	Mx6	Mx7		M

M: Escalera de ADN 1kb

Mx: Muestras

C-: Control negativo (Agua)

C+: Control positivo (a: *Pseudomona. aeruginosa* ATTC 27853 y b: *Escherichia coli* ATCC 25922)

NOTA: En el gel solo se trabajará un gen en específico

- j. Tapar la cámara de electroforesis y correr nuestro gel por 45 minutos.

Nota: correr el gel a 70 voltios

- k. Al terminar el tiempo apagar el equipo.

11. Pasar el gel al transiluminador UV y visualizarlo.

12. Comparar las bandas de las muestras con la del control positivo

13. Si en la muestra se observa una banda en la misma posición que el control positivo, significa que la muestra presenta ese gen (para *blaTEM* en 956 pb, *blaCTX-M* en 856 y *blaOXA* en 311pb) (González et al., 2020).

10) Cálculos

Para los cálculos se utiliza el siguiente cuadro:

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.02 Versión:1 Fecha: 2024
Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes blaTEM, blaOXA y blaCTX-M	Páginas totales: 3 Autorizado: Preparado por: José Lemus

Cuadro 4: Componentes de master mix

Reactivos	Reactivos	Reacción 1X
Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
DNA (60ng/ μL)	30ng	0.5
Primer forward (10pmol/ μL)	10pmol	1.0
Primer reverse (10pmol/ μL)	10pmol	1.0
dNTPS (10mM)	200 μM	0.5
Buffer (10X)	1X	2.5
Taq polimerasa (5U/ μL)	1U	0.2
H2O	-	19.3
Volumen final	-	25

Cálculo no 1: Volumen de Buffer 10X a adicionar

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{1X * 25\mu L}{10X} = 2.5\mu L$$

Dato: Esta fórmula se emplea en los del volumen del primer, el volumen de dNTPs, volumen de ADN y el volumen del Taq

Ci: concentración inicial

Cf: concentración final

Vi: volumen inicial

Vf: volumen final

Calculo no. 2: Volumen de agua a adicionar

Volumen H2O= 25 μL- (suma de todos los volúmenes)

Cálculo no. 3: Cantidad de agarosa para realizar gel al 1.2% (para gel de 100mL):

$$C * V = g$$

$$\frac{1.2g * 100mL}{100mL} = 1.2 g \text{ de agarosa}$$

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.02 Versión:1 Fecha: 2024
Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes blaTEM, blaOXA y blaCTX-M	Páginas totales: 3 Autorizado: Preparado por: José Lemus

g: gramos de agarosa

V: volumen deseado

C: concentración

11) Control de calidad

Realizar un gel de agarosa al 1% para verificar la presencia de los genes específicos y la calidad de la amplificación.

Se emplearon como control positivo *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, como control negativo agua (González et al., 2020)

12) Reportes de datos y documentos utilizados

Los datos se almacenan en documento de Word, con su respectivo mapa en que fueron colocadas las muestra e imágenes de los geles de electroforesis.

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.03 Versión:1 Fecha: 2024
Consentimiento informado y requisitos para el manejo de muestras humanas	Páginas totales: 2 Autorizado: Preparado por: José Lemus

1) Propósito

Garantizar que se respeten los derechos del paciente y asegurar que participe activamente.

2) Aplicación

Permite el manejo de muestras humanas, cumpliendo los márgenes éticos establecidos tanto nacional como internacionalmente. Con ello se logra a su vez informar al paciente sobre la utilidad del estudio en que participa, aclarando sobre los beneficios de ello, así como de la inexistencia de riesgos.

3) Referencias

HRP-090-SOP-Informed Consent Process for Research (1).docx. (s. f.).

4) Terminología y abreviaturas

N/A

5) Principio

El principio radica en el respeto a la autonomía del paciente, basándose en principios éticos de beneficencia, no maleficencia, justicia y dignidad humana.

6) Documentos asociados

PNO 1.00 Recolección de muestras de saliva para diagnóstico molecular

PNO 1.01 Extracción de ADN de saliva por medio de Chelex 100, el método por columna y el método de precipitación salina

PNO 1.02 Diagnóstico molecular mediante PCR convencional para la detección de genes *blaTEM*, *blaOXA* y *blaCTX-M*

7) Seguridad

No aplica

8) Equipos, materiales y reactivos

A) Equipos

N/A

B) Materiales

Documento de compromiso

C) Reactivos

N/A

9) Procedimiento

1. Categorizar al paciente

- a. Si es adulto ir al paso 2.

