



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

---

**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE  
EXTRACCIÓN DE ADN PARA BUSCAR LA  
PRESENCIA DE BACTERIAS EN PARTÍCULAS DEL  
AIRE DE LA CIUDAD DE HERMOSILLO**

**MEMORIA DE PRÁCTICAS PROFESIONALES**

**Que para obtener el Título de:**

**INGENIERO QUÍMICO**

**Presenta:**

**Cristina García García**

**Hermosillo, Sonora**

**Marzo, 2012**

# 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**

### **A DIOS Y A LA VIRGEN MARÍA**

Por su intercesión durante toda mi vida

### **A MIS ABUELOS FRANCISCO Y EMIRA**

Por su gran ejemplo y carácter

### **A MI MAMI**

Por su valor y su lucha, por guiarme y apoyarme a ser de mi lo que hoy soy.

### **A SAN FERNANDO**

Gracias por ese último empujón

## **DEDICATORIA**

Por otorgarme la oportunidad de estudiar esta carrera  
**A LA UNIVERSIDAD DE SONORA**

Por haberme brindado de ellos lo mejor  
**A MIS MAESTROS**

**FUNDACIÓN CARLOS SLIM Y AL DPTO. DE MOVILIDAD EDUCATIVA**  
Por su apoyo en la construcción de mis sueños

**UNIVERSIDAD SANTIAGO DE COMPOSTELA, ESPAÑA**  
Sin duda una gran experiencia

Por su amistad, su apoyo, sus conocimientos  
**DR. JORGE HERNANDEZ Y EQUIPO CIBNOR**

**M.C. ALVARO SANTOS**

Por su paciencia y apoyo para desarrollar esta tesis  
**DRA. ONOFRE MONGE AMAYA**

**FAMILIA, AMIGOS**  
Con todo mi corazón

**FERNANDO**  
Por motivarme día a día

**A LA MEJOR MAESTRA DE TODAS  
MI MAMI DULCEMARÍA GARCÍA B.**

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABLAS.....	iv
RESUMEN .....	1
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	2
1.1. Objetivo General.....	3
1.1.1. Objetivos Particulares .....	3
II. ANTECEDENTES .....	4
2.1 Bacterias y Virus .....	4
2.1.1 Bacterias.....	4
2.1.2 Virus.....	5
2.2 Fuentes de Contaminación .....	6
2.3 Mortalidad .....	6
2.4 Principales Enfermedades Respiratorias .....	7
2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	9
2.6 Detección de Bacterias por Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	10
2.6.1 Técnica de PCR.....	10
2.7 Medidas de Prevención y Control de Contaminación del Aire.....	14
III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	16
3.1 Análisis Previos.....	16
3.2 Extracción de ADN.....	17
3.3 Cuantificación de ADN .....	18
3.4 Preparación de una Reacción de PCR .....	21
3.4.1 Interpretación de un PCR .....	22
3.4.2 Electroforesis .....	22
3.4.3 Identificación de <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Neisseria meningitidis</i> por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	23

3.4.4 Diseño de PCR .....	24
IV. RESULTADOS.....	25
4.1 Análisis Previos.....	25
4.1.1 Extracción y Cuantificación de ADN .....	25
4.1.2 Reacción de PCR .....	27
4.2 Extracciones Oficiales.....	29
4.2.1 Extracción y Cuantificación de ADN .....	29
4.2.2 Reacción de PCR .....	34
4.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la Identificación de <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Neisseria</i> <i>meningitidis</i> .....	36
V. CONCLUSIONES .....	37
VI. RECOMENDACIONES.....	38
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	39
VIII. ANEXOS.....	42
ANEXO I .....	42
ANEXO II.....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Proceso de duplicación de Genoma PCR.....	12
2. Proceso de duplicación de ADN.....	13
3. Sitios de muestreo ubicados en la ciudad de Hermosillo.....	17
4. Protocolo de Extracción con Gene Clean.....	19
5. Concentraciones ( ng/ $\mu$ L) de ADN usando diferentes métodos de extracción.....	26
6. PCR obtenido usando como templado ADN de muestras extraídas de filtros con partículas PM <sub>10</sub> .....	27
7. Imagen del gel de agarosa con las bandas que muestran las ampliaciones obtenidas. Carriles 1-2, GC calentado; 3-4, GC sin calentar; 5-6, Buffer GT con <i>primers</i> para el gen 16/23S. Carriles 7-8, GC calentado; 9-10 GC sin calentar y 11-12 Buffer GT.....	28
8. Electroforesis para ERIC.....	34
9. MELT de amplificación de All Vibrio de la Tabla 4.....	35
10. Análisis MELT para amplificación de All Vibrio de la 3 <sup>ra</sup> extracción oficial.....	36

## LISTA DE TABLAS

TABLA	Página
1. Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN y factor 260/280. Los resultados representan la media de 3 repeticiones de los análisis previos.....	25
2. Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN y factor 260/280 extraído de filtros. Los resultados representan la media de 3 repeticiones de un muestreo de 8 días antes de los análisis oficiales.....	26
3. Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN y factor 260/280 extraído de los filtros tomados en cuatro estaciones de muestreo en Hermosillo, tomados el día 11 de febrero del 2011.....	30
4. Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN y factor 260/280 extraído de los filtros de las cuatro estaciones de muestreo en Hermosillo, tomados el 18 de febrero del 2011.....	31
5. Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN y factor 260/280 extraído de los filtros de las cuatro estaciones de muestreo en Hermosillo, tomados el 23 de febrero del 2011.....	32
6. Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN y factor 260/280 extraído de los filtros de las cuatro estaciones de muestreo en Hermosillo, tomadas el 2 de Marzo del 2011.....	33

