

CIENCIAS EPIDEMIOLÓGICAS Y SALUBRISTAS

Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura**Molecular Biology Techniques for research development. A literature review**

Maritza Angarita Merchán^I, María Inés Torres Caicedo^{II}, Andrea Katherine Díaz Torres^{III}

^IBacterióloga y Laboratorista Clínica. Magister en Sistemas Integrados de Gestión. Profesora Asistente. Universidad de Boyacá. Tunja, Colombia. mangarita@uniboyaca.edu.co

^{II}Bacterióloga. Máster en Ciencias Biológicas. Profesora Asociada. Universidad de Boyacá. Tunja, Colombia. mariaitorres@uniboyaca.edu.co

^{III}Estudiante VIII semestre del Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad de Boyacá. Tunja, Colombia. andkatdiaz@uniboyaca.edu.co

Cómo citar este artículo:

Angarita Merchán M, Torres Caicedo MI, Díaz Torres AK. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Rev haban cienc méd [Internet]. 2017. [Consultado:]; 16(5): [796-807] Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/1651>

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Boyacá.

Recibido: 2 de diciembre de 2016.

Aprobado: 20 de septiembre de 2017.

RESUMEN

Introducción: Epidemiología etimológicamente significa "ciencia que estudia enfermedades que afecta a las comunidades"; esta ha venido evolucionando a través de los siglos describiendo y explicando la dinámica de la salud poblacional; ha integrado nuevas ramas, como la epidemiología molecular definida como una disciplina en la cual se implementa técnicas moleculares para aportes científicos, de investigación y clínico.

Objetivo: Presentar las técnicas con fundamento

en biología molecular, que han aportado al desarrollo de la investigación.

Material y Métodos: Se realizó revisión de artículos científicos durante los meses de agosto a octubre de 2016 y julio a septiembre de 2017, en inglés, portugués, francés y español en revistas científicas Pubmed, Scielo, Biomed Central, Free Medical Journals, LILACS, Redalyc, Inbiomed, Dialnet, usando términos DeCs descriptores de Ciencias de la Salud y MeSH; se emplearon artículos publicados en el período de

2012 a 2017, usando publicaciones de años anteriores como aporte a la historia del tema.

Resultados: Se presentan 05 técnicas de Biología molecular que han aportado a la investigación: RCP, Secuenciación, Hibridación de sondas de ADN, RAPD y RFLP.

Conclusiones: Hoy en día el uso técnicas moleculares permite el estudio de genoma completo o secuencias específicas de ADN cortas o largas con el fin de detectar y analizar secuencias de interés para la investigación en las

ciencias agronómicas, forenses, diagnóstico clínico e investigación básica, traslacional y aplicada; cada una de ellas se caracteriza por la confiabilidad y rapidez en la obtención del resultado, robustez, especificidad, sensibilidad y flexibilidad, comparado con métodos fenotípicos.

Palabras claves: Epidemiología, reacción de cadena polimerasa, hibridación, secuenciación, RAPD, RFLP.

ABSTRACT

Introduction: Epidemiology, from the etymological point of view, means "science that studies the diseases that affect the communities". It has been developing through centuries, describing and explaining the dynamics of population health; it has integrated new branches such as molecular epidemiology defined as a discipline in which molecular techniques are implemented for clinical, research, and scientific contributions.

Objective: To present techniques with basis in molecular biology, which have contributed to research development.

Material and methods: A review of scientific articles was made during the months of August-October of 2016, and July-September, 2017 in English, Portuguese, French, and Spanish languages, in scientific journals such as Pubmed, Scielo, Biomed Central, Free Medical Journals, LILACS, Redalyc, Inbiomed, and Dialnet, using DeCs term descriptors of Health Sciences, and the MeSH descriptor; articles published during

the time period from 2012-2017 were used, and publications of previous years were also taken into consideration as a contribution to the history of this topic.

Results: 05 techniques of molecular biology which have contributed to research development were presented: PCR, sequencing, hybridization with DNA probes, RAPD, and RFLP.

Conclusions: At present, the use of molecular techniques allows the complete genome or short and long sequences of DNA with the aim of detecting and analyzing sequences of interest for research in agronomy and forensic sciences, clinical diagnosis and basic, translational, and applied research, each of them characterized by reliability and quickness in obtaining result, strength, specificity, sensitivity, and flexibility, compared to phenotypic methods.

Keywords: Epidemiology, polymerase chain reaction, hybridization, sequencing, RAPD, RFLP.

INTRODUCCIÓN

En la lucha contra las enfermedades infecciosas, se ha hecho necesaria la optimización de la especificidad, sensibilidad y rapidez de técnicas de diagnóstico tradicional; sin embargo, con el auge de la investigación y la necesidad de diagnósticos oportunos y eficaces, han surgido técnicas de laboratorio con fundamento en biología molecular aplicadas en programas de prevención, control y tratamiento. Entre las alternativas diagnósticas propuestas a estos retos, se describen técnicas como la reacción de cadena de polimerasa, hibridación de sondas de ADN, secuenciación de genomas, secuenciación paralela, también conocida como masiva o de nueva generación (NGS), pirosecuenciación, Polimorfismo amplificado aleatorio ADN (RAPD) y Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción (RFLP) entre otras, cuya introducción en los laboratorios busca brindar apoyo en la obtención de resultados altamente confiables.¹

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular al punto de alcanzar gran versatilidad como técnica de análisis.² La especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la RCP se encuentra directamente influenciada por los diferentes componentes que la integran como la mezcla de reacción, régimen de ciclaje y la ADN polimerasa;³ la técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conocer las secuencias que lo flanquean, obtener una secuencia de ADN concreta sin recurrir a la clonación en un organismo huésped.⁴ Sus aplicaciones son variables e ilimitadas, ejemplo de ello, es la posibilidad de

realizar estudios de expresión genética, secuenciación directa de secuencias amplificadas, detección de mutaciones, seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades, diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas y en ciencia forense en la identificación de restos biológicos, determinación de paternidad y pruebas periciales en criminalística.⁵

La secuencia del ADN consiste en determinar el orden de las bases A, C, G y T en un fragmento de ADN; este método fue descrito por Sanger en 1977, y permite obtener la secuencia de un fragmento determinado de ADN, un gen o parte de este, y ser empleado en la actualidad.⁶ Este método ha ido evolucionando con el tiempo y en la actualidad se han implementado diferentes tipos de secuencias, destacándose la secuencia paralela, masiva o de nueva generación (NGS), que permite la exploración de genomas completos de humanos u otras especies;⁷ y la pirosecuencia, con la cual es posible determinar la secuencia de una molécula de ADN, identificando bases individuales, o secuencias cortas de ácidos nucleicos en posiciones determinadas.⁸ La hibridación, es un método que se basa en la unión de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos que producen estructuras de doble hebra, las cuales son híbridos de ADN, ARN-ARN o ADN-ARN.^{8,9} El método de hibridación se basa en el desarrollo de dos moléculas de ácidos nucleicos: una homogénea de secuencia distinguida como sonda y la otra heterogénea de secuencia desconocida, la cual contiene la secuencia diana que se quiere analizar.¹⁰ Los ácidos nucleicos de cadena sencilla, provienen de ADN clonado y

fragmentado por enzimas de restricción, o de oligonucleótidos sintéticos.¹¹

Existen otras técnicas moleculares que han aportado significativamente a la investigación como los denominados marcadores RAPD (Polimorfismo amplificado aleatorio ADN), quienes con base en la RCP, gracias a ellos es posible la detección de los polimorfismos existentes en la secuencia de ADN a estudiar y

OBJETIVO

El objetivo de este artículo de revisión es dar a conocer técnicas con fundamento en biología molecular, que han aportado al desarrollo de la

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión de artículos científicos durante los meses de agosto a octubre de 2016 y julio a septiembre de 2017, en inglés, portugués, francés y español en revistas científicas iberoamericanas indexadas en Pubmed, Scielo, Biomed Central, Free Medical Journals, LILACS, Redalyc, Inbiomed, Dialnet, usando términos DeCs descriptores de Ciencias de la Salud y MeSH para la validación de las palabras claves.

Se emplearon en mayor cuantía artículos publicados en el período de 2012 a 2017, aunque fue necesario usar publicaciones de años

PRESENTACIÓN DEL CASO

Epidemiología Molecular

La epidemiología molecular es una rama de la disciplina aplicada al estudio de enfermedades infecciosas, en la cual se implementan técnicas moleculares utilizadas para la identificación de agentes patógenos en los estudios epidemiológicos; tiene como objetivo describir

los RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción),¹⁰ los cuales expresan las diferencias entre individuos en secuencias específicas del ADN y que son reconocidas por diferentes enzimas que cortan dichas secuencias, y da origen a pequeños fragmentos que pueden ser analizados a través de electroforesis.¹¹

investigación en diferentes campos de aplicación.

anteriores como aporte a la historia del tema.

Se obtuvo un total de 80 artículos, a los cuales se les aplicaron criterios de inclusión y exclusión consistentes en vigencia y aporte a la temática a tratar, donde finalmente se seleccionaron un total de 56, con los que se construyó una base de datos a partir de la cual se efectuó un análisis bibliométrico para su clasificación por tema de interés, autores y fechas de publicación.

Se quiere declarar como principal limitación de esta revisión, el acceso a publicaciones que no permiten la consulta gratuita de sus contenidos.

la distribución de la enfermedad y sus factores de riesgo con el fin de intervenir en el curso de su desarrollo natural.¹² Se basa en análisis estadísticos mediante métodos geográficos que permite evaluar el desarrollo de la afección,¹³ y detectan y cuantifican material genético específico proveniente de muestras biológicas,

estudio de brotes, caracterización de microorganismos, relaciones existentes entre genotipos y estudios de factores de virulencia.¹⁴ El diagnóstico molecular es una área dinámica en constante desarrollo que ha revolucionado el diagnóstico clínico, mostrando un impacto en las áreas de salud,¹⁵ y obligado a la implementación de herramientas claves para el equipo clínico que generan un beneficio directo para el paciente.¹⁶

El principio de la epidemiología molecular radica en el estudio de las enfermedades infecciosas a través del empleo de técnicas moleculares que permitan el estudio del genoma de bacterias, virus, viroides, hongos y parásitos, agentes etiológicos de dichas enfermedades.¹⁷

Aplicaciones

La epidemiología molecular se emplea como método de diagnóstico para diferentes patologías, su principal aplicación se encuentra en:

1. Métodos moleculares para tipificación:

Se denomina tipificación a la identificación y caracterización de microorganismos patógenos que permite establecer la identidad de los microorganismos causantes de brotes infecciosos, determinando la fuente de infección y sus posibles patrones de diseminación; asimismo establece la prevalencia del agente infeccioso en una población.¹⁸

La técnica de tipificación a emplear dependerá de los requerimientos y características del sistema analizado; sin embargo, cualquiera que sea el método de tipificación, debe ser evaluado previamente en cuanto a su capacidad para generar la información epidemiológica requerida. La tipificación puede ser evaluada teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Detección, identificación y tipificación de la totalidad de los aislados analizados.
- Repetibilidad y reproducibilidad del método.
- Estabilidad genética del marcador, neutral por las fuerzas evolutivas.
- Exclusión de los diferentes grupos de individuos con probabilidades elevadas.
- Capacidad del método para arrojar resultados similares a los obtenidos a través de otras técnicas.
- Efectividad entre los costos económicos generados por la aplicación del método y las ganancias obtenidas al lograr la prevención y control de la enfermedad.
- Relación entre los logros obtenidos a nivel económico, recursos y tiempo empleado.¹⁹

2. Métodos moleculares fenotípicos y genotípicos:

Los métodos fenotípicos se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas, constituyen la primera herramienta para la comparación de microorganismos que incluye la determinación de actividades enzimáticas, la capacidad metabólica y los determinantes antigénicos o susceptibilidad a agentes bactericidas; sin embargo, con este tipo de métodos no se pueden identificar genes, polimorfismo o mutaciones que determinen la expresión de las características visibles en medios de cultivos, pruebas bioquímicas y de susceptibilidad.²⁰⁻²²

Los métodos genotípicos estudian el genoma del microorganismo causal de la enfermedad y posibilitan el análisis de características de polimorfismo genético concurrente en los agentes etiológicos.²³ Se basan en la localización del material genético del organismo, lo que permite generar nuevos cambios en el patrón de

expresión genética, y brinda alternativas más estables y reproducibles.²⁴

Dentro de las técnicas empleadas en genotipificación se describen:

1. Reacción en cadena de la polimerasa (RCP).
2. Secuencia del genoma.
 - a. Secuenciación NGS.
 - b. Pirosecuencia.
3. Hibridación con sondas de ADN.
4. RAPD.
5. RFLP.

Cada técnica ha ofrecido una alternativa para la investigación epidemiológica; sin embargo, también tienen aplicables limitadas.²⁵

1. Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

En los últimos años se han venido desarrollando nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la RCP, que han dado un gran avance en la evolución del estudio de las enfermedades

infecciosas a través de estudios epidemiológicos moleculares que tiene por objeto determinar la relación clonal existente entre varios aislados de una misma especie, mediante técnicas de tipificación que involucran la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas.²⁶ Los métodos genotípicos amplifican regiones in vitro específicas de ADN al emplear secuencias que delimitan la zona de amplificación; a partir de una copia de la región a amplificar se adquieren millones de copias que posibilitan su detección y reflejan la presencia de la región de ADN en la muestra a analizar; para esta transformación actúan varias proteínas que cooperan en la síntesis de nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde.^{27,28}

Esta técnica, ha tenido diferentes avances y aplicaciones, las cuales se presentan en la Tabla.²⁹⁻³³

Tabla. Características y aplicaciones de las diferentes clases de RCP

TIPO DE RCP	CARACTERÍSTICAS	APLICACIONES
RPC estándar	Amplificación de un segmento de ADN utilizando dos cebadores. La detección de la amplificación es mediante geles de agarosa ²⁹ o poliacrilamida empleados para las observaciones de regiones pequeñas en número de pares de bases.	Detección cualitativa de un segmento de ADN.
RPC anidada	En esta variante el producto de amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con iniciadores que se van a ubicar dentro de la primera secuencia amplificada. ³⁰	Detección cualitativa de un segmento de ADN. Altamente sensible y específico.
RPC <i>in situ</i>	Los productos generados a partir de muestras biológicas como secreciones y tejidos pueden visualizarse en el sitio de amplificación, y permiten la detección de cantidades pequeñas de material genético. ¹⁹	

RPC Múltiple	Amplificación de 2 o más segmentos de ADN utilizando varios partidores en una sola reacción de amplificación. La detección de la amplificación se visualiza mediante geles de agarosa. ¹	Detección cualitativa de varios segmentos de ADN en una sola reacción de RCP.
RPC-RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)	RCP estándar con paso posterior de digestión con enzimas de restricción. ¹¹	Detección de polimorfismos tipo RFLPs.
RCP con transcriptasa inversa (RT- RPC)	Este tipo de RCP utiliza como molde inicial el ARN y se requiere una transcriptasa inversa para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario). ¹²	Expresión de genes. Detección de virus ARN
RPC-TR (Real time) o qRCP	RCP estándar donde se utilizan tinciones o sondas con fluoróforos para la detección de los fragmentos amplificados; puede ser del tipo múltiple. ¹¹	Detección cualitativa de uno o varios segmentos de ADN. Cuantificación de ADN en la muestra (cargas) o expresión de genes.

Fuente: Adaptada de *Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico* - BQ, PhD. Mauricio J. Farfán.

2. Secuenciación del genoma

Es una técnica que determina la secuencia completa de ADN en el genoma de una persona; consiste en determinar el orden de las bases Adenina, Citosina, Guanina y Timina en un fragmento de ADN. Con esta técnica se logra obtener secuencias hasta 500 bases aproximadamente, estas son ensambladas a un genoma de referencia que secuencia un genoma completo. Este método ha cambiado la manera de entender la genética basándose en la identificación de las causas reales de la herencia, centrándose en estudios genéticos de individuos con un fenotipo definido y enfermedades de herencia mendeliana producida por genes conocidos; estas evalúan el fenotipo y la secuencia del gen que puede estar afectado y presentan una sensibilidad muy alta para detectar mutaciones.³⁴

Uno de los proyectos más famosos en la historia de la biología molecular, fue el Proyecto genoma Humano (PHG), el cual propuso determinar la secuencia completa (más de $3\ 000 \times 10^6$ pares de bases) del genoma humano; el método localiza con exactitud los 100 000 genes de ADN aproximadamente y el resto de material hereditario de los seres humanos, responsables de las instrucciones genéticas de todo lo que conforma a un ser humano desde el punto de vista biológico.³⁵

Con el decursar del tiempo, la secuencia ha venido experimentado una serie de modificaciones al método descrito inicialmente por Sanger, y generado otros tipos de secuencia con la NGS y la pirosecuencia, muy empleadas en la actualidad en investigación clínica y estudios epidemiológicos; los métodos mencionados se presentan a continuación.

a. Secuencia paralela, masiva o de nueva generación (NGS)

La secuencia de ácidos nucleicos permite establecer el orden de los nucleótidos presentes en las moléculas de ADN o ARN a estudiar, razón por la cual, su uso ha aumentado en los últimos años exponencialmente en investigaciones y laboratorios clínicos alrededor del mundo; es así como la NGS se ha implementado gracias a la posibilidad que brinda de realizar secuencia masiva y paralela de millones de fragmentos del ADN y/o ARN presente en la muestra, con el empleo de tecnología de punta, a muy bajo costo y con un muy alto rendimiento, por lo que se pudo amplificar un genoma completo en un solo día.^{36,37}

La NGS tiene alta aplicación en estudios epidemiológicos gracias a las ventajas ofrecidas por este tipo de métodos como es el uso de genomas completos para establecimiento de relaciones filogenéticas entre especies, identificación de posibles recombinaciones y marcadores epidemiológicos que aportan a la identificación de posibles mutaciones en una población,³⁸ por ello, es considerada como una tecnología revolucionaria en estudios epidemiológicos aplicados a la ciencia básica, investigación traslacional, diagnóstico clínico, agronomía, ciencia forense y ciencia aplicada.³⁹ Este tipo de secuencia también conocida como No-Sanger, está disponible en diferentes plataformas o formatos que permiten la generación de datos con ventajas y desventajas propias de cada casa matriz; dentro de las ventajas se destacan la calidad de los datos obtenidos a partir de las secuencias, la robustez y el bajo ruido presente en el cromatograma; como desventajas se han reportado la

disponibilidad de un laboratorio con capacidad bioinformática que garantice la calidad en obtención e interpretación de los datos, así como la necesidad de realizar control sobre secuencias aleatorias o inespecíficas que pueden interferir con la secuencia.³⁸

b. Pirosecuencia

Se caracteriza por la secuencia por síntesis de ADN con detección en tiempo real; esta técnica es usada para la identificación de bases individuales o secuencias cortas de ácidos nucleicos en posiciones predeterminadas, a través del uso de fosfato durante la incorporación de los nucleótidos a la cadena de ADN, seguido de una serie de reacciones enzimáticas.⁴⁰

Es el único método de secuencia que se desarrolló como alternativa a la secuencia clásica de ADN; si se compara con otras técnicas molecular, la pirosecuencia es simple, robusta, rápida, sensible, altamente cuantitativa y precisa, flexible, costo efectiva y tiene la capacidad de automatización de la muestra;^{41,42} se ha empleado en estudios de análisis de variaciones genéticas, estudios agronómicos que permiten el desarrollo de cebadores y sondas específicas que aporten a programas de certificación de la calidad de alimentos,⁴³ cambios en comunidades microbianas de diferentes ambientes,⁴⁴ resolución de casos en ciencias forenses,⁴⁵ microbiología, así como en la detección de mutaciones en patologías de interés clínico.^{46,47}

3. Hibridación de sondas de ADN

La hibridación de sondas se conoce como el análisis en muestras para detectar la presencia de ácidos nucleicos (ADN o ARN), realizando una combinación anti paralela de estas con una

molécula de doble cadena. Sus técnicas se utilizan para detectar una molécula diana partiendo de una sonda complementaria a ella. Muchas técnicas moleculares están basadas en la hibridación como la RCP; estas se usan en el diagnóstico de enfermedades, la identificación de microorganismos patógenos, estudio de perfiles de expresión génica, localización de genes en cromosomas o de ARNm en tejidos *in situ* y en la comparación de especies patógenas.^{48,49}

4. RAPD (Polimorfismo amplificado aleatorio ADN)

También conocida como polimorfismo de producto amplificado al azar, es una técnica que emplea marcadores moleculares para amplificación por RCP de secuencias cortas de ADN polimórfico empleando un cebador de secuencia corta (10 a 12 pares de bases –pb). Al ser una técnica basada en la RCP, necesita control sobre ciertos factores que pueden influir directamente en el desempeño de la técnica como los dNTPs, TaqDNA polimerasa, temperatura de hibridación, tiempo de extensión, ciclos y la integridad de la cadena molde.⁵⁰

En investigación, este tipo de técnica se emplea análisis genéticos que permitan el establecimiento de similitudes entre comunidades de la misma especie (ejemplo: bacterias y plantas), un ejemplo de ello, es el estudio de la relación entre la resistencia al arsénico en flora bacteriana proveniente de

muestras de suelo, estudio realizado en India y publicado en *Molecular Phylogenetics and Evolution* en 2016.⁵¹

5. RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción)

Se denomina también fragmentos de restricción de longitud polimórfica, resultante de la variación de una secuencia de ADN reconocida por las enzimas de restricción usadas para cortar secuencias de ADN en lugares conocidos; son empleados principalmente como marcadores en mapas genéticos. Es un método comúnmente empleado por su rapidez en la obtención del resultado, bajo costo y especificidad; necesita ciertas condiciones para su funcionamiento, consistentes en el uso de enzimas de restricción adecuadas, condiciones de optimización y amplificación, y análisis de los productos amplificados (fragmentos de restricción) a través de electroforesis principalmente en gel de azarosa.⁵²⁻⁵⁴

Dentro de las ventajas descritas se encuentra que para su desempeño necesita un mínimo de instrumentos de laboratorio; se ha aplicado en diversos estudios que han permitido establecer o identificar especies bacterianas propias de humanos y animales (ejemplo: biovares de *Brucella melitensis*,⁵⁵ la discriminación entre especies patógenos de diferentes microorganismos causantes de infecciones en humanos o presentes en algunos productos de consumo humano y estudios metagenómicos.⁵⁶

CONCLUSIONES

Las técnicas empleadas en la investigación con fundamento molecular, han permitido un avance significativo en la investigación, y

aportado principalmente al desarrollo epidemiología molecular como ciencia aplicada para el conocimiento de características

genotípicas de comunidades bacterianas en diferentes ambientes como el ambiental, veterinario y humano, y generado conocimiento sobre el comportamiento epidemiológico y los cambios que las poblaciones principalmente bacterianas han desarrollado como mecanismo de defensa y/o adaptación a sus condiciones de hábitat.

Hoy el uso de técnicas moleculares como la NGS, pirosecuencia, RAPD y RFLP, permite el estudio de un genoma completo o secuencias específicas de ADN de secuencias largas o cortas con el fin

de detectar y analizar secuencias de interés para la investigación en las ciencias agronómicas, forenses, diagnóstico clínico e investigación básica, traslacional y aplicada.

Cada método presentado en esta revisión, se caracteriza por la confiabilidad y rapidez en la obtención del resultado, robustez, especificidad, sensibilidad y flexibilidad, si se compara con métodos fenotípicos, siendo este un aporte directo y accesible para el desarrollo de la epidemiología molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bolívar AM, Rojas A, García LP. RCP y RCP-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización (RCP and RCP-Multiplex:critical parameters and standardization protocol). *Avan Biomed.* 2014;3(1):25-33.
2. Ranjbar R. "Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiol.* 2014; 37(1):15.
3. Conca N. "Diagnóstico etiológico en meningitis y encefalitis por técnicas de biología molecular". *Rev. chil. pediatr.* 2016; 87(1): 24-30.
4. Martínez C, Silva E. Métodos físico-químicos en biotecnología. *Anal Chem.* 2004;62(13):1202-14.
5. He Q, Barkoff AM, Mertsola J, Glismann S, Bacci S. Integration of epidemiological and laboratory surveillance must include standardisation of methodologies and quality assurance. *Euro Surveill.* 2012;17(32):1-10.
6. Arpajón PV. MicroARNs : una visión molecular. *Salud UIS.* 2011;(29):289-97.
7. Jiménez EA, Gobernado I, Sánchez HA. Secuenciación de genoma completo: Un salto cualitativo en los estudios genéticos. *Rev Neurol.* 2012;54(11):692-8.
8. Kim HJ. Clinical investigation of EGFR mutation detection by pyrosequencing in lung cancer patients. *Oncol Lett.* 2013;5(1): 271-276.
9. Gloria PB. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cuba Med Trop.* 2004;56(2):6.
10. Cui C. Determination of genetic diversity among *Saccharina* germplasm using ISSR and RAPD markers. *CR Biol.* 2017; 340(2): 76-86.
11. Rasmussen HB. Restriction fragment length polymorphism analysis of RCP-amplified fragments (RCP-RFLP) and gel electrophoresis-valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. Chapter from the book *Gel Electrophoresis - Principles and Basic.* 2012.
12. Labarca J. Utilización del antibiograma como marcador epidemiológico en infecciones intrahospitalarias: Comparación con la epidemiología molecular Antibiograma utilization as an epidemiological marker in nosocomial infections: comparison with molecular epidemiology. *Rev Chil Infect.* 2002;19(2):157-60.
13. Lilia M, Mesa F. Características, ventajas y desventajas de la hibridación in situ para la identificación de agentes patógenos. *Rev Biomedica.* 2013;63-78.
14. Martínez RR. Empleo de la técnica hibridación in situ fluorescente para visualizar microorganismos. *Salud UIS.* 2011;43(3):307-16.
15. Verweij Jaco J Rune S. "Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections." *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27(2): 371-418.
16. Najimi B. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of markers associated with H5 and H22 Hessian fly resistance genes in bread wheat. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 2002;6(2):79-85.

17. Alarcón J. Epidemiología: concepto, usos y perspectivas. *Epidemiology: concept, uses and perspectives*. *Sci Am*. 2009;13:1-3.
18. Russomando G. "El diagnóstico clínico laboratorial aplicando técnicas moleculares". *Pediatría (Asunción)*. 2016; 43(1): 9-11.
19. Vílchez G, Alonso G. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Scope and limitations of molecular methods applied to epidemiological studies*. *Rev la Soc Venez Microbiol*. 2009;29:6-12.
20. Farfán BM. Biología Molecular Aplicada Al Diagnóstico Clínico. *Rev. Med. Clin. Condes*. 2015;26(6):788-93.
21. Gutiérrez LT, Caycedo MI, López DP, Quiroga, CF. Caracterización fenotípica de bacilos Gram negativos con betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. *ISUB*. 2015; 2(2): 116-130.
22. Barrera JC, Merchán MA, Sánchez, DA, Quiroga CF. Agentes etiológicos de mastitis bovina en municipios con importante producción lechera del departamento de Boyacá. *ISUB*. 2015; 2(2): 162-176.
23. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y de la RCP en tiempo real". *Investigación en discapacidad*. 2013; 2(2): 70-78.
24. Whale AS, Jim FH, Svilen T. "Fundamentals of multiplexing with digital RCP". *Biomol Detect Quantif*. 2016; 10:15-23.
25. Vázquez J, Berrón S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(2):113-20.
26. Fournier PE, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome Medicine*. 2014;6(11):114.
27. Peña YA, Arpajón PY, Sosa AL, Doval R. Contribuciones de la técnica de la Reacción en Cadenas de la Polimerasa a la Epidemiología Molecular de las enfermedades infecciosas en Cuba. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2014;13(6):927-39.
28. Mas Eva. "Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP)". *Revista AquaTIC*. 2016.
29. Cortés E, Morcillo G. Reacción en cadena de la polimerasa (RCP); Principios básicos de manipulación génica. *Ingeniería genética. Programa de Formación del Profesorado*. UNE. 2010.
30. Garibyan L, Nidhi A. "Polymerase chain reaction." *J Clin Investig Dermatol*. 2013;133(3):1-4.
31. Izquierdo SSL, Mederos CL, Díaz GA, Echemendía FM, Montoro CE. Aplicación de RPC-PLFR en el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas. *Rev Chil Infectol*. 2007;24(5):391-6.
32. Inocencia G, Marcozzi A. Artículo original Optimización de la técnica de RCP reversa para la detección del VIH en plasma de pacientes infectados. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2013;157-61.
33. Bauer KA. "Review of rapid diagnostic tests used by antimicrobial stewardship programs". *Clin Infect*. 2014; 59(3): S134-S145.
34. Chirinos MC, Jiménez JE. Transference of some microsatellite molecular markers from Fabaceae family to Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Sci Agropecu*. 2015;6(1):51-8.
35. Roetzer A. "Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a Mycobacterium tuberculosis outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study." *PLoS Med*. 2013.
36. Grada A and Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *J. Invest. Dermatol*. 2013; 133(8): e11.
37. Hussing C, Kampmann ML, Mogensen HS, Børsting C, Morling N. Comparison of techniques for quantification of next-generation sequencing libraries. *Forensic Sci Int Genet*. 2015; (5): e276-278.
38. Cortey M, Díaz I, Martín GE, Mateu E. Next-generation sequencing as a tool for the study of PRRSV macro-and micro-molecular epidemiology. *Vet Microbiol*. 2017 Sep; 209:5-12.
39. Van DEL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *TIGS*. 2014; 30(9): 418-426.
40. Kim HJ. Clinical investigation of EGFR mutation detection by pyrosequencing in lung cancer patients. *Oncol Lett*. 2013; 5(1): 271-276.
41. Novais RC and Thorstenson YR. The evolution of Pyrosequencing® for microbiology: from genes to genomes. *J Microbiol Methods*. 2011;86(1): 1-7.
42. Fakruddin M, Chowdhury A, Hossain N, Mahajan S, Islam S. Pyrosequencing: A next generation sequencing technology. *World Appl Sci J*. 2013;24(12): 1558-1571.