Protocolo Normado de Operación	PNO 1.03 Versión:1 Fecha: 2024
Consentimiento informado y requisitos para el manejo de muestras humanas	Páginas totales: 2 Autorizado: Preparado por: José Lemus

- b. Si es niño o persona incapaz, verificar la presencia de quien ejerce la patria potestad o tutoría según el caso.
2. Determinar si entiende y habla español. En caso negativo, se requerirá de un intérprete que el equipo de investigación designe.
3. Determinar si sabe leer. En caso de que no pueda leer se requerirá de una persona de confianza del paciente para que sea testigo. Puede ser un pariente. No puede ser ningún miembro del equipo de experimentación.
4. Se procederá a dar lectura al Documento de Información para la Aceptación (ver JALS-02: Información para la aceptación del consentimiento informado), el cual es una explicación sencilla del proceso de toma de muestra y su posterior proceso.
5. Se invitará al paciente a manifestar sus dudas e inquietudes.
6. Indicar al paciente que puede hacer consultas a su familia, amigos o quien considere necesario.
7. Indicarle que si desea puede llevar el Documento para la aceptación a su casa, para su análisis y discusión previo a tomar una decisión.
8. Verificar la libre decisión del paciente realizando las siguientes preguntas.
 - a. ¿Entendió toda la información que se le proporcionó?
 - b. ¿Se siente libre de cualquier presión para tomar la decisión?
 - c. ¿Entiende que su participación (o la del menor que representa) en el estudio es voluntaria?
9. Determinar a través de las respuestas anteriores si el paciente o su representante tienen la capacidad y claridad para tomar una decisión.
10. En caso de percibir dudas, enfatizar sobre la información proporcionada para garantizar su comprensión.
11. Hacer ver al paciente que la prueba es totalmente gratuita.
12. Finalmente llenar la ficha de aceptación (ver JALS-03: Ficha de aceptación del consentimiento informado).
- 10) Cálculos
No aplica
- 11) Control de calidad
No aplica
- 12) Reportes de datos y documentos utilizados
Registrar documentos escaneados en ordenador

XIII. Anexo: Documentos complementarios a los PNO

JALS-01: Seguridad para las buenas prácticas de laboratorio

1. Realizar lavados frecuentes de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
2. Se debe tener una desinfección apropiada de todas las áreas de trabajo, empleando etanol al 70% y cloro al 10% cuando sea necesario.
3. Emplear equipo de protección personal como lentes al manejar soluciones concentradas y otros tipos de desinfectantes Emplear guantes para manipulación de los materiales.
4. Mantener en el área de trabajo basureros y contenedores correspondientes para desecho de cortopunzantes, material biológico, químico, etc. Limpiar derrames de acuerdo con los protocolos y naturaleza del material.
5. Mantener las áreas de trabajo libres de obstrucción, permitiendo un paso libre.
6. Almacenar material acorde a su reactividad y con base a manuales de usuario. Todo material biológico debe mantenerse en refrigeración y sin exponerse a posibles contaminantes (bacterias, hongos, etc.).
7. Reportar a autoridades correspondientes en caso de accidente o derrame si no se sabe su manejo apropiado previo a uso.
8. Limitar el acceso al laboratorio
9. Mantener la puerta del laboratorio cerrada mientras se trabaja.
10. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio
11. Verificar que los reactivos no estén caducados
12. Verificar que los materiales esten esterilizados

JALS-02: Información para la aceptación del consentimiento informado

INTRODUCCIÓN:

En la boca siempre existen bacterias que normalmente no afectan la salud de las personas debido a los mecanismos de defensa natural que el ser humano tiene. Al producirse una intervención odontológica se puede romper ese equilibrio natural y por eso se aplican medicamentos que buscan proteger al paciente. Sin embargo, las bacterias han ido adquiriendo resistencia a los fármacos y estos pierden eficacia, por lo que hacen inútil su aplicación debiendo sustituirlos por otro que sí pueda asegurar la salud del paciente.

Este estudio tiene como finalidad la determinación de la resistencia a antibióticos betalactámicos que puedan tener las bacterias que se encuentran en la cavidad bucal. El procedimiento no es invasivo, por lo que no conlleva riesgos para quien proporciona muestra.

El beneficio asociado al participar es conocer si se tiene resistencia a antibióticos betalactámicos y esta información puede ser de utilidad para el médico tratante a fin de mejorar los tratamientos con antibióticos. Una vez utilizada su muestra de saliva se descartará.

De aceptar usted participar en esta actividad, se hace de su conocimiento de lo siguiente:

1. Su participación tiene que ser voluntaria.
2. Lo que se le pide hacer es asistir al laboratorio sin haber consumido alimentos, bebidas, masticar chicle o haber fumado, todo eso en ningún momento 30 minutos antes de la toma de la muestra.
3. Se le pedirá que se enjuague la boca con agua por 10 segundos y que la expulse en un recipiente.
4. Luego se le pondrá cerca de la boca un tubo para que escupa dentro de él.
5. Esa muestra de saliva se utilizará para determinar si usted tiene algún tipo de resistencia a antibióticos.
6. El resultado se le comunicará a su médico tratante al día siguiente.
7. En ningún momento estará en riesgo su salud, pues simplemente se trata de obtener esa muestra de saliva indicada anteriormente. No hay ningún otro procedimiento adicional.
8. No hay cobro por esa actividad, ni tampoco recibirá usted pago alguno.
9. La decisión es personal, pero puede consultar con sus familiares y amigos antes de aceptar.
10. Toda su información personal y del resultado estará bajo reserva. Solamente usted y su médico tratante conocerán del resultado.
11. Solamente se retendrá la información básica para su uso estadístico.
12. Cuando ya esté claro y convencido de querer participar, se le pedirá que firme la Ficha de Aceptación (ver documento JALS-03: Ficha de aceptación del consentimiento informado).

JALS-03: Ficha de aceptación del consentimiento del consentimiento informado

Ficha de aceptación:

Número de Identificación: _____

Manifiesto que he leído y comprendido la información relativa al uso de la muestra de saliva que proporcionará para su procesamiento en la determinación de la resistencia a antibióticos betalactámicos en muestras de saliva por PCR.

Estoy enterado de la confidencialidad que tendrán mis datos.

Acepto los términos contenidos en el formulario que me fueron puestos a la vista y leídos.

Firma: _____

Teléfono: _____

(En caso de ser menor o incapaz, firmará su representante. De no poder firmar lo hace el testigo a ruego).

JALS-04: Codificación de muestras

- a) Codificación de muestras en la recolección de saliva

CODIFICACIÓN AAMMDD###

AA últimos dos dígitos del año (24 para 2024, 25 para 2025, etc.)

MM dos dígitos del mes (enero 01, febrero 02, ..., diciembre 12)

DD dos dígitos del día (01, 02, 11, ...,31)

número de orden de la toma de ese día en formato de tres dígitos (001, 025, etc.)

Ejemplo:

Muestra tomada el 5 de agosto de 2024 (AAMMDD = 240805), número 25 de muestra del día (### = 025)

código 240805025

- b) Codificación de muestras en la extracción de ADN y PCR

CODIFICACIÓN AAMMDD###P

AA últimos dos dígitos del año (24 para 2024, 25 para 2025, etc.)

MM dos dígitos del mes (enero 01, febrero 02, ..., diciembre 12)

DD dos dígitos del día (01, 02, 11, ...,31)

número de orden de la toma de ese día en formato de tres dígitos (001, 025, etc.)

P Método empleado (1=Chelex 100, 2=QIAamp Mini Kit, 3=Precipitación salina, 4=Norgen kit, y 4=Quick Miniprep kit)

Ejemplo:

Muestra tomada el 5 de agosto de 2024 (AAMMDD = 240805), número 25 de muestra del día (### = 025) y método empleado fue Chelex 100 (1)

código 2408050251

JALS-05: Almacenamiento y transporte de muestras de saliva

1. Almacenar la muestra en frío a una temperatura de 4°C.
2. Si la muestra se toma fuera del laboratorio, para trasladarla debe mantenerse la cadena de frío usando una caja de poliestireno con hielo o ice pack
3. luego se coloca en una hielera que permita mantenerla a 4°C.
4. En el laboratorio, si no se trabaja la muestra de forma inmediata hay que almacenarla a -20°C por 48 horas, Las muestras serán procesadas, luego de terminar de recolectar ese día.

JALS-06: Preparación de reactivos para extracción de ADN

1. Solución de Chelex 100 al 10%
 - a. Pesar 10 g de Chelex 100
 - b. En tubo de 100mL agregar el Chelex y mezclar con agua MiliQ
2. Solución de etanol al 70%
 - a. Medir 72.92 mL de etanol al 96% en recipiente graduado
 - b. Agregar 27.08 mL de agua destilada

IMPORTANTE: Agregar agua lentamente
3. Solución amortiguadora TE Buffer TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 1 mM)
 - a. Disolver el Tris-HCl: Pesar 1.2114 g de Tris-HCl y disolver en aproximadamente 800 mL de agua destilada.
 - b. Ajustar el pH: Ajusta el pH de la solución a 8.0 utilizando HCl concentrado. Utiliza un pH-metro para una medición precisa. Agregar el HCl gota a gota y agita suavemente después de cada adición.
 - c. Agregar EDTA: Una vez ajustado el pH, agrega 0.37224 g de EDTA a la solución.
 - d. Aforar: Llena el matraz volumétrico hasta la marca de 1 litro con agua destilada.
 - e. Mezclar: Mezcla bien la solución hasta que todos los componentes estén completamente disueltos.
4. Solución de lisis (50 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, sacarosa 50 mM, NaCl 100 mM, SDS al 1%)
 - a. Pesar 6.057gramos de Tris HCl, 18.612 gramos de EDTA, 17.115 gramos de sacarosa,5.844 gramos de NaCl y 10 gramos de SDS
 - b. Disolver Tris-HCl en aproximadamente 800 mL de agua destilada en un matraz
 - c. Ajustar pH a 8.0 usando HCl concentrado
 - d. Agregar el resto de los reactivos en el matraz
 - e. Llenar el matraz volumétrico con agua destilada hasta llegar a la marca de 1L
 - f. Tapar y agitar suavemente para homogeneizar la solución
5. Solución de acetato de amonio:
 - a. Pesar 770g de acetato de amonio
 - b. Agregar acetato de amonio en un matraz volumétrico de 1L
 - c. Añadir 800mL de agua destilada
 - d. Agitar hasta disolver el acetato de amonio
 - e. Agregar agua destilada hasta llegar a un litro
 - f. Tapar el matraz y agitar suavemente hasta homogeneizar

JALS-07: Almacenamiento de muestras de ADN

1. Almacenar la muestra en frío a una temperatura de -20°C en el congelador
2. Si se trabaja a largo plazo, almacenarlo a -80°C en el congelador

JALS-08: Uso del Nanodrop

1. Abrir el brazo del Nanodrop y pipetear 1.0-2.0 μL de muestras sobre el pedestal
2. Cerrar el brazo y esperar a que analice la muestra
3. Al finalizar la medición, limpiar la superficie con un paño de laboratorio.
4. Registrar datos sobre la concentración obtenida

JALS-09: Procedimiento de uso y limpieza de campana

1. Antes de usar la campana, encender el UV y mantener activada por 15-20 minutos
2. Terminado el tiempo, apagar UV, encender el flujo laminar, encender la luz y levantar la tapa unos centímetros hasta que el flujo laminar se estabilice
3. Limpiar el interior de la campana y cristal frontal:
 - a. Rociar con un poco de agua y secar inmediatamente con otro papel absorbente
 - b. Rociar con etanol r y secar inmediatamente con otro papel absorbente
4. Colocar material y reactivos en la campana
Nota: Estos tienen que estar rociados con etanol previo a entrar en la campana
5. Al finalizar, colocar tapa, apagar flujo laminar y encender UV
6. Repetir el paso 2
7. Ya está listo para su uso

JALS-10: Orden de colocación de muestras y controles en el termociclador

1. Control positivo (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922)
Nota: Controles obtenidos de ATCC (American Type Culture Collection)
2. Control negativo (Agua)
3. Muestra extraída de ADN

JALS-11: Secuencias Forward y Reverse de los primers

blaTEM-1:

F-5' ATGAGTATTCAACAT TTC CG3'

R-5' CTG ACA GTT ACC AAT GCT TA3

tamaño (pb) 956

blaCTX-M9:

F -5'GTGACAAAGAGAGTGCAACGG3'

R-5' ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC-3'

Tamaño (pb): 856

blaOXA-10:

F5' -TGAGCACCATAAGGCAACCA-3'

'R5' -TTGGGCTAAATGGAAGCGTTT-3'

Tamaño (pb): 311