## RESUMEN

Conocer y atacar los problemas de salud que aquejan a la sociedad Hermosillense transmitidos en el aire ha sido una de las preocupaciones principales en los últimos años, así como saber qué respiramos los habitantes de dicha ciudad. El estudio de las partículas del aire a nivel gravimétrico ya ha sido estudiado en Hermosillo. Sin embargo, la caracterización de bacterias, virus y parásitos no se ha realizado en ninguna ciudad de nuestro País. La caracterización de bacterias por técnicas de Biología Molecular es una de las más avanzadas para la identificación de bacterias. El Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) tomó la decisión de investigar y realizar análisis de partículas suspendidas en el aire. Las bacterias se encuentran contenidas en filtros proporcionados por el Instituto Municipal de Ecología (IME) el cual realizó un estudio previo para la ubicación de sus cuatro muestreadores, los filtros se entregaron después de haber dado un tratamiento previo de secado, se sometieron a pruebas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para conocer la calidad biológica con que contaba el filtro, con la idea de buscar, entre otros patógenos, la presencia de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en los filtros, cantidades y zonas de la ciudad en que se detectan. Se obtuvo una calidad buena de ADN bajo el protocolo de extracción elegido (Gene Clean) cumpliéndose así el objetivo del presente trabajo. Con estos análisis se realizarán estudios de los filtros donde se hará un análisis microbiológico de los filtros que capturan las muestras de material particulado y así identificar qué microorganismos son los que se encuentra en dichos filtros, así como también el impacto que esto pueda tener sobre la población Hermosillense.

## I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El CIBNOR, en su carácter de institución comprometida con el desarrollo regional, ha creado el Laboratorio de Análisis Integral Acuícola (LAIA), que ubica a esta institución en el umbral de la prestación comercial de servicios, asesorías especializadas y transferencia de tecnología para proyectos productivos, sin descuidar el trabajo sustantivo de investigación, desarrollo tecnológico y formación de recursos humanos a nivel licenciatura, maestría y doctorado.

A nivel mundial, durante los últimos 10 años, se han publicado estudios epidemiológicos y toxicológicos relacionados con la presencia en el aire de material particulado y otros contaminantes (Maroziene y Grazuleviciene, 2002; Barclay *et al.*, 2005). Tales estudios demuestran la asociación entre la exposición a partículas muy finas y la afectación de la salud de las personas, principalmente la población más vulnerable. La ciudad de Hermosillo ha sido evaluada en cuanto a la concentración de partículas (Santos, 2006) pero no se han realizado estudios de afectación según la variación estacional de las partículas que miden más de 10 micrómetros ( $PM_{10}$ ), así como una caracterización física y química, ni caracterización de microorganismos y por lo tanto, no se han utilizado las técnicas de Biología Molecular para su identificación.

La calidad del aire, siempre ha sido un tema preocupante, ya que este deteriora la salud de los habitantes de las ciudades, a las partículas se les considera capaces de bloquear los mecanismos de defensa 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  $PM_{10}$  predominan en la fracción respirable y penetran hasta el espacio alveolar del pulmón (NOM-025-SSA1).

## **1.1. Objetivo General**

Estandarizar la técnica para extraer ADN de bacterias en filtros conteniendo partículas del aire de la ciudad de Hermosillo.

### **1.1.1. Objetivos Particulares**

Realizar pruebas para la obtención del mejor buffer de lisis para la extracción de ADN.

Definir el método procedimiento para aislar ADN, usando una matriz de afinidad (GlassMilk. Kit GeneClean).

Determinar la pureza del ADN obtenido y definir la integridad mediante amplificación con la técnica de PCR.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Bacterias y Virus

Se estima que la bacteria *Haemophilus influenzae* tipo b, o Hib, es responsable de unos tres millones de enfermedades graves y de unas 386,000 defunciones anuales, en su mayoría debidas a meningitis y neumonía. Casi todas las víctimas tienen menos de cinco años, y los más vulnerables son los niños de entre 4 y 18 meses” (OMS, 2005)

En todos los lugares en los que se han realizado estudios minuciosos se ha comprobado que Hib es una causa importante de meningitis infantil y uno de los principales responsables de neumonías bacterianas en la niñez (OMS, 1998)

#### 2.1.1 Bacterias

Las bacterias son diminutos organismos unicelulares, cuyo tamaño oscila entre 0.5 y 20  $\mu\text{m}$ , aunque algunas pueden ser más pequeñas y unas pocas superan los 100 $\mu\text{m}$  de longitud. La pared celular es la que determina la forma de la bacteria: redonda u ovoide, con forma de varilla o espiral. Algunas bacterias pueden variar de forma en función de las condiciones de cultivo: a este fenómeno se le llama pleomorfismo. Además, ciertas especies se caracterizan por la disposición de las celular en racimos, cadenas o paquetes discretos. Algunas células producen ciertos pigmentos que imparten a las colonias bacterianas un color característico. El citoplasma de las bacterias también puede contener numerosos gránulos de materiales de almacenamiento, tales como hidratos de carbono y lípidos (Perrin *et al.*, 2005)

Las bacterias pueden contener plásmidos, que son trozos de material genético que existen fuera del genoma principal. Los plásmidos se pueden utilizar como vectores para introducir en la bacteria genes extraños que pueden impartir nuevas

capacidades sintéticas a una cepa bacteriana que de lo contrario sería “salvaje”. Muchas bacterias exhiben movilidad por medio de uno o más apéndices semