



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**Evaluación de la Técnica PCR para Detectar la
Presencia de *Mycobacterium tuberculosis*,
en las partículas del aire de la Ciudad
de Hermosillo, Sonora.**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta:

Gisel Ariana Figueroa Vega

Hermosillo, Sonora

Septiembre, 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios por guiarme siempre y estar presente en cada etapa de mi vida.

A mis padres Arnoldo y María, que siempre me han apoyado en todas las decisiones que he tomado, por todas las oportunidades que me han brindado y la confianza que he recibido.

A mis hermanos, a mis abuelos y a toda mi familia, por hacer mi vida más feliz.

A mi directora de tesis, Dra. Onofre Monge Amaya por toda la ayuda que me brindó al realizar este trabajo, todo el esfuerzo que puso en mi trabajo y por su gran apoyo, paciencia y orientación como maestra y amiga.

A mi novio Braulio, mi gran amor, por darme confianza, su gran apoyo y motivarme cada día para terminar este trabajo y cumplir todas mis metas.

A mi tía María Antonieta Figueroa y a la familia Meza por brindarme todo su apoyo durante la carrera.

A mis amigos, por ayudarme incondicionalmente cuando más los necesito.

A todo el equipo de Laboratorio de Biorremediación por enseñarme sus conocimientos y darme la confianza para trabajar con ellos. A los maestros encargados Dra. Onofre M., Dra. Tere Certucha, Dr. Javier Almendariz, M.C. Lucía Castillon y a mis compañeros Hiram y Carlos Elías.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), por abrirme las puertas y facilitarme los recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo. Por los conocimientos que me otorgaron el Dr. Jorge Hernández, M.C. Álvaro Santos y por su gran ayuda al biólogo Trinidad Encinas García.

Al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora, por sus enseñanzas y formación.

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico primeramente a Dios por llenar mi vida de bendiciones y permitirme concluir con esta etapa de mi vida.

Con mucho amor a mis padres por otorgarme la oportunidad de estudiar esta carrera, por brindarme los recursos necesarios para cumplir mis metas como persona y estar a mi lado apoyándome y aconsejándome siempre.

A mi directora de tesis, Dra. Onofre Monge Amaya por su esfuerzo, dedicación y perseverancia, ya que con su motivación ha logrado en mí que pueda concluir este trabajo con éxito.

Muchas Gracias

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa.

Mahatma Gandhi

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	4
Objetivos Específicos.....	4
II. JUSTIFICACIÓN	5
III. HIPÓTESIS	6
IV. ANTECEDENTES	7
4.1. Contaminación del Aire	7
4.2 Principales Enfermedades Respiratorias	10
4.3 La Tuberculosis	11
4.4. Técnicas de Biología Molecular	15
4.5. Extracción de Ácido Desoxirribonucleico	17
4.6. Cuantificación del ADN	18
4.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa	20
4.8. Componentes de la Reacción.....	22
4.8.1. Los nucleótidos.....	22
4.8.2. Primers.....	22
4.8.3. Templado.....	23
4.8.4. La Polimerasa	23
4.9. Electroforesis	26
4.10. Problemas de Contaminación Relacionados con la Micobacterias	27
V. METODOLOGÍA	28
5.1. Obtención de las Muestras.....	28
5.2. Sitios de Muestreo de Partículas.....	28
5.3. Extracción de ADN.....	30

5.4. Cuantificación de ADN	30
5.5. Diseño de Primers	33
5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa	33
5.7. Electroforesis	37
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1 Muestras Obtenidas.....	38
6.2 Extracción de ADN.....	38
6.3 Cuantificación de ADN	39
6.4 Obtención de Primers.....	42
6.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa	43
6.6 Electroforesis	50
VII. CONCLUSIONES	51
VIII. BIBLIOGRAFÍA	52
IX. ANEXOS	58
ANEXO I.....	58
ANEXO II.....	59

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Protocolo utilizado para el PCR con muestras de filtros, utilizando primers de All Vibrio.....	34
2. Protocolo utilizado con primers Lcp13 para tuberculosis con 40 ciclos de amplificación.....	35
3. Protocolo utilizado con primers Lcp13 para identificar <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con 15 ciclos de amplificación.....	36
4. Protocolo para las pruebas de PCR con primers Lcp13 para la identificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con 35 ciclos de amplificación.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	21
2. Sitios de muestreo ubicados en la Ciudad de Hermosillo, Sonora.....	29
3. Promedio de concentraciones (ng/uL) de ADN de las muestras que corresponden al primer período de muestreo.....	39
4. Promedio de concentraciones (ng/uL) de ADN de las muestras que corresponden al segundo período de muestreo.....	40
5. Promedio de concentraciones (ng/uL) de ADN de las muestras que corresponden al tercer período de muestreo.....	41
6. Secuencia de fragmentos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42
7. Prueba utilizando primers de All Vibrio.....	44
8. Prueba utilizando primers de All Vibrio y tres muestras aleatorias.....	45
9. Prueba utilizando primers de All Vibrio y tres muestras cada una por triplicado.....	46
10. PCR utilizando primers Lcp13 para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47

11.	PCR utilizando primers Lcp13 para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y 6 muestras aleatorias de filtros.....	48
12.	PCR utilizando primers Lcp13 para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y 48 muestras de filtros elegidas aleatoriamente.....	49
13.	Imagen del gel agarosa con el ADN extraído de las muestras de filtros y un control positivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50

RESUMEN

La calidad del aire, siempre ha sido un tema preocupante ya que este deteriora la salud de los habitantes en las ciudades, a las partículas se les considera capaces de bloquear los mecanismos de defensas del aparato respiratorio a nivel de vías aéreas superiores y alvéolos. La tuberculosis se ha convertido en un serio problema a nivel mundial y es una de las enfermedades más frecuentes en la ciudad de Hermosillo, Sonora y causa la muerte de cerca de 2 millones de personas cada año en el mundo y más de 8 millones de personas que desarrollan la enfermedad activa, mientras que una tercera parte de la población mundial actualmente infectada por la bacteria, pero de manera asintomática. El objetivo de este trabajo fue evaluar la técnica para detectar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR, en las partículas del aire en 4 estaciones de la Ciudad de Hermosillo, Sonora, durante 3 períodos en el 2011. Para el presente estudio se utilizaron filtros del muestreo de partículas suspendidas en el aire PM₁₀, proporcionados por el Instituto Municipal de Ecología (IME). Se evaluó por técnica de biología molecular para buscar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en partículas del aire de los filtros con muestras. Se realizó la extracción de ADN mediante el método de Gene Clean y se hizo cuantificación del total de muestras. Se obtuvieron un total de 288 muestras al finalizar los 3 períodos de muestreo y en base a los resultados de los PCR realizados en donde se obtuvo un óptimo para la amplificación de la secuencia de fragmentos de *Mycobacterium tuberculosis*. Se concluye la utilidad de ésta técnica para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo en las muestras de filtros seleccionadas para el estudio de las 4 estaciones de la ciudad de Hermosillo, Sonora no se encontró la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

I. INTRODUCCIÓN

La calidad del aire, siempre ha sido un tema preocupante ya que este deteriora la salud de los habitantes en las ciudades, a las partículas se les considera capaces de bloquear los mecanismos de defensas del aparato respiratorio a nivel de vías aéreas superiores y alvéolos. Se asocian con mucha frecuencia con elementos ácidos con los que sinergia su efecto dañino potencial y finalmente pueden acarrear elementos biológicos que van desde pólenes hasta bacterias, hongos y virus que son transportados al pulmón. Las PM₁₀ predominan en la fracción respirable y penetran hasta el espacio alveolar del pulmón (NOM-025-SSA1, 1993).

La tuberculosis se ha convertido en un serio problema a nivel mundial y es una de las enfermedades más frecuentes en la ciudad de Hermosillo, Sonora y la causa de muerte de cerca de 2 millones de personas cada año en el mundo y más de 8 millones de personas desarrollan la enfermedad activa, mientras que una tercera parte de la población mundial actualmente infectada por la bacteria, pero de manera asintomática (Niemann y col., 1997).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que si el control de la enfermedad no mejora entre el 2002 y el 2020, alrededor de 1.000 millones de personas en el mundo se infectarán, 150 millones contraerán la enfermedad y 36 millones morirán como consecuencia de la tuberculosis (Chan, 2007).

Mycobacterium tuberculosis causa la muerte de más personas que cualquier otro agente infeccioso. Las defunciones por tuberculosis representan el 25% de toda la mortalidad evitable en los países en vías de desarrollo, donde se registra el 95% de los casos y el 98% de los fallecimientos causados por esta enfermedad; el 75% de estos casos se sitúa en el grupo de edad económicamente productivo (15-50 años) (Organización Mundial de la Salud, 1996).

A partir de la década de los 80 se observó un notable incremento en las tasas de incidencia de tuberculosis; tanto en países en desarrollo como en los países más industrializados. El resurgimiento de la tuberculosis motivó que en marzo de 1993, la OMS declarara por primera vez a una enfermedad como “emergencia global de salud” (Suffys y col., 1997).

Algunos de los obstáculos para el tratamiento a muchos de los pacientes infectados de *Mycobacterium tuberculosis* son los ineficientes procedimientos de control de la infección, pruebas de identificación y susceptibilidad que requieren demasiado tiempo para obtener los resultados, así como el mal manejo en la administración del tratamiento de los pacientes (Jacobs, 1994).

La detección de *Mycobacterium tuberculosis* es de gran importancia y su diagnóstico incide en el cultivo de la misma y en la observación de extendidos a partir de muestras clínicas. Estos procedimientos no permiten la detección del 100% de los casos de tuberculosis pulmonar y su nivel de detección disminuye considerablemente en pacientes con tuberculosis extrapulmonar (Hansted y col., 2007). Por otra parte existen numerosos esfuerzos para desarrollar nuevas pruebas diagnósticas que superen la baja sensibilidad, especificidad y la enorme pérdida de tiempo asociada con los períodos de incubación del cultivo (Cho, 2007; Domínguez y col., 2008). Los dos principales problemas de los métodos tradicionalmente usados para la diferenciación de *Mycobacterium tuberculosis*, son el tiempo que se requiere para obtener una identificación completa y la diversidad de técnicas requeridas para alcanzar resultados confiables (Telenti y col., 1993). Además, los métodos rutinarios requieren suficiente crecimiento bacteriano, no permiten una identificación específica de las especies micobacterianas y no pueden realizarse en laboratorios de rutina (Chimara y col., 2008; Niemann y col., 2000a).

A diferencia, otros procedimientos basados en la amplificación de ácidos nucleicos, han permitido una detección rápida y específica de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas (Aldous y col., 2005). El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar y detectar ácidos nucleicos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, es aplicada a muestras que presenten lesiones sugestivas y bacterias ácido alcohol resistente cuando se examinan microscópicamente. Esta prueba utiliza los iniciadores IS6110 para identificar *Mycobacterium tuberculosis*. Con este método se ha tenido la oportunidad de realizar un diagnóstico confiable y más oportuno, lo que ha impactado de manera positiva en el diseño de estrategias de control epidemiológico, así como en el aspecto económico, ya que se ha evitado los tiempos de espera de los animales en cuarentena, así como su movilización para su comercialización final (Miller y col., 1997). Cabe mencionar que la capacidad de estos procedimientos para identificar *Mycobacterium tuberculosis*, depende tanto de la secuencia seleccionada obtenida por PCR, como de la eficiencia de la extracción del ADN (Cho, 2007).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la técnica de PCR para detectar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, en las partículas del aire en 4 estaciones de la Ciudad de Hermosillo, Sonora, durante 3 períodos en el 2011.

Objetivos Específicos

- Seleccionar los microorganismos de las partículas del aire en 4 estaciones de la ciudad de Hermosillo, durante tres períodos en el 2011.
- Extracción y cuantificación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) de las muestras seleccionadas.
- Diseño de primers y establecimiento del protocolo por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para la amplificación de los segmentos del ADN para identificar *Mycobacterium tuberculosis*.
- Emplear controles positivos de *Mycobacterium tuberculosis* y electroforesis para confirmar el desempeño de la técnica de identificación.

II. JUSTIFICACIÓN

La ciudad de Hermosillo actualmente se encuentra expuesta a diferentes enfermedades respiratorias debido a la contaminación en el ambiente producida por polvo. Una de las principales enfermedades ocasionadas por la emisión de partículas en el ambiente es la tuberculosis. En esta investigación se busca la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, mediante la extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), de las muestras de los filtros situados en 4 diferentes estaciones de la ciudad de Hermosillo, durante 3 períodos en el 2011.

III. HIPÓTESIS

La técnica de biología molecular puede ser una herramienta útil para detectar *Mycobacterium tuberculosis* en el medio ambiente de la Ciudad de Hermosillo, Sonora, extrayendo el ADN de muestras con partículas de polvo de la ciudad y utilizando la técnica de PCR para amplificar la micobacteria.

IV. ANTECEDENTES

4.1. Contaminación del Aire

La contaminación del aire ha sido vinculada a un número de efectos a la salud, en lo que respecta a pulmón y corazón. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su reporte de salud mundial, estimó que con los niveles actuales de concentración en la atmósfera, la contaminación ocasiona 35 mil muertes prematuras cada año en América Latina. Investigaciones realizadas en las últimas décadas han encontrado una variedad de efectos en los diferentes contaminantes, incluyendo impactos en los sistemas respiratorio, neurológico y cardiaco, así como la promoción de diferentes tipos de cáncer. Algunos subgrupos (ancianos, asmáticos, niños, personas con enfermedades del corazón) parecen estar en un riesgo mucho mayor por su exposición a la contaminación del aire (Molina, 2004).

En México al igual que en otros países, se han desarrollado índices de contaminación que son fácilmente entendibles. En nuestro país se usa el Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA), según el cual la concentración que señala la Norma de Calidad del Aire para cada contaminante, le corresponde a 100 puntos IMECA. Por lo tanto, la gente sabe que cuando el ozono o las partículas o algún otro contaminante rebasan los 100 puntos IMECA, es que se ha rebasado la Norma correspondiente, y la calidad del aire se considera como no satisfactorio y por arriba de los 200 puntos se considera mala (SEMARNAT, 2007).

La contaminación del aire en muchas ciudades mexicanas proviene predominantemente de los automóviles, autobuses y camiones que recorren las calles y carreteras. La mayoría de estos vehículos no tienen controles de contaminación adecuados, ni utilizan combustibles especialmente limpios. En

contraste, los vehículos con una tecnología avanzada que operan con combustibles con un contenido de azufre muy bajo, pueden tener una reducción de emisiones tan grande como del 99 %, comparada con un automóvil promedio, y una reducción de 97 % en el caso de los camiones (Molina, 2004).

La contaminación en el ambiente de la ciudad de Hermosillo se debe en su mayoría a las partículas de polvo y se ha vuelto un problema más serio, ocasionando daños severos a la salud. La escasez de agua y la falta de pavimentación en los suelos de Hermosillo han ido generando la emisión de partículas de polvo a la atmósfera, provocando diferentes enfermedades respiratorias a la población (Barajas, 1996).

La pavimentación se relaciona con indicadores de salud, directamente aquellos relacionados con calidad del aire. Los suelos sin pavimento contribuyen de forma significativa con la emisión de partículas de polvo a la atmósfera inmediata, quedando expuesta la población a riesgos eminentes de enfermedades respiratorias entre otras. Uno de los indicadores ambientales o de contaminantes aéreos más importantes se refiere a las partículas de polvo suspendidas con un diámetro menor a los 10 μm (PM_{10}). Las concentraciones de PM_{10} en la atmósfera inmediata a las ciudades está al parecer altamente relacionada con el tránsito de una fuerte carga vehicular sobre una gran superficie de calles pavimentadas (Cervera y col., 2010).

La contaminación del aire puede deberse primariamente a las partículas del suelo que son elevadas por el viento y suspendidas en la atmósfera, que provienen de suelos erosionados por la desecación de ríos y arroyos; la tala inmoderada de la vegetación, así como de zonas de baja explotación agrícola. Las tempestades de polvos proceden en su mayoría de terrenos áridos o de escasa cubierta vegetal y se dan particularmente durante las estaciones secas del año. En Sonora, los fuertes vientos transportan el polvo con trayectorias de Suroeste a Noreste. En Hermosillo, se han encontrado de 30 a 60 Kg/mes de polvo depositados por gravedad sobre el pavimento en superficies de 50 metros de largo

por 14 de ancho, que corresponderían a las dimensiones de una calle de la ciudad (Barajas, 1996).

En cuanto a las fuentes de contaminación atmosférica producto de la actividad humana, ocurren de dos tipos: fuentes móviles y fuentes fijas. Se refiere como fuentes móviles a la combustión de los vehículos automotores en circulación dentro del casco urbano, los cuales hasta 1994 totalizaban 152,000 unidades registradas (Gobierno del Estado de Sonora, 1994) incluyendo camiones urbanos, vehículos particulares y camiones de redilas. Se estima que en 1994 en Hermosillo se consumía un promedio diario de 1, 600,000 litros de combustible (Petróleos Mexicanos, 1994). Reportes de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S.E.P.A. por sus siglas en inglés) revelan que las calles no pavimentadas contribuyen hasta en un 78% a la generación de partículas suspendidas, las actividades de construcción en un 8% y las tolveneras en un 9% (U.S.E.P.A., 1990).

Las fuentes fijas de contaminación son todas aquellas instalaciones establecidas y cuyas actividades generan emisiones contaminantes a la atmósfera. En el caso de las industrias, la mayoría (74) se encuentran ubicadas en el Parque Industrial de Desarrollo, ubicado al Sureste de la ciudad. Sin embargo, existe un número importante de industrias y establecimientos de servicio con emisiones a la atmósfera instaladas dentro del casco urbano. En 1994 se reconocía la existencia de 103 industrias alimenticias, 18 industrias de transformación y 31 industrias de construcción (CANACINTRA, 1994).

4.2 Principales Enfermedades Respiratorias

Algunas de las principales enfermedades respiratorias causadas por el polvo en la ciudad de Hermosillo son: resfriado común, bronquitis, asma, influenza, pulmonía, faringitis crónica, tos crónica y tuberculosis.

El resfriado es una enfermedad presente todo el año, si bien es mucho más frecuente en los períodos de otoño-invierno. Este hecho no tiene nada que ver con que el cuerpo “se enfríe”, como es creencia común, sino con la mayor supervivencia de los virus en ambiente térmico frío y con la mayor tasa de contagio interpersonal, que se produce al aumentar el tiempo de cohabitación en espacios cerrados (De la Flor, 2009).

La bronquitis aguda es un término que define la infección o inflamación del tracto respiratorio bajo, acompañada de tos con o sin expectoración. La tos aguda debe diferenciarse de aquella que se presenta por lo menos hasta por 3 semanas y en la se han descartado como diagnóstico diferencial la neumonía y el asma (Contreras, 2010).

El asma se caracteriza por una inflamación crónica de las vías respiratorias que puede producir una obstrucción de las mismas, hiperrespuesta y síntomas clínicos de tos, sibilancias y disnea (Busse, 2001).

La influenza es una enfermedad respiratoria infecciosa aguda de origen viral, muy contagiosa, que debe vigilarse atentamente por la rapidez con que se propaga en fases epidémicas. A pesar de que a menudo aparenta ser una enfermedad benigna, la influenza es una enfermedad grave que provoca la muerte a miles de personas cada año (Secretaría de Salud, 2009).

La pulmonía o bien neumonía puede definirse como una lesión inflamatoria pulmonar en respuesta a la llegada de microorganismos a la vía aérea distal y parénquima (García y col., 2005)

La faringitis crónica es la inflamación repetida de la faringe, sin componente infeccioso, que puede ocasionar modificaciones permanentes y evolutivas, las cuales terminan lesionando la mucosa, submucosa, tejidos linfoides, músculos y sistema regional vasculo nervioso (Acuin, 1999).

La tos crónica es el síntoma más frecuente de las enfermedades respiratorias y debido a la contracción de la musculatura respiratoria se produce un aumento en la presión intratorácica y un estrechamiento de la tráquea que, en el momento en que se produce la reapertura parcial de la glotis, causa la expulsión brusca del aire. El flujo rápido de aire arrastra consigo las partículas agresoras (Velasco y col., 2004).

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas de mayor incidencia a nivel mundial y representa un serio problema de salud pública. Esta epidemia es transmitida principalmente por vía aérea a través de partículas suspendidas en el aire, debido a que las personas portadoras de *Mycobacterium tuberculosis* estornudan y tosen (Cascante y col., 2007).

4.3 La Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa aguda o crónica producida por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, también conocido como *bacilo de Koch* (The patient Education Institute, 2005). Esta infección ataca principalmente los pulmones, pero también puede atacar la mayoría de las partes del cuerpo, como articulaciones, huesos, nódulos linfáticos, riñones y también puede causar meningitis. La tuberculosis es transmitida de persona a persona a través del aire o por partículas de polvo, en la mayoría de los casos es la causa de muerte de

millones de personas en todo el mundo. Recientemente la OMS ha solicitado que inviertan más en el desarrollo de nuevos sistemas que permitan diagnosticar la tuberculosis, para combatir así la propagación de una enfermedad que tienen sin saberlo cerca de dos mil millones de personas (Ramirez-Córdova y col., 2012).

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* comprende micobacterias de crecimiento lento causantes de tuberculosis en animales y humanos, difíciles de diferenciar por métodos bacteriológicos convencionales. El género *Mycobacterium* comprende un grupo de microorganismos muy diversos, de amplia distribución en la naturaleza. Se han descrito más de 100 especies, 25 de las cuales han sido identificadas como agentes infecciosos frecuentes para el humano (Cortinas y col., 2002; Jiménez-Pajares y col., 2005).

Las micobacterias son un grupo microbiano característico por la producción de compuestos de naturaleza lipídica que le confieren propiedades únicas, incluyendo la impermeabilidad a fármacos. A la fecha son muy pocos los compuestos con una efectiva actividad antimicobacteriana que constituyen la base del tratamiento contra la tuberculosis y las micobacteriosis, es por esto que el panorama actual de surgimiento de tuberculosis multiresistente (MDR-TB) o extremadamente resistente (XDR-TB) es un problema de salud mundial (Herrera, 2012).

La infección de *Mycobacterium tuberculosis* latente es caracterizada por la presencia de respuesta inmune específica, control de la concentración bacilar, pero con la presencia de bacilos latentes (en estado estacionario) en el tejido necrótico. A medida que los macrófagos van drenando este tejido, los bacilos latentes se confunden con esta necrosis y son drenados hacia el espacio alveolar, dónde pueden reactivar su crecimiento de nuevo. De esta manera se mantiene la infección durante años (Arias, 2006).

La globalización ha permitido grandes avances en cuanto al diagnóstico, tratamiento y prevención de algunas enfermedades que causan alta morbilidad y mortalidad. Un ejemplo palpable es el avance en el mejor conocimiento de la

interrelación de *Mycobacterium tuberculosis* y el hospedero mediante la biología molecular, la bioingeniería en vacunas, la farmacodinamia y el aporte de la microbiología que, en su conjunto, han impactado en la evolución de los enfermos con tuberculosis (Secretaría de Salud, 2009).

La OMS ha estimado que un tercio de la población mundial padece tuberculosis latente y que del 5 al 10% de los individuos infectados desarrollarán la enfermedad activa durante su vida (World Health Organization, 2009). Los pacientes con tuberculosis activa, con baciloscopia positiva a tuberculosis pulmonar, son la principal fuente de infección en la comunidad (World Health Organization, 2009).

La actual epidemiología es un reflejo de las diferencias económico-sociales entre los países. Según la OMS, el 80 % de los tuberculosos se encuentran en 23 países, los cuales son prioritarios para la OMS y a la cabeza de ellos se encuentra la India con 1 847 000 nuevos casos por año (1999), grave problema para un país que como todos los demás vive en un mundo globalizado. Se entiende definitivamente que la tuberculosis debe ser considerada como un problema global, de tal manera que no se podrá hablar de control de la enfermedad hasta su desaparición total en el planeta (Harrison, 2003).

En México, como país en transición, con intenso movimiento socioeconómico y donde los cambios demográficos han originado la necesidad de reorientar las políticas públicas, se han asumido una serie de compromisos en la salud, compatibles con nuestra realidad y coincidiendo con organizaciones internacionales, con el objetivo de combatir enfermedades que aún siguen considerándose epidemias de la modernidad: paludismo, infección por VIH y tuberculosis (Secretaría de Salud, 2009).

La Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-006-SSA2-2010, para la prevención y control de la tuberculosis (sustituye a la NOM-006-SSA2-1993) en la atención primaria a la salud, establece que la tuberculosis es una enfermedad de notificación semanal obligatoria. La tuberculosis ocupa en México el lugar número

17 entre las causas de muerte y el primero como causa de muerte por un solo agente infeccioso (Secretaría de Salubridad y Asistencia, 1997).

En México, en el 2010 se presentaron 18,848 casos de tuberculosis en todas sus formas, de las cuales el 81.6% fue pulmonar (15,384 casos), 5.7% ganglionar, 1.6% meníngea y el 11.1% restante otras formas. De estos casos reportados, el 20% estuvo asociado a diabetes mellitus, 5.8% se presentó con el binomio TB/SIDA y 4.9% de los casos nuevos se detectaron en población pediátrica (Castellanos, 2010).

Para México la lucha contra la tuberculosis ha sido un principal objetivo del Sistema Nacional de Salud desde los años 30s. La campaña Nacional de tuberculosis ejecutada en los 60s fue sustituida en los 80s por el programa de acción tuberculosis, de estructura horizontal, con cobertura nacional cercana al 100%. Con programas establecidos como éstos por México, países como China han disminuido su incidencia en tuberculosis hasta en un 30%. Al mismo tiempo que los programas contra la tuberculosis se ejecutaban, se dieron profundos cambios socioeconómicos en la mayoría de los países en desarrollo (Barrera, 2010).

La epidemia de tuberculosis está siendo sostenida y alimentada por dos factores importantes: la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y su asociación con la enfermedad de tuberculosis activa, y el incremento de la resistencia de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos anti-tuberculosis más efectivos (World Health Organization, 2009). Otros factores que contribuyen son el aumento de la población mundial, detección poco oportuna y cura en países en desarrollo, transmisión activa en hospitales sobresaturados, el hacinamiento en prisiones y otros lugares públicos, la migración de individuos de países con alta incidencia debido a guerras o hambre, abuso de drogas, la decadencia social y la falta de vivienda (World Health Organization, 2009).

La disminución en la prevalencia de la tuberculosis en el mundo desarrollado durante los últimos años se ha visto acompañada por un aumento en

la frecuencia de infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas. No está muy claro si esto corresponde con un aumento real en la prevalencia de la enfermedad o se debe a que las micobacteriosis están siendo reconocidas con más frecuencia por los médicos, aunado a una mayor capacidad de los microbiólogos para detectar e identificar las micobacterias más inusuales y de difícil aislamiento (Godoy y col., 2008).

Por lo que respecta a Sonora, en el período 2000 – 2005 se han registrado 3,663 casos nuevos de tuberculosis pulmonar, observándose una tendencia al ascenso, en el año 2000 se diagnosticaron 476 casos nuevos, y 793 en el año 2005 (López, 2010). La Secretaría de Salud reportó que el Estado de Sonora ocupaba el cuarto lugar nacional en incidencia por tuberculosis. Por otro lado la Ciudad de Hermosillo concentra la mayor carga de morbilidad causada por la enfermedad en el estado. A pesar de esfuerzos para reducir su transmisión, la tendencia se ha mantenido estable, durante las últimas dos décadas, y la incidencia 2009 (33.2/100,000) es superior a la media nacional (16.8/100,000) (Secretaría de Salubridad y Asistencia, 2009).

4.4. Técnicas de Biología Molecular

La introducción de técnicas moleculares para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* en la rutina del laboratorio clínico ha proporcionado ventajas respecto a la identificación fenotípica como lo son la reducción del tiempo del análisis de los aislamientos clínicos (36 a 72 horas en lugar de 3 a 6 semanas) y la identificación definitiva no depende de criterios subjetivos, ya que en condiciones óptimas puede detectar de 1-10 microorganismos en un tiempo mucho menor al cultivo (Cortinas y col., 2002).

El PCR es una técnica de biología molecular que permite amplificar exponencialmente una secuencia específica del ácido desoxirribonucleico (ADN) que puede ser detectada tras electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro

de estudio (Altamirano, 1992). Este procedimiento consiste en amplificar exponencialmente una cantidad pequeña de ADN mediante ciclos repetidos de síntesis, dirigidas por iniciadores o cebadores que se alinean a sitios específicos de la región requerida de ADN. La técnica es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de ADN micobacteriano en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis (Alberts, 2002).

La idea de amplificar repetidamente el ADN fue en principio publicada en 1971, pero no fue explotada hasta que Kary Mullis ideara un método de amplificación con suficiente potencial (Cho, 2007). La técnica es sensible y rápida, reemplazando a menudo los procedimientos de clonación, y además es tolerante para muestras de ADN de pobre calidad (Alberts, 2002; Sambrook y Russell, 2001).

El mecanismo de PCR es similar al empleado por las células durante su replicación; la desnaturalización capacita a la enzima polimerasa a generar una copia complementaria a la cadena de ADN a partir de desoxirribonucleótidos (dNTPs) en solución. La síntesis de dichas cadenas se comienza a partir de la posición de cada iniciador o cebador, que lleva a una segunda ronda de síntesis. Entonces se realizan ciclos repetidos de desnaturalización, alineación y extensión, que incrementan de forma potencial la secuencia de ADN ubicada entre los dos iniciadores, con duplicación del producto en cada ciclo. Teóricamente, luego de 25 ciclos repetitivos, se puede obtener aproximadamente 1 millón de copias del producto (Primrose y col., 2001; Sambrook y Russell, 2001).

Una de las ventajas de las técnicas basadas del PCR sobre las técnicas cromatográficas y otros métodos, es su aplicabilidad directa a las muestras clínicas, tales como muestras de expectoración, cuando las muestras poseen suficientes bacilos para dar positiva la tinción ácido-resistente (Cho, 2007). Sin embargo, se han reconocido dos grandes obstáculos al éxito de la técnica de PCR; las dificultades relacionadas con la ruptura de la pared celular micobacteriana y la extracción del ADN, y la presencia de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La manipulación necesaria en la

mayoría de los protocolos de extracción del ADN descritos los hace propensos a la contaminación cruzada de las muestras (Small, 1993).

Las técnicas de amplificación genética son altamente sensibles (70-100%) y específicas (80-100%), y bajo condiciones óptimas pueden detectar de 1 a 10 organismos; y si los sistemas están estandarizados adecuadamente, evaluados y se toman precauciones para evitar la contaminación, los ensayos pueden ser muy útiles en la confirmación temprana en el diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar (Katoch, 2004).

A pesar de que el PCR es un proceso simple, nada ha tenido más impacto, con la excepción del aislamiento de las enzimas de restricción, en el estudio y aplicación de la biología molecular, ya que puede ser utilizada para clonar genes, crear librerías genómicas y obtener cantidades considerables de ADN para emplear en secuenciación y análisis específicos (Micklos, 2003). Además, la amplificación específica in vitro, de regiones del genoma del patógeno, permite un diagnóstico rápido de tuberculosis con un mayor grado de sensibilidad y especificidad que los métodos tradicionales (Gay y col., 2006).

4.5. Extracción de Ácido Desoxirribonucleico

Los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar análisis específicos de modificaciones genéticas mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La calidad y la pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis. Si se desea obtener ácidos nucleicos muy purificados, que no contengan contaminantes inhibidores, es preciso aplicar métodos de extracción adecuados (Somma, 2007).

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células. El procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un

equilibrio de técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo (un tejido, por ejemplo), pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico. Entre los procedimientos usuales de lisis figuran los siguientes: rotura mecánica como trituración o lisis hipotónica, tratamiento químico como detergentes y agentes caotrópicos. Es posible romper la membrana celular e inactivar las nucleasas intracelulares al mismo tiempo (Somma, 2007).

Se propuso el protocolo en el cual el rompimiento de la pared celular se produce mediante fraccionamiento mecánico con perlas de vidrio, seguido por una purificación usando una mezcla de fenol-cloroformo. Sin embargo, cuando se procesa un gran número de muestras, el uso de perlas de vidrio es insuficiente (Hoffman – Winston, 1987). Por otra parte el protocolo de extracción de ADN, donde el rompimiento celular se lleva a cabo mediante lisis con la enzima Zimolasa, la liberación del ADN no requiere el uso de fenol-cloroformo. Esta metodología ha sido ampliamente acogida ya que elimina el uso del fenol (Querol y col., 1992).

4.6. Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN en las muestras extraídas es importante, ya que es recomendable que aproximadamente la misma cantidad de ADN se puede usar cuando se comparan diferentes muestras. Hay varios procedimientos de cuantificación de uso común, sin embargo, incluyendo espectrofotometría (NanoDrop; Thermo Scientific), análisis de micro fluidos (Bioanalyzer Agilent Technologies, Bio-Rad Experion Laboratories), electroforesis en gel capilar (QIAxcel de Qiagen), o detección de tinte fluorescente (Ambion/Applied Biosystems 'RiboGreen). Los métodos producen resultados diferentes, por lo que sería erróneo tratar de comparar los datos obtenidos con los diferentes métodos (Fleige y col., 2006).

La relación A260/A280 debe ser medida con un buffer a pH neutro, pero dicha medición no es suficiente si el ácido nucleico se va a utilizar para el análisis cuantitativo, especialmente cuando el objetivo es medir diferencias de menor importancia en concentraciones de ácido ribonucleico (ARN) celulares.

La relación de absorbancia sí proporciona una indicación de la pureza del ARN, porque la presencia de ADN o residuos de fenol altera la relación (Doma y col., 2007).

$$\text{Pureza} = \frac{\text{Abs260}}{\text{Abs280}}$$

Si la relación obtenida se encuentra entre 1.7 y 2.0 la preparación de ADN se considera adecuadamente libre de impurezas. Una relación menor indica contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol u valores por encima de 2 indican que hay ARN disperso (Müller y Schweizer, 1996).

El grado de degradación del ADN puede ser estimado por electroforesis, en geles de agarosa, de una alícuota de la muestra. El ADN de alto peso molecular aparece como banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pozos, mientras que el material parcialmente degradado, forma un barrido de fragmentos pequeños a lo largo del carril haciendo que la definición de la banda citada, pierda su nitidez o no se aprecie (Shamsi y col., 2010; Valadez, 2000).

4.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La técnica se basa en la repetición de ciclos de síntesis de ADN dirigida por oligonucleótidos para realizar la replicación in vitro de las secuencias de ácidos nucleicos. Estos oligonucleótidos, cuya secuencia viene determinada por el ácido nucleico, se sintetizan para ser complementarios de sus zonas de alineamiento dentro de las dos diferentes hebras (hebra + y -) de la secuencia. La distancia entre los primers se determina empíricamente y depende de numerosos factores; el intervalo habitual entre primers para ensayos diagnósticos es entre 50 y 1.500 bases.

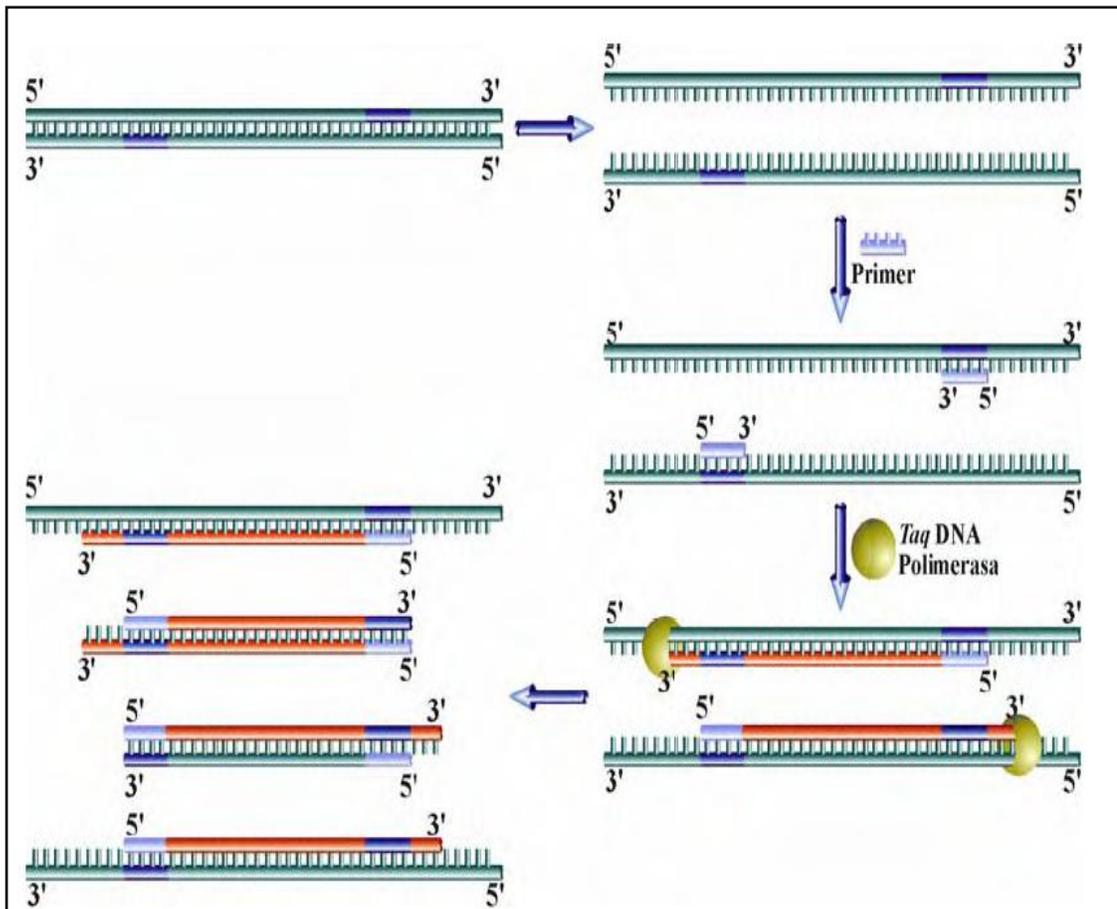
En su forma más básica, cada ciclo de PCR consta de tres pasos:

- Etapa de desnaturalización. El ADN se incuba a elevada temperatura ($\pm 94^{\circ}\text{C}$) de tal manera que las hebras se separan quedando accesibles a la hibridación de los primers.
- Etapa de alineamiento. La mezcla de reacción se enfría ($\pm 55 - 65^{\circ}\text{C}$) para permitir que los primers hibriden con la secuencia complementaria.
- Etapa de extensión. Se suele realizar a $\pm 72^{\circ}\text{C}$ y en ella los primers se extienden mediante el ADN polimerasa, utilizando el ADN como molde, realizándose entre 30 y 50 ciclos en cada reacción.

Durante todos los ciclos de amplificación, las reacciones de extensión de los primers finalizan a diferentes distancias de los mismos, originando productos de amplificación de diferentes longitudes. No obstante, después del segundo ciclo de amplificación, los "productos cortos" empiezan a acumularse y rápidamente se convierte en el producto predominante. El punto de partida óptimo del proceso de identificación de una secuencia para la detección de un determinado patógeno o agente infeccioso es la literatura. La relativa facilidad con la que actualmente se puede clonar y secuenciar los ácidos nucleicos ha originado una explosión de información de secuencias disponibles y la tendencia de depositar dicha

información de las secuencias directamente en bancos de datos de ácidos nucleicos (Griffin, 1994).

En la Figura 1 se muestra la explicación del PCR, en el primer ciclo se utiliza como molde una secuencia de dsDNA. Las dos hebras se desnaturalizan por calor ($\pm 94^{\circ}\text{C}$) y los dos oligonucleótidos sintéticos (primers) hibridan con sus respectivas secuencias en dirección 5' y 3' (los extremos 3' de ambos primers quedan enfrentados). La Taq ADN polimerasa inicia la síntesis en el extremo 3' de cada primer (por lo tanto, en dirección 5' y 3') originando nuevos sitios de unión para los primers.



Fuente: www.cultek.com

Figura 1. Reacción en Cadena de la Polimerasa

4.8. Componentes de la Reacción

4.8.1. Los nucleótidos

Los nucleótidos se diluyen en agua, la solución debe ser protegida (por ejemplo con el 10mM Tris pH 7,7-8,0 concentración final). Si no, un pH ácido promoverá la hidrólisis del desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) en desoxirribonucleótidos difosfato (dNDP) y desoxirribonucleótidos múltiple (dNMP) y los hará inútiles para las reacciones de polimerización del ADN enzimático. Los stocks son diluidos a 10 mM, alicuotados y almacenados a -20 °C. Es recomendado usar un stock de trabajo que contenga 1mM de cada dNTP. La estabilidad de los dNTP durante ciclos repetidos de PCR es tal que aproximadamente el 50% permanece como dNTP después de 50 ciclos (Cortazar y col., 2004).

4.8.2. Primers

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN. La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa (Cortazar y col., 2004).

Cuando el objetivo a amplificar es un locus, la posición de los iniciadores debe ser relativa a los codones de inicio y terminación. Es recomendable que el cebador "forward" se encuentre más o menos a 35 pares de bases (pb) del inicio de la secuencia que codifica, de la misma forma el cebador "reverse" debe localizarse 35 pb después de la región que codifica (Cortazar y col., 2004).

Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5 μ M. Altas concentraciones de primer pueden promover "mispriming" y acumulación de producto no específico y puede incrementar la probabilidad de

generar un templado independiente llamado dímero de primer. Los productos no específicos y los dímeros de primers son por si mismos sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs y primers, resultando en un bajo rendimiento del producto deseado (Cortazar y col., 2004).

La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del ADN que será amplificado. Un diseño de primer con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados. Sin embargo, el mismo primer puede dar una sola banda si se amplifica una sola clonación de una biblioteca genómica (Cortazar y col., 2004).

4.8.3. Templado

Una de las características más atractivas del PCR es que la cantidad y calidad de la muestra de ADN sujeta a amplificación no necesita ser alta. El criterio esencial es que la muestra contenga al menos una cadena de ADN intacta que abarque la región que va a ser amplificada y que las impurezas sean suficientemente diluidas como para no inhibir la polimerización (Cortazar y col., 2004).

4.8.4. La Polimerasa

Un rango de concentración recomendado para Taq polimerasa es entre 1 y 2.5 unidades (SA = 20 unidades/pmol) por 100 μ L de reacción cuando los otros parámetros son óptimos. Sin embargo, los requerimientos de enzima pueden variar con respecto a la secuencia blanco o los primers. Cuando se optimiza un PCR, se recomienda probar rangos de concentración de enzima de 0.5 a 5 unidades/100 μ l. Si la concentración de la enzima es muy alta se acumulan

productos no específicos, y si es muy baja se formara una cantidad insuficiente del producto deseado (Cortazar y col., 2004).

Inicialmente en 1971, 1974 y a partir de 1985, el PCR se realizaba con el fragmento Klenow de *Escherichia coli*, que es una ADN polimerasa termolábil. Esto significa que había que añadir enzima después de cada paso de desnaturalización (94°C), ya que dicha temperatura inactiva a Klenow. Posteriormente en 1988, la técnica se optimizó con la introducción de una ADN polimerasa termoestable aislada de *Thermus aquaticus*, y conocida comercialmente como Taq (nativa) y AmpliTaq, modificada por ingeniería genética de Perkin-Elmer (Dorado, 2006).

El PCR consta de tres pasos:

Desnaturalización

La primera etapa consiste en la desnaturalización del ADN, separándose las dos cadenas por ruptura de los puentes de hidrógeno. Las condiciones típicas de desnaturalización son 95 °C por 30 segundos, o 97 °C por 15 segundos; sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en Guanina y Citocina (G + C).

La desnaturalización incompleta permite el apareamiento de las hebras de ADN y por lo tanto se reduce el rendimiento del producto. En contraste, los pasos de desnaturalización a altas temperaturas o por mucho tiempo provocan pérdida de la actividad de la enzima (Cortazar y col., 2004).

Alineamiento

La segunda reacción consiste en la hibridación de los primers. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los primers a las cadenas.

La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers dependen de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores. Una temperatura de alineamiento óptima es 5 °C por debajo de la temperatura de melting (T_m) de los primers. Debido a que las ADN polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los primers puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento. El rango de actividad de las enzimas varía en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85 °C. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72 °C generan buenos resultados (Cortazar y col., 2004).

Extensión

La tercera reacción se efectúa a 72 °C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde.

El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión de la secuencia se realiza tradicionalmente a 72 °C. Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 72 °C varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kb de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima (Cortazar y col., 2004).

Número de Ciclos

Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo unas 40 veces, por ejemplo, permite obtener, como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés.

El número óptimo de ciclos dependerá principalmente de la concentración inicial del templado cuando los otros parámetros son optimizados. Un error común es el de ejecutar demasiados ciclos, ya que esto puede incrementar la cantidad y complejidad de productos no específicos. Pocos ciclos dan como resultado un bajo rendimiento del producto (Cortazar y col., 2004).

4.9. Electroforesis

La electroforesis capilar en gel (CGE) es la transposición de la electroforesis en gel de poliacrilamida o de agarosa. El capilar contiene un electrolito que contiene dicho gel. Se produce un efecto de filtración que ralentiza a las moléculas y minimiza los fenómenos de convección o de difusión. Los oligonucleótidos, poco frágiles, se pueden separar de este modo (Morales, 2008). El ADN de alto peso molecular aparece como banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pozos, mientras que el material parcialmente degradado, forma un barrido (o bien mancha) de fragmentos pequeños a lo largo del carril haciendo que la definición de la banda citada, pierda su nitidez o no se aprecie (Valadez, 2000).

Asimismo la electroforesis en gel es una técnica consistente en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel. La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos en ambos extremos del gel. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad con que un campo eléctrico puede desplazarla a través de un medio gelatinoso. Muchas macromoléculas biológicas importantes como los aminoácidos, los péptidos, las proteínas, los nucleótidos y los ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables y, a un pH determinado, existen en solución como especies cargadas eléctricamente, sean cationes (+) o aniones (-). Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo. Así, cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, los grupos fosfato del ADN cargados negativamente lo harán migrar hacia el ánodo (Westermeier, 1997).

4.10. Problemas de Contaminación Relacionados con la Micobacterias

Mycobacterium gordonae es un microorganismo presente en el ambiente, habitualmente presente en la tierra y el agua, así como en el medio hospitalario, donde se han documentado aislamientos en el agua del grifo, máquinas de hielo y broncoscopios. También se han registrado contaminaciones de laboratorio, por ejemplo a través del suplemento antibiótico comercial Panta, de uso habitual con el sistema Bactec para la descontaminación de muestras clínicas (Palacios, 2010).

Mycobacterium gordonae fue denominado así en honor de Ruth E. Gordon por Bojalil en 1962. Anteriormente era conocido como “bacilo del agua del grifo” y como *Mycobacterium aquae* denominado por Valerio Galli en 1912, aunque estudios posteriores determinaron que esta última cepa presentaba características que correspondían mejor con las de *Mycobacterium smegmatis* (Palacios, 2010).

Si se tiene en cuenta la amplia difusión de este microorganismo en la naturaleza y que son pocos los casos clínicos publicados atribuibles a *Mycobacterium gordonae*, parece razonable asumir una extraordinariamente baja patogenicidad de este microorganismo. De hecho, habitualmente, se le considera como no patógeno, colonizador de la superficie corporal y contaminante potencial de los medios de cultivo. Solamente en circunstancias excepcionales se ha comportado como un patógeno oportunista. *Mycobacterium gordonae*, junto con el complejo *Mycobacterium avium*, son las micobacterias ambientales potencialmente patógenas más frecuentemente identificadas en los laboratorios de micobacterias de los Estados Unidos (Arnow y col., 2000).

V. METODOLOGÍA

5.1. Obtención de las Muestras

Para el presente estudio se utilizaron filtros del muestreo de partículas suspendidas en el aire PM_{10} , proporcionados por el Instituto Municipal de Ecología (IME). Los filtros utilizados son de micro fibra de cuarzo con un tamaño de 20.3 cm por 25.4 cm y un espesor de 0.45 mm. El porcentaje de retención de partículas de $0.3 \mu m$ es de un 99.95 %.

Las muestras se obtuvieron de los filtros de las 4 estaciones de monitoreo de aire de la ciudad de Hermosillo, donde se encuentran operando los muestreadores de partículas de alto volumen (modelo Wedding 600). El muestreo se realizó durante 3 períodos: Febrero, Abril-Mayo y Agosto-Septiembre del 2011. Se seleccionaron 6 muestras de cada filtro de cada estación por 4 semanas durante cada período para realizar el estudio de las partículas del aire en los filtros muestreados, utilizando técnicas de biología molecular para buscar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

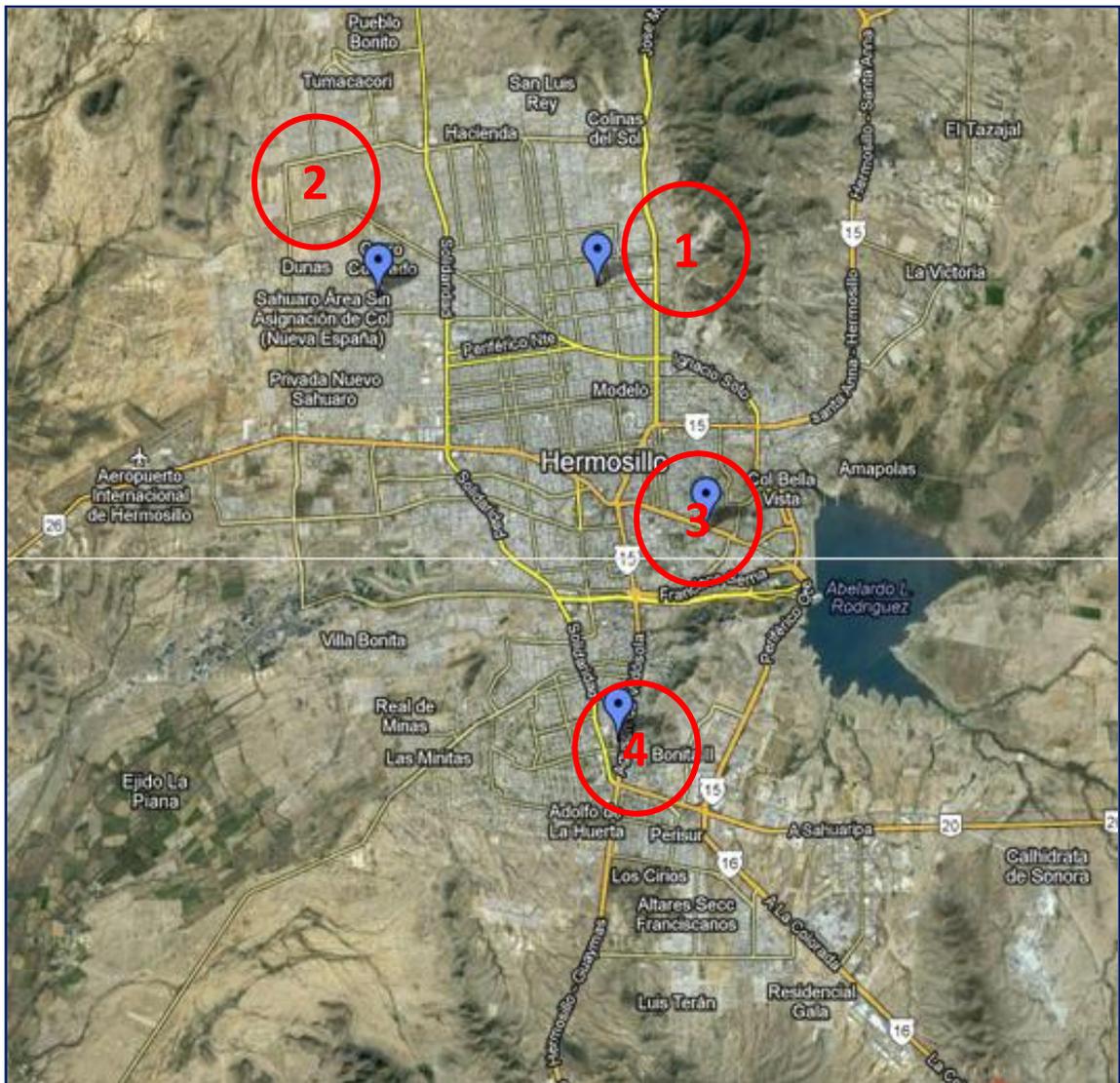
5.2. Sitios de Muestreo de Partículas

El Instituto Municipal de Ecología tiene operando los muestreadores en 4 sitios estratégicamente distribuidos en la Ciudad, (Figura 2) estos son:

1. Universidad del Estado de Sonora (UES), ($29^{\circ} 07' 17.70''$ N y $110^{\circ} 57' 40.12''$ O) ubicado en Ley Federal del Trabajo y Calle 3 en la Colonia Apolo en el Norte de la Ciudad.
2. Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicios (CBTIS 206), ($29^{\circ} 07' 07.25''$ N y $111^{\circ} 00' 23.86''$ O) ubicado en Colombia y Pótam s/n Fraccionamiento Camino Real, al Noroeste de la Ciudad.

3. Edificio de la Dirección de Inspección y Vigilancia del Ayuntamiento de Hermosillo, ($29^{\circ} 04' 44.01''$ N y $110^{\circ} 56' 31.91''$ O) ubicado en Morelia 220 entre Carbó y Palma, Colonia Casa Blanca, en el Centro de la Ciudad.

4. Colegio de Bachilleres Plantel Villa de Seris, ($29^{\circ} 02' 40.15''$ N y $110^{\circ} 57' 30.46''$ O) ubicado en Agustín de Vildósola Final Sur, al Sur de la Ciudad.



Fuente: <https://maps.google.com.mx/>

Figura 2. Sitios de muestreo ubicados en la Ciudad de Hermosillo, Sonora.

5.3. Extracción de ADN

Se utilizó el método de Gene Clean para extraer el ADN de los filtros.

1. Romper la célula: Paso de Lisis
2. Capturar ADN: Mediante sílica o matriz (Gene Clean)
3. Lavados para eliminar proteínas: Solución de lavado (Etanol)
4. Recuperar ADN: Se utilizó agua, ya que rompe el enlace de sílica y ADN por las cargas contrarias.

El protocolo de “Gene Clean” se muestra en el Anexo I.

5.4. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN obtenido, se realizó mediante un espectrofotómetro NANO DROP 2000c marca Thermo Scientific, empleado para cuantificación de las concentraciones de ácidos nucleicos y proteínas utilizando solo 1 μL de muestra. Este equipo utiliza un diseño basado en el pipeteo de micro volúmenes directamente sobre la superficie de un pedestal plano. El resistente material de los pedestales los hace compatibles con la mayoría de los solventes comúnmente usados en los laboratorios, y con soluciones de pH extremo. Su sistema de retención de muestra aprovecha la Tensión superficial para formar un puente de líquido entre el pedestal inferior y un pedestal superior.

Para evaluar la pureza del ADN obtenido por cada muestra, se obtuvieron los valores de absorbancia a 260 nm que es la longitud de onda de absorción máxima del ADN y 280 nm que es la longitud de onda de absorción máxima de las proteínas (principal impureza en preparaciones de ADN), en un biofotómetro para poder evaluar la pureza de los ácidos nucleicos en la muestra, y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza} = \frac{\text{Abs260}}{\text{Abs280}}$$

Se realizó la cuantificación de cada muestra por triplicado, en el NanoDrop (espectrofotómetro marca Thermo Scientific), para ver la calidad de la extracción de ADN.

Protocolo:

- Se limpia el pedestal aplicando 1 μL de blanco.
- Se aplica un volumen de muestra de 1-2 μL .
- Limpieza de los pedestales superior e inferior con papel convencional de laboratorio, para la siguiente lectura.



5.5. Diseño de Primers

El diseño de primers se realizó en base a la secuencia IS6110 obtenida del Banco de Datos de Proteínas (GeneBank) [[>gi|48695|emb|X17348.1](#)] *Mycobacterium tuberculosis*. A partir de ahí se realizó el análisis bioinformático para verificar que la secuencia correspondiera solo a la *Mycobacterium tuberculosis*, descartando la similaridad entre algún otro organismo utilizando BLAST y CLUSTAL (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Además se utilizó el software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para diseñar los primers en base a la secuencia obtenida del trabajo de bioinformática.

5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se realizaron varios PCR con el fin de amplificar los segmentos de ADN para identificar *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras de los filtros proporcionados por el Instituto Municipal de Ecología (IME).

En las primeras pruebas se utilizó el termociclador de tiempo real, ROTOR GENE RG-3000, se realizaron diferentes PCR de pruebas para la amplificación de fragmentos de bacterias tipo vibrio (All Vibrio), con el fin de encontrar segmentos de ADN de diferentes bacterias. Las condiciones para los PCR se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Protocolo utilizado para el PCR con muestras de filtros, utilizando primers de All Vibrio.

Desnaturalización	95 °C	5 min	1 ciclo
Amplificación	95 °C	30 s	35 ciclos
	60 °C	30 s	
	72 °C	1 min	
Extensión Final	72 °C	5 min	1 ciclo
Melting	95 °C	5 s	1 ciclo
	65 °C	1 min	
	97 °C		

Para la reacción de PCR se utilizaron los *primers* All Vibrio y se preparó la mezcla de agua DEPC (Anexo II) y el reactivo iQ SYBR® Green Supermix. Utilizando las siguientes cantidades para la reacción con 2.0 µL ADN de muestra:

7.5 µL Master Mix (iQ SYBR)

4.5 µL H₂O DEPC

0.5 µL Primer Forward

0.5 µL Primer Reverse

2.0 µL ADN de muestra

En las últimas pruebas se utilizó el termociclador de tiempo real, Light Cycler 480II (ROCHE), para los PCR de pruebas de amplificación de los segmentos de ADN de la *Mycobacterium tuberculosis*. Las condiciones para los PCR se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Protocolo utilizado con primers Lcp13 para tuberculosis con 40 ciclos de amplificación.

Desnaturalización	95 °C	5 min	1 ciclo
Amplificación	94 °C	30 s	40 ciclos
	65 °C	30 s	
	72 °C	1 min	
Extensión Final	72 °C	7 min	1 ciclo
Melting	95 °C	5 s	1 ciclo

Para la reacción de PCR se utilizaron los primers Lcp13 que corresponde a un fragmento de la región intergénica de la enzima llamada IS6110. Se prepararon los primers RV, los primers FW, reactivo iQ SYBR® Green Supermix (BioRad) y la mezcla de agua DEPC (Anexo II). Se utilizaron las siguientes cantidades para la reacción:

7.5 µL Master Mix (iQ SYBR)

3.5 µL H₂O DEPC

0.5 µL Primer Forward

0.5 µL Primer Reverse

3.0 µL ADN de muestra

Se utilizaron diferentes condiciones para los PCR para hacer una comparación entre resultados y lograr el protocolo más óptimo para la amplificación de *Mycobacterium tuberculosis*. En este caso se utilizaron las condiciones que se muestran en la Tabla 3:

Tabla 3. Protocolo utilizado con primers Lcp13 para identificar *Mycobacterium tuberculosis* con 15 ciclos de amplificación.

Desnaturalización	95 °C	5 min	1 ciclo
Amplificación	95 °C	30 s	15 ciclos
	65 °C	30 s	
	72 °C	1 min	
Extensión Final	72 °C	7 min	1 ciclo
Melting	95 °C	5 s	1 ciclo

5.7. Electroforesis

Con el fin de estimar el grado de degradación de una alícuota de muestra, se lleva a cabo la electroforesis en geles de agarosa.

Después de terminar la parte de la amplificación por medio del PCR, se llevo a cabo la electroforesis, utilizando un gel comercial previamente preparado marca (Ultra pure, Invitrogen) al 1.5% con bromuro de etidio (BrEt) (0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$), a 100 voltios por hora, para obtener las bandas positivas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los productos de la extracción son visualizados y documentados en el gel empleado, el cual se compone de agarosa al 1.5%, con luz UV utilizando el foto documentador KODAK Gel Logic 100 Imaging System (Eastman Kodak), se obtiene la imagen de las bandas. Se coloca el gel en una cámara de electroforesis que trabaja a 120 volts, se le da una “pre-corrída” de dos minutos, se agregan 10 μL de cada muestra en los carriles del gel y se realiza la electroforesis por un período de 15 minutos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Muestras Obtenidas

De acuerdo al objetivo del trabajo de evaluar la técnica de PCR para detectar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, en las partículas del aire en 4 estaciones de la ciudad de Hermosillo, durante tres períodos en el 2011, se realizaron dichos muestreos seleccionando 6 muestras de cada filtro de cada estación por 4 semanas durante cada período. Se obtuvieron un total de 288 muestras al finalizar los 3 períodos de muestreo.

6.2 Extracción de ADN

La extracción del ADN de las muestras se realizó de acuerdo al muestreo establecido. Se obtuvieron 24 muestras por cada semana durante un mes en cada período de muestreo. Se utilizó el método de Gene Clean (Ver Anexo I). Después se realizaron extracciones por duplicado de las 24 muestras semanales, con el fin de comparar resultados en la cuantificación de ADN así como también contar con más cantidad de ADN para futuras pruebas. A estas 24 muestras semanales se le realizaron las pruebas de cuantificación para obtener la concentración de ADN, así como el grado de pureza.

Este procedimiento se considera como el segundo paso crítico (Morrogh, 2007), debido a que la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos depende de homogenización adecuada, el tipo de muestra, la densidad del destino y el estado fisiológico.

6.3 Cuantificación de ADN

En la Figura 3 y 4, se observa el promedio de las concentraciones (ng/uL) de ADN que corresponden al primer período de muestreo y segundo período respectivamente. En el primer período de muestreo se obtuvo una recuperación favorable de ADN, así como también una pureza adecuada con un promedio de 2.15, y en el segundo período de muestreo, los resultados muestran una pureza con promedio igual a 2.30. Si la relación obtenida se encuentra entre 1.7 y 2.0 la preparación de ADN se considera adecuadamente libre de impurezas. Una relación menor indica contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol y valores por encima de 2 indican que hay ARN disperso (Müller y Schweizer, 1996).

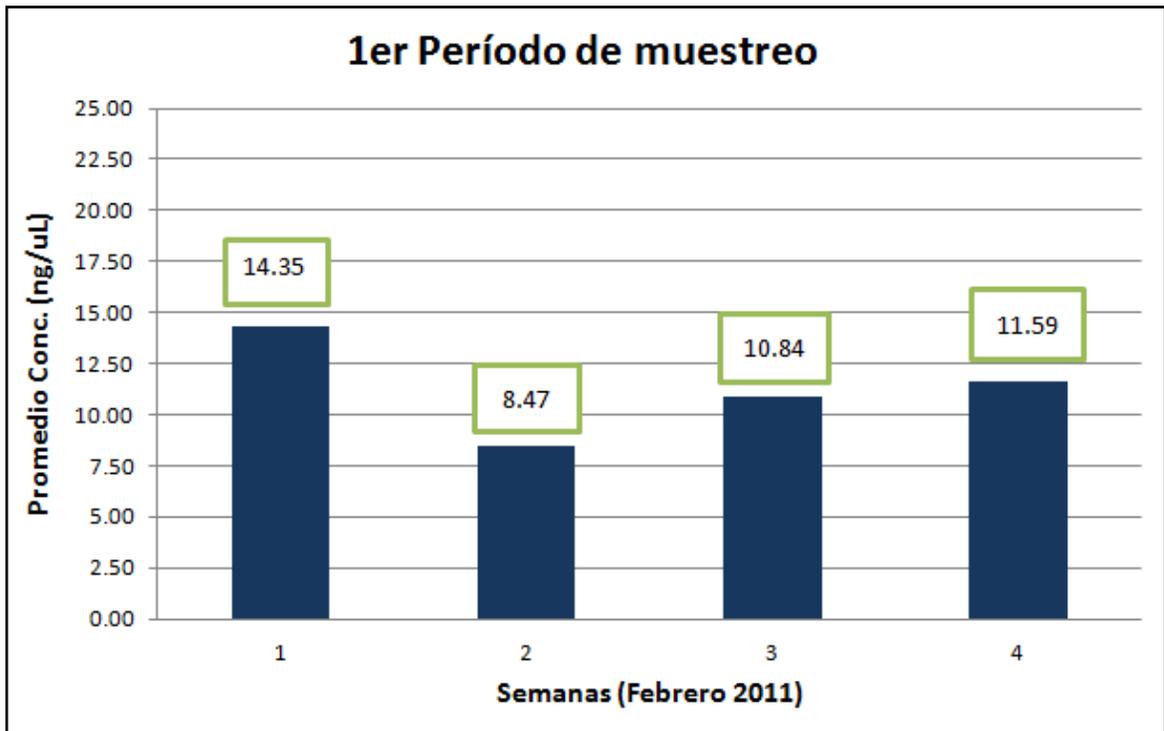


Figura 3. Promedio de concentraciones (ng/uL) de ADN de las muestras que corresponden al primer período de muestreo.

Estos resultados muestran que existe un contenido de concentración de ADN y que fue efectiva la extracción en filtros. Ya que se esperaba una concentración baja alrededor de 5 a 10 nanogramos por tratarse de filtros. También se puede observar el mismo caso en la Figura 4.

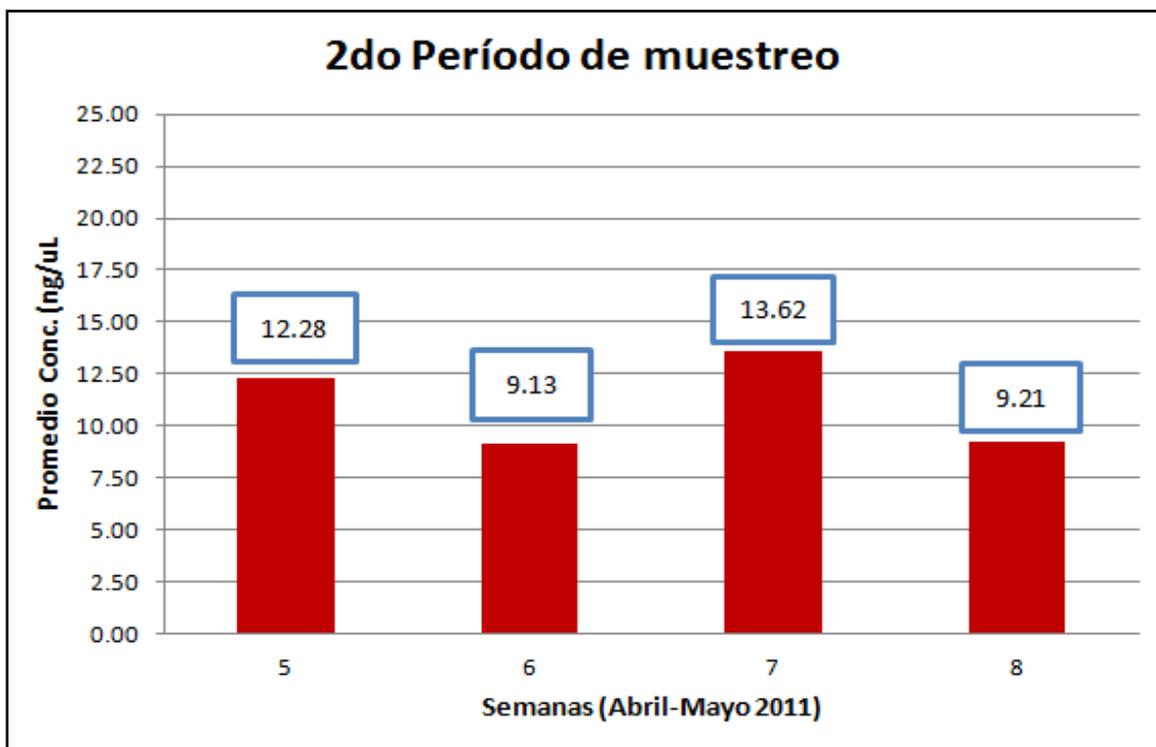


Figura 4. Promedio de concentraciones (ng/uL) de ADN de las muestras que corresponden al segundo período de muestreo.

El último período de muestreo fue durante los meses de Agosto y Septiembre. También se obtuvieron concentraciones de ADN favorables como se muestra en la Figura 5. En el tercer período de muestreo, los resultados muestran una pureza con promedio igual a 1.98. Al igual que los períodos anteriores, los resultados muestran cantidades de pureza adecuada acercándose al rango considerado libre de impurezas en estudios previos.

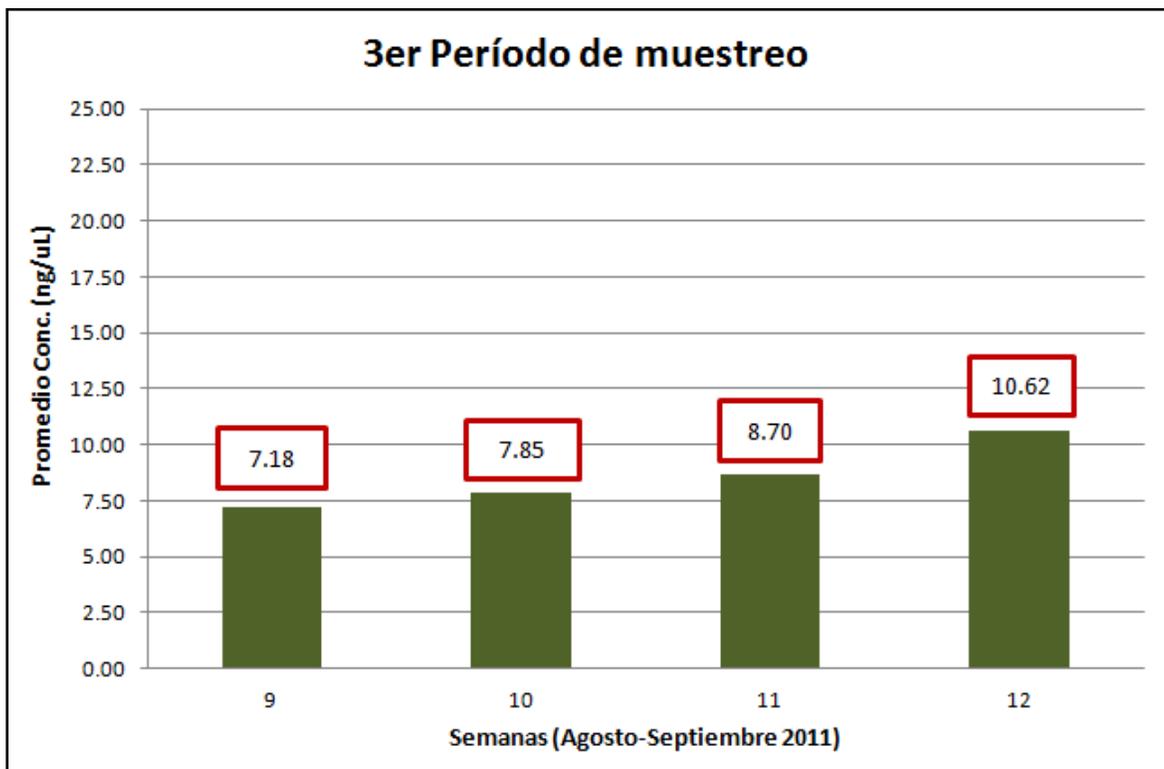


Figura 5. Promedio de concentraciones (ng/uL) de ADN de las muestras que corresponden al tercer período de muestreo.

6.4 Obtención de Primers

La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del ADN que será amplificado. La secuencia de *Mycobacterium tuberculosis* empleada para el diseño de primers se observa en la Figura 6 de forma resaltada. En los muestras de los filtros no se obtuvo esta secuencia.

Las secuencias de los primers obtenidos con el software Primer3 (en: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) se muestran a continuación:

Forward TB 5` -CGTGAGGGCATCGAGGTGGC

Reverse TB 5` -TTTGTACCCGACGCCTACG

```
>gi|48695|emb|X17348.1| Mycobacterium tuberculosis IS6110 IS-like element
CGATGAACCGCCCCGGCATGTCCGGAGACTCCAGTTCTTGGAAAGGATGGGGTCATGTCAGGTGGTTCATCGA
GGAGGTACCCGCCGGAGCTGCGTGAGCGGGCGGTGCGGATGGTTCGAGAGATCCGCGGTTCAGCACGATTCGGA
GTGGGCAGCGATCAGTGAGGTCGCCCCGTCTACTTGGTGTGGCTGCGCGGAGACGGTGCCTAAGTGGGTGCGC
CAGGCGCAGGTCGATGCCGGCGCACGGCCCCGGGACCACGACCGAAGAATCCGCTGAGCTGAAGCGCTTAGCGG
CGGGACAACGCCGAATTGCGAAGGGCGAACGCGATTTTAAAGACCGCGTCGGCTTTCTTCGCGGCCGAGCTCG
ACCGGCCAGCACGCTAATTAACGGTTCATCGCCGATCATCAGGGCCACCGCGAGGGCCCCGATGGTTTGCGGT
GGGGTGTGCGAGTCGATCTGCACACAGCTGACCGAGCTGGGTGTGCCGATCGCCCCATCGACCTACTACGACCA
CATCAACCGGGAGCCCAGCCGCCGCGAGCTGCGCGATGGCGAACTCAAGGAGCACATCAGCCGCGTCCACGCC
GCCAACTACGGTGTTCACGGTCCCCGCAAAGTGTGGCTAACCCTGAACCGTGAGGGCATCGAGGTGGCCAGAT
GCACCGTCGAACGGCTGATGACCAAACCTCGGCCTGTCCGGGACCACCCGCGCAAAGCCCGCAGGACCACGAT
CGCTGATCCGGCCACAGCCCGTCCC GCCGATCTCGTCCAGCGCCGCTTCGGACCACCAGCACCTAACCGGCTG
TGGGTAGCAGACCTCACCTATGTGTCGACCTGGGCAGGGTTCGCTACGTGGCCCGTTTGTACCCGACGCCTACG
TCGCAGGATCCTGGGCTGGCGGGTGCCTTCCACGATGGCCACCTCCATGGTCCCTCGACGCGATCGAGCAAGCC
ATCTGGACCCGCCAACAAGAAGGCGTACTCGACCTGAAAGACGTTATCCACCATACGGATAGGGGATCTCAGT
ACACATCGATCCGGTTCAGCGAGCGGCTCGCCGAGGCAGGCATCCAACCGTCGGTTCGGAGCGGTTCGGAAGCTC
CTATGACAATGCACTAGCCGAGACGATCAACGGCCTATAACAAGACCGAGCTGATCAAACCCGGCAAGCCCTGG
CGGTCCATCGAGGATGTGAGTTGGCCACCGCGCGCTGGGTGCGACTGGTTCAACCATCGCCGCCTCTACCAGT
ACTGCGGCGACGTCCCGCCGGTTCGAACCTCGAGGCTGCCTACTACGCTCAACGCCAGAGACCAGCCGCCGGCTG
AGGTCTCAGATCAGAGAGTCTCCGGACTCACCGGGCGGTTACGA
```

Figura 6. Secuencia de fragmentos de *Mycobacterium tuberculosis*

6.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Después de obtener resultados favorables en la extracción de ADN así como en la pureza del mismo, se realizaron diferentes pruebas cambiando parámetros y primers en los PCR para elegir el protocolo más óptimo y el más recomendable para la amplificación de los segmentos de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* se muestran en la Tabla 4.

El PCR se realizó con 35 ciclos en la etapa de amplificación, basado en estudios anteriores (Eisenach, 1991), para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando solo un control negativo, en este caso H₂O, sin necesidad de un tratamiento previo.

Tabla 4. Protocolo para las pruebas de PCR con primers Lcp13 para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* con 35 ciclos de amplificación.

Desnaturalización	95 °C	5 min	1 ciclo
Amplificación	94 °C	30 s	35 ciclos
	55 °C	30 s	
	72 °C	1 min	
Extensión Final	72 °C	7 min	1 ciclo
Melting	95 °C	5 s	1 ciclo

En la Figura 7 se muestra el PCR donde fue utilizado el protocolo que se mostró en la Tabla 1. De acuerdo a análisis previos (García, 2012), se llevaron a cabo diferentes PCR, en los cuales se utilizaron los primers diseñados para la amplificación del fragmento del genoma de bacterias tipo "All Vibrio". Estas pruebas se realizaron con el fin de detectar si se encontraba alguna presencia de bacterias diferentes a *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras de filtros. En este ejemplo, se seleccionaron tres muestras de los diferentes períodos de muestreo, de las cuales no hubo ninguna amplificación, solo se obtuvo la amplificación del control positivo Vibrio 37(+).

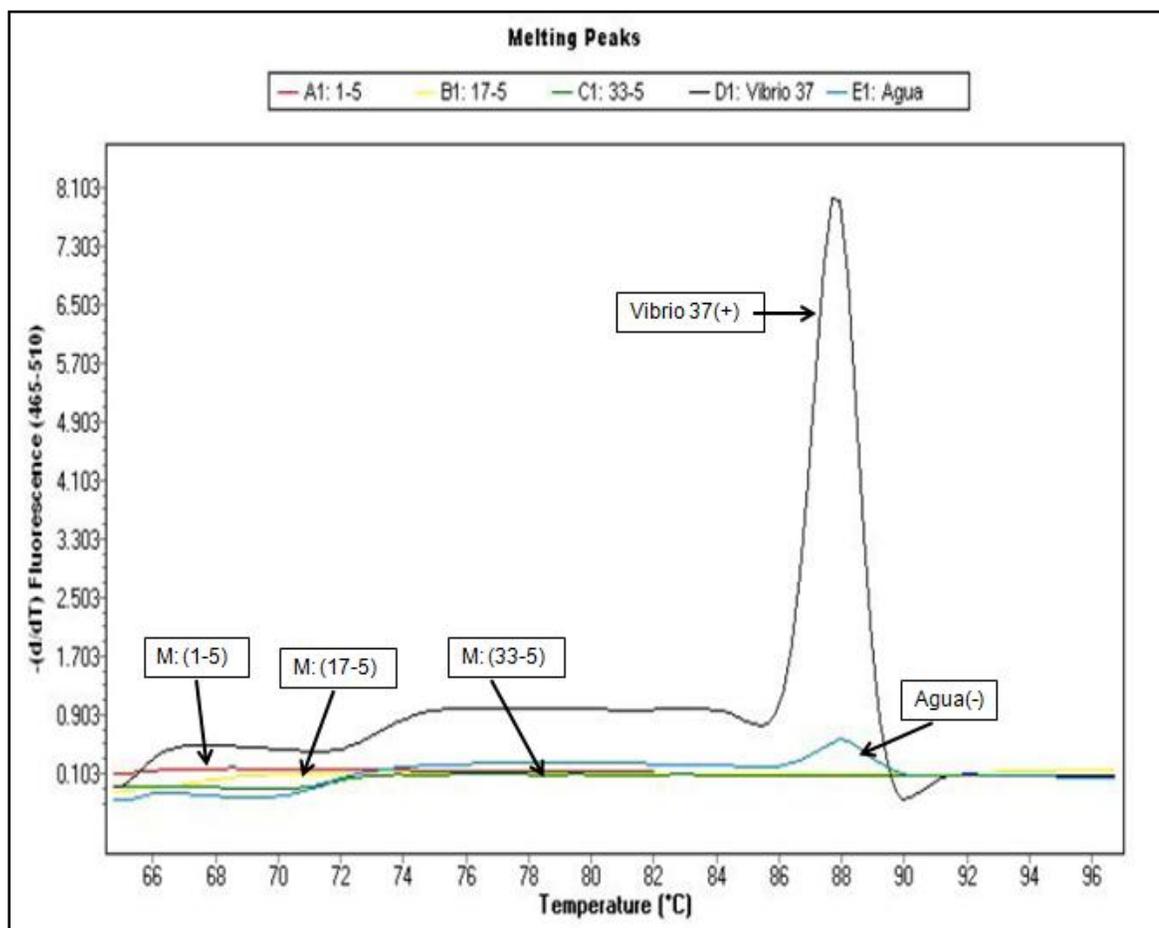


Figura 7. Prueba utilizando primers de All Vibrio.

En la Figura 8, se muestra el PCR de tres muestras seleccionadas, utilizando primers de All Vibrio y el protocolo que corresponde a la Tabla 1. Se puede observar en la Figura 8, la amplificación del control positivo de Vibrio, mientras que las tres muestras seleccionadas no presentaron picos de amplificación.

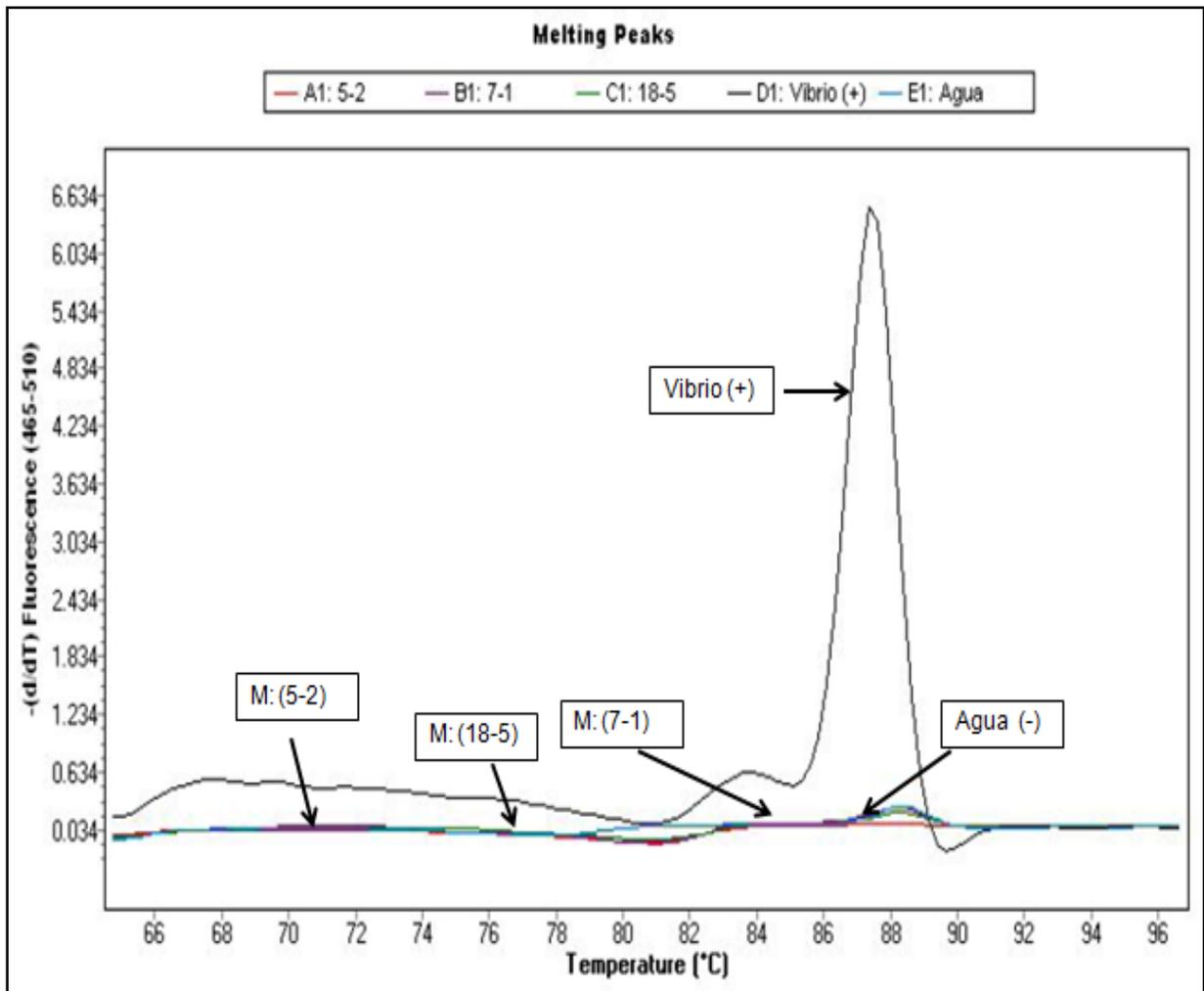


Figura 8. Prueba utilizando primers de All Vibrio y tres muestras aleatorias.

Los resultados de la siguiente prueba fueron de la selección de tres muestras de diferente período de muestreo, en las cuales se aplicaron por triplicado en el PCR para ver el comportamiento de las mismas, así como los primers de All Vibrio. El protocolo utilizado en este PCR es el que se puede observar en la Tabla 1. La Figura 9 muestra solo amplificaciones de los controles positivos de Vibrio por triplicado.

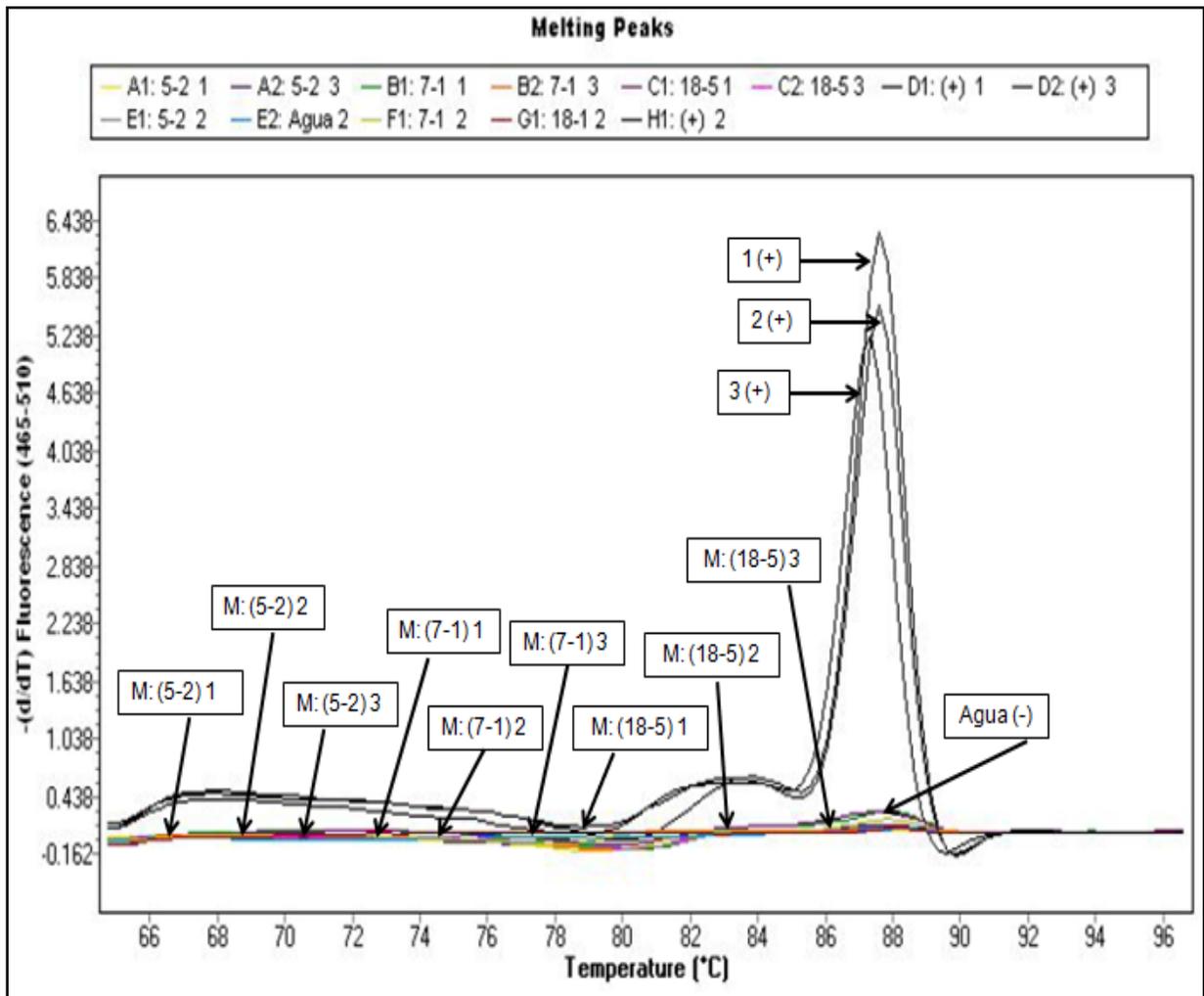


Figura. 9. Prueba utilizando primers de All Vibrio y tres muestras cada una por triplicado.

Una vez concluida las ampliaciones por PCR utilizando primers tipo All Vibrio, se obtuvieron resultados negativos, es decir, no hubo presencia de algún tipo de bacteria diferente en las muestras de filtros.

En el siguiente PCR se utilizaron primers Lcp13 para la amplificación de la *Mycobacterium tuberculosis*, el positivo de tuberculosis “Mesputo” y 5 muestras seleccionadas aleatoriamente de los diferentes muestreos. Se utilizó el protocolo correspondiente a la Tabla 2. Como se puede observar en la Figura 10, solo se obtuvo la amplificación del control positivo. Estos resultados indican que no hay presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras seleccionadas.

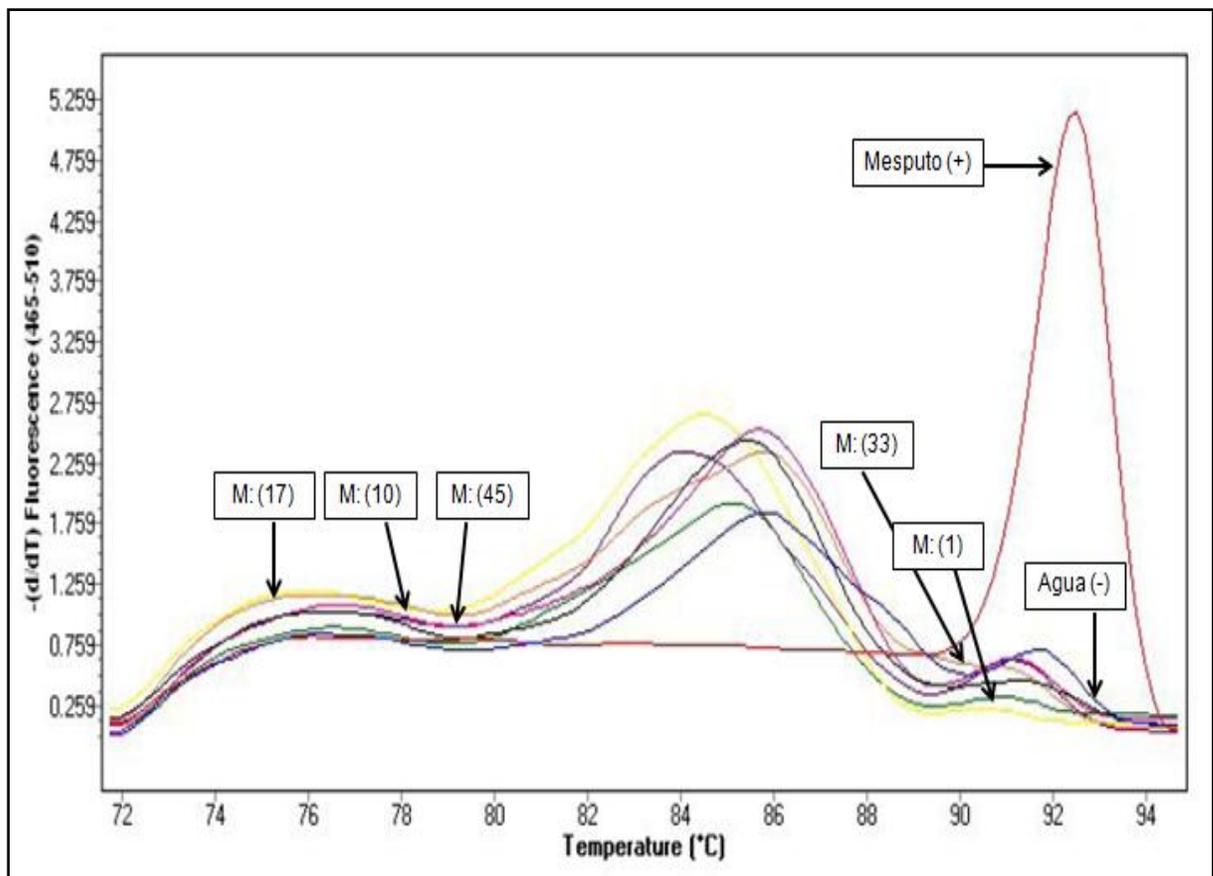


Figura 10. PCR utilizando primers Lcp13 para *Mycobacterium tuberculosis*.

Debido a los resultados anteriores se realizó un PCR cambiando las condiciones del programa como se muestra en la Tabla 3. En la amplificación se cambió el número de ciclos a solo 15 para eliminar algunas interferencias que se mostraban en los ejemplos anteriores. Además se utilizó un positivo de *Mycobacterium tuberculosis* diferente llamado "H37". Como se puede observar en la Figura 11, el protocolo usado no fue muy conveniente debido al ruido que se originaron las muestras y solo se obtuvo la amplificación del control positivo. Cabe mencionar que la capacidad de estos procedimientos para identificar la *Mycobacterium tuberculosis*, depende tanto de la secuencia seleccionada obtenida en el PCR, como de la eficiencia de la extracción del ADN (Cho, 2007).

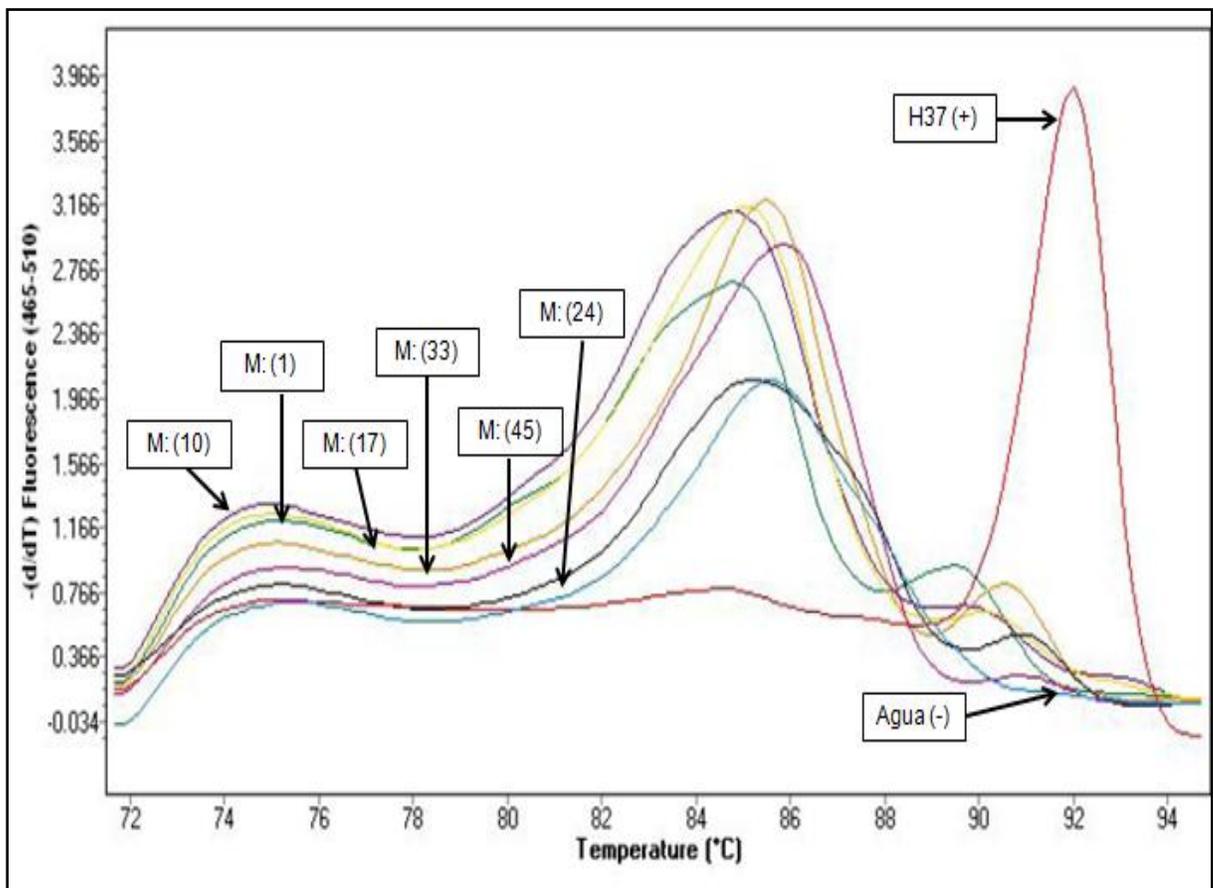


Figura 11. PCR utilizando primers Lcp13 para *Mycobacterium tuberculosis* y 6 muestras aleatorias de filtros.

La prueba que se realizó del PCR eligiendo el protocolo más óptimo para la amplificación de la *Mycobacterium tuberculosis*, se observa en la Tabla 4. Se utilizaron los primers Lcp13 y el positivo "Mesputo". De las 288 muestras se seleccionaron 48 muestras aleatoriamente. Como se puede observar en la Figura 12 no hubo amplificaciones de *Mycobacterium tuberculosis*, es decir de las 48 muestras, solo se obtuvo la amplificación del control positivo.

De acuerdo a estudios anteriores (Noordhoek, 1994), la sensibilidad del PCR para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* difiere considerablemente entre laboratorios, ya que se utilizan métodos muy diferentes para la extracción de ADN, condiciones de lisis, amplificación de ADN y detección de productos de PCR.

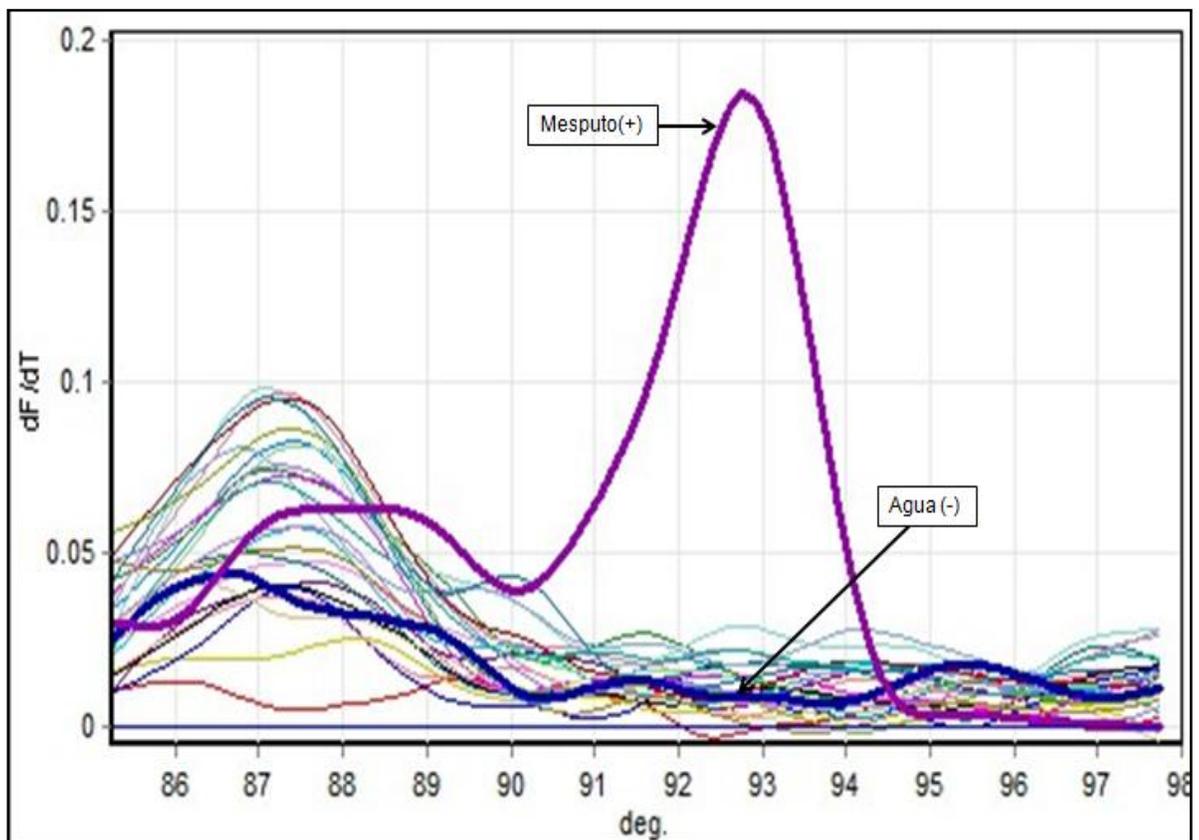


Figura 12. PCR utilizando primers Lcp13 para *Mycobacterium tuberculosis* y 48 muestras de filtros elegidas aleatoriamente.

6.6 Electroforesis

Se realizó electroforesis en gel de agarosa para observar las bandas generadas por el ADN obtenido de la extracción de las muestras de los filtros. Esto se realizó con el fin de descartar la degradación del ADN extraído en las muestras de los filtros. Se seleccionaron 5 muestras aleatorias para llevar a cabo la electroforesis como se muestra en la Figura 13, además de utilizar el control positivo de *Mycobacterium tuberculosis* "H37". Como se observa en el gel el ADN no se encuentra deteriorado, además se muestra notoriamente el control positivo por encima de las muestras.

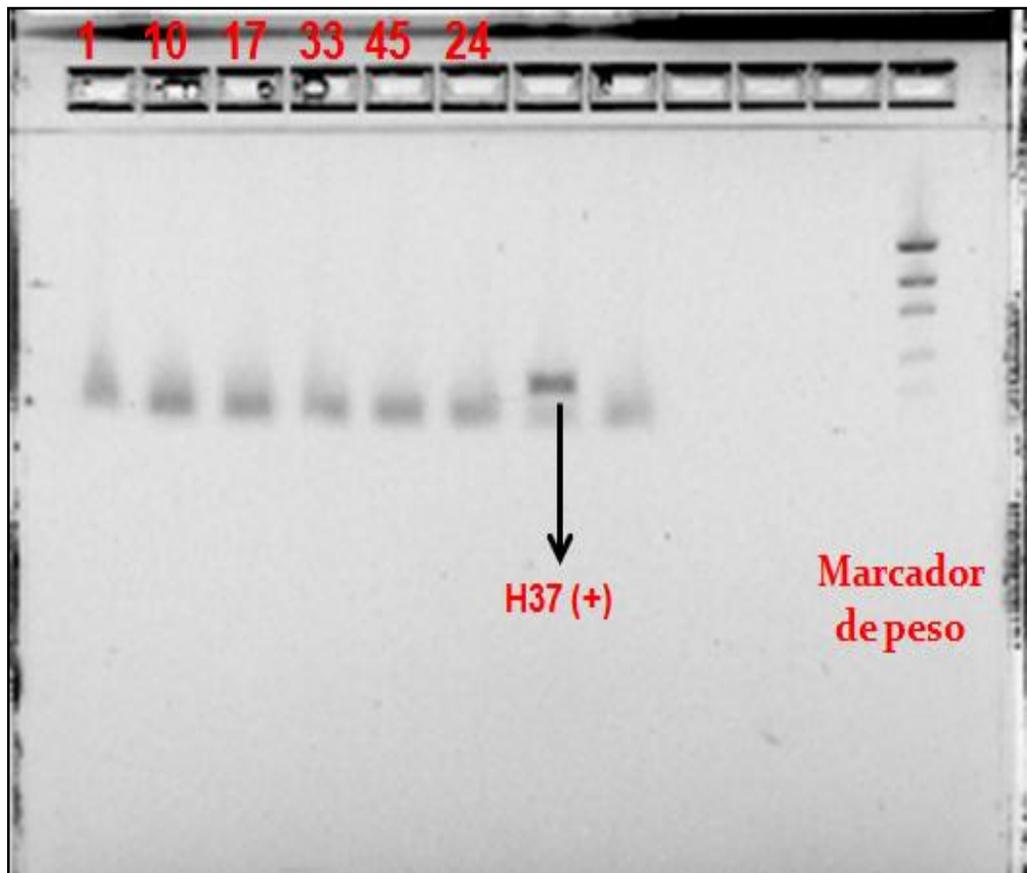


Figura 13. Imagen del gel agarosa con el ADN extraído de las muestras de filtros y un control positivo de *Mycobacterium tuberculosis*

VII. CONCLUSIONES

Durante el presente estudio de evaluación de las técnicas para detectar la *Mycobacterium tuberculosis* en las partículas del aire en 4 estaciones de la Ciudad de Hermosillo, Sonora, durante 3 períodos en el 2011, se concluye lo siguiente:

De los muestreos realizados por 4 semanas durante cada período, fueron representativos para seleccionar los microorganismos de las partículas del aire, ya que se obtuvieron muestras suficientes para realizar las pruebas por el método de Gene Clean. Este método fue efectivo en la extracción de ADN de las muestras de filtros, ya que se obtuvieron concentraciones de ADN favorables así como un grado de pureza adecuada para la amplificación por PCR.

También se observó en las electroforesis realizadas, como las muestras no se deterioran si se tiene un buen cuidado de la misma con la menor contaminación posible y sobre todo a temperaturas muy bajas.

En base a los resultados de los PCR realizados utilizando primers de All Vibrio se concluyó que no había presencia de algún otro organismo diferente a *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras de filtros.

Además se logró establecer el protocolo más óptimo para la amplificación de la secuencia de fragmentos del ADN para identificar *Mycobacterium tuberculosis*, y se encontró que no había presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en las muestras de filtros seleccionadas para el estudio de las 4 estaciones de la ciudad de Hermosillo, Sonora, durante los períodos de prueba en el 2011.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Acuin J, Mackenzie I. (1999). Treatment of chronic suppurative otitis media. The Cochrane Library. Issue 2.

Alberts B. (2002). Molecular biology of the cell, Garland Science, New York pp 1050-1057.

Aldous W, Pounder J, Cloud J, Woods G. (2005). Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. J Clin Microbiol 43(5): 2471-2473.

Altamirano M, Kelly MT, Wong A, Bessuille ET, Black WA, Smith JA. (1992) Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction; 30:2173–2176.

Álvarez Maya. “Diagnostico Molecular de Tuberculosis”. Departamento de Biotecnología. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

Arden PC; Schwartz J; Ransom RM. Daily Mortality and PM10 Pollution in Utah Valley. Arch-Environ-Health. (1992): 211-217

Arias, F. (2006). El Proyecto de Investigación. Introducción a la Metodología Científica. 5ta Edición.

Arnou PM, Bakir M, Thompson K, Bova JI. (2000). Endemic contamination of clinical specimens by *Mycobacterium Gordonae*. Clin infect dis; 31:472-476

Barajas, O. (1996). “Reporte de la calidad de Aire en Hermosillo, Sonora”. Secretaría de Infraestructura Urbana y Ecología. Gobierno del Estado de Sonora.

Barrera Moreno. (2010) Diagnostico, evaluación y tratamiento integral de la tuberculosis latente. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

Busse WW, Lemanske RF. (2001) Advances in immunology-asthma. N Engl. J Med; 344:350-62.

Cascante JA, Pascal I, Eguía V, Hueto J. (2007). Diagnosis of tuberculosis infection. Servicio de Neumología. An. Sist. Sanit. Navar; (Vol 2): 49-65.

Castellanos Joya, (2010). Situación Actual de la tuberculosis en México [Sitio en internet]. Disponible en: <http://cenave.gob.mx/tuberculosis>.

Cervera LE, Rojas H. (2010). Estimación de indicadores de pavimentación mediante el uso de percepción remota y sig.

Contreras R. (2010). Bronquitis Aguda. Clínica San Rafael Bogotá. New association academic, journal public global of medicine.

Cortazar MA, Silva E. (2004). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Cortinas MN, Fernández M, Valeta MI, Uriarte MR, Mogdasy MC. (2002). Caracterización genotípica de 80 cepas del género *Mycobacterium* en Uruguay. Rev Med Urug 18(3): 230-238.

Chan M, "Infection and Transmission" (2007). World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en>. [Fecha de Consulta: Abril, 2013].

Chimara E, Ferrazoli L, Yoko S, Ueky M, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, Leao SC. (2008). Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. BMC Microbiol 20(8): 48.

Cho S. (2007). Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. Yonsei Med J 48(3): 347-359.

Churches T, Corbett S. Public Health Bulletin. (1991). Asthma and air pollution in Sydney. NSW 2:72-3

De la Flor J. (2009). Infecciones de vías respiratorias altas I. Centro de Salud "Vila Vella". ABS Sant Vicenç dels Horts-1. SAP Baix Llobregat-Litoral. ICS Barcelona.

Doma MK, Parker R. (2007) RNA quality control in eukaryotes; 131:660–8.

Dorado G. (2006). Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales.

Edmonds, ML. (2002) Antibiotic treatment for acute bronchitis Ann Emerg Med. 40:110-112.

Eisenach K, Sifford MK, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. (1991). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144:1160-1163.

Fleige S, Pfaffl MW. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*; p.126 –39.

García C. (2012). Estandarización de la técnica de extracción de ADN para buscar la presencia de bacterias en partículas del aire de la ciudad de Hermosillo. División de Ingeniería. Universidad de Sonora.

García JL, Aspa J. (2005). Neumonías; Concepto, Clasificación y Diagnóstico diferencial. Volumen IX. p.185.

Godoy MJ, Orozco L, Hernández C, Da Mata O, De Waard J, González RS. (2008) Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Rev Soc Ven Microbiol* 28(2): 96-104.

Griffin, HG. (1994). "PCR Technology; Current Innovations". CRC Press. Diversos protocolos sobre técnicas que explotan la PCR.

Hansted E, Sitkauskiene B, Kévalas R, Tattersall A, Day T. (2007). Research for practice: a new in vitro test for identification of tuberculosis infection. *Med Kaunas* 43: 519-522.

Harrison, T. (2003) *Principios de Medicina Interna*. 15a Edición; Vol.1 págs. 1212-1215.

Herrera, Luna-Herrera. (2012) Departamentos de Inmunología y Química Orgánica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Hoffman CS, Winston, F (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli* Gene 57, 267-272.

Jacobs WR Jr, Barletta RG, Udani R, Chan J, Kalkut G, Sosne G, et al. (1994) Rapid Assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. 260: 819-22.

Katoch V. (2004). Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res* 120(4): 418-428.

Leith BE, Butler LP, Sneddon SL, JD. (1986). Handbook of Physiology. Section 3: Respiration. Vol 3. Mechanisms of breathing, part 1. Baltimore, American Physiological Society. p. 315-336.

López C. (2010). Utilización de Técnicas Moleculares para la Identificación y Caracterización Genotípica de Cepas de *Mycobacterium* Aisladas en Cultivo y Presentes en Muestras Clínicas. Universidad de Sonora.

Micklos D. (2003). DNA science a first course, Cold Spring Harbor Lab Press, New York pp 796-809.

Miller, J. J, Rhyan J, Saari D, Suárez D. (1997). Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffinembedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of and IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organism. J. Vet. Diagn. Invest. 9:244-249.

Molina M. (2004). Propuesta para limpiar el aire en México en 10 años. Instituto Nacional de Ecología, Ciudad de México.

Morales I. (2008). Electroforesis. Universidad Autónoma del Estado de México.

Morrogh M, Olvera N, Bogomolny F, Borgen PI, King TA. (2007) Tissue preparation for laser capture microdissection and RNA extraction from fresh frozen breast tissue. Biotechniques; 43: 41–2, 4, 6 passim.

Müller H, Schweizer B. (1996). Biochemical applications for uv/vis spectroscopy: dna, protein, and kinetic analysis. Perkin Elmer, Inc, UK pp 29-30.

NCBI. BLAST. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

NORMA Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-1993, Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente con respecto a partículas menores de 10 micras (PM 10) 12-23-94.

Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Broughton WA, Campbell GD, et al. (2001). Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy and prevention. Am J Respir Crit Care Med; 163: 1730-54.

Niemann S, Riisch GS, Richter E. (1997). IS6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. J Clin Microbiol; 35: 3015-20.

Noordhoek G, Kolk A, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine P, Godfrey-Faussett P, Wilson S, Svenson SB, Shinnick T. (1994) Sensitivity and Specificity of PCR for

Detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a Blind Comparison Study among Seven Laboratories

Palacios JJ. (2010). *Mycobacterium Gordoniae*. Servicio de Microbiología. Hospital San Agustín. Avilés, Asturias

Querol A, Barrio E, Ramón D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization Systematics of applied microbiology 15, 439-446

Ramirez-Córdova J, Drnevich J, Madrigal-Pulido JA, Arrizon J, Allen K, Martínez-Velázquez M, Alvarez-Maya I. (2012). Transcriptome analysis identifies genes involved in ethanol response of *Saccharomyces cerevisiae* in Agave tequilana juice. Journal of Microbiology. Volumen 1.

Sambrook and Russell. Molecular Cloning; Third Edition, Volume 2. Primrose

Secretaría de Salubridad y Asistencia. Estadísticas Vitales. (1997) Capítulo: Mortalidad. Principales causas de mortalidad general, Disponible en: <http://cenids.ssa.gob.mx/dgei/vitales/cuadro4.html>.

Secretaría de Salud, (2009). Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México. ISBN 978-607-460-087-2.

Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología - Manual para la Vigilancia Epidemiológica de Influenza. (2007) Segunda edición, México D.F. ISBN 970-721-311-6.

Secretaría de Salud. (2009). Acciones para contener la transmisión de influenza A H1N1 de origen porcino en el país.

SEMARNAT, INE, Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional, noviembre (2007).

Shamsi MB, Dada R, Kumar R. (2010). Attenuation of oxidative stress and DNA damage in varicocele: Implications in infertility management. Indian J Med Res, pp. 132(6): 728-730.

Small PM, McClenny NB, Singh SP, Schoolnick GK, Tompkins LS, Mickelsen PA. (1993). Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of falsepositive cultures. J Clin Microbiol; 31: 1677–1682.

Somma M, (2007). Extracción y Purificación de ADN. World Health Organization.

Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Degrave WM. (1997). The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing-a review. Mem Inst Oswaldo Cruz; 92: 297-316

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. 1993 Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol; 31:175-178.

Turner RB, Hayden GF. (2003) The common cold. En: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. Nelson textbook of pediatrics. 17^a ed. Philadelphia: WB Saunders. p. 1389-91.

The patient Education Institute, Inc. "Tuberculosis". (2005) Disponible en sitio web: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/tutorials/tuberculosisspanish/id3591s1.pdf>.

U.S.E.P.A. (1990). Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. A Low-NOx Strategy for Combusting High Nitrogen Content Fuels (EPA/600/7-90/002). http://www.epa.gov/nrmrl/appcd/pubs_year19941990.html

Valadez M. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio) Munid Prensa, México, D.F. pp 147.

Velasco JL, Fernández A, Sanjuán H, Portillo A. (2004). Estudio del paciente con tos crónica. p.276.

Westermeier, R. (1997). Electroforesis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation, VCH, Weinheim.

World Health Organization. (2009) Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report, Geneva, World Health Organization.

www.cultek.com

IX. ANEXOS

ANEXO I

Protocolo de Extracción de ADN por el método de Gene Clean.

1. Agregar 300 μL de solución lisis, a los tubos que contienen la muestra del filtro.
2. Macerar los filtros con la batidora de inmersión (modelo Braun) y pistilos esterilizados.
3. Centrifugar por 5 min a 10,000 gravedades.
4. Recuperar 50 μL del sobrenadante.
5. Agregar Gene Clean 150 μL en tubos esterilizados.
6. Agitar en vortex y dejar reposar por 3 min.
7. Centrifugar a 5 min y 6,000 gravedades.
8. Tirar sobrenadante y agregar 500 μL de solución de lavado.
9. Agitar en vortex para homogenizar la mezcla.
10. Centrifugar a 3 min y 6,000 gravedades.
11. Repetir lavado.
12. Tirar sobrenadante y secar muestras durante 10 minutos.
13. Agregar 50 μL de H_2O DEPC y homogenizar.
14. Centrifugar por 5 min a 6,000 gravedades.
15. Recuperar 30 μL de sobrenadante.

ANEXO II

El agua DEPC es útil en biología molecular, particularmente cuando se va a trabajar con RNA. El término DEPC significa Dietilpirocarbonato, y es una sustancia química que elimina Ribonucleasas, enzimas capaces de degradar el RNA. Se prepara adicionando el compuesto DEPC, 0.01 ml por cada 100 ml de agua. Con el agua DEPC puedes disolver RNA aislado de cualquier tejido, pues esta agua ya no tendrá ribonucleasas que degraden el RNA.

El tratamiento con pirocarbonato de dietilo (DEPC), un inhibidor irreversible de ribonucleasa, ha evolucionado como el método estándar para preparar agua libre de ribonucleasa para PCR. El DEPC reacciona con un residuo de histidina de sitio activo en la ribonucleasa, formando un carbamato y liberando una molécula de dióxido de carbono y etanol. Dado que la reacción química es irreversible, se presume que la desactivación de la ribonucleasa sea completa y permanente.

FICHA DE SEGURIDAD DEL AGUA DEPC (Dietilpirocarbonato)