43. Gutiérrez SP, Alzate RJ y Marín MM. Caracterización del viroma de ARN en tejido radical de *Solanum phureja* mediante pirosecuencia 454 GS-FLX. *Bioagro*. 2014;26(2).
44. ZHANG Q. Pyrosequencing reveals significant changes in microbial communities along the ecological successions of biological soil crusts in Tengger Desert of China. *Pedosphere*. 2017. En prensa.
45. Hu Z. Species identification through pyrosequencing 12S rRNA gene. *Forensic Sci Int Genet*. 2015; 5: e561-563.
46. García MJ, Chávez F, Salto E, Otero JR. RCP en tiempo real, inmunofluorescencia y cultivo para la detección de *Bordetella pertussis*: evaluación prospectiva y epidemiología molecular. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24(8):500-4.
47. Mejía JM. Molecular epidemiology of acute leukemia in children: causal model, interaction of three factors—susceptibility, environmental exposure and vulnerability period. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2016;73(1):55-63.
48. Wang X. Effects of different preservation methods on inter simple sequence repeat (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular markers in botanic samples. *C. R. Biol*. 2017; 340(4): 204-213.
49. Khowal S. A report on extensive lateral genetic reciprocation between arsenic resistant *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* strains analyzed using RAPD-RCP. *Mol. Phylogenet. Evol*. 2017; 107: 443-454.
50. Federica V. Detection of morbillivirus infection by RT-RCP RFLP analysis in cetaceans and carnivores. *J. Virol. Methods*. 2017; 247: 22-27.
51. Galal KA. SNP-based RCP-RFLP, T-RFLP and FINS methodologies for the identification of commercial fish species in Egypt. *Fish. Res*. 2017; 185: 34-42.
52. Dokianakis E, Tsirigotakis N, Christodoulou V, Poulakakis N and Antoniou M. DNA sequencing confirms RCP-RFLP identification of wild caught *Larrousius* sand flies from Crete and Cyprus. *Acta Trop*. 2016; 164: 314-320.
53. Bahmani N. Comparison of RCP-RFLP and PFGE for determining the clonality of *Brucella* isolates from Human and livestock specimens. *Saudi J Biol Sci*. 2017.
54. Silvester R, Alexander D, Antony AC and Hatha M. GroEL RCP-RFLP—An efficient tool to discriminate closely related pathogenic *Vibrio* species. *Microb. Pathog*. 2017; 105:196-200.
55. Pegg E, Doyle K, Clark EL, Jatau ID, Tomley FM, Blake DP. Application of a new RCP-RFLP panel suggests a restricted population structure for *Eimeria tenella* in UK and Irish chickens. *Vet. Parasitol*. 2016; 229:60-67.
56. Bühligen F, Lucas R, Nikolausz M, Kleinsteuber S. A T-RFLP database for the rapid profiling of methanogenic communities in anaerobic digesters. *Anaerobe*. 2016; 39: 114-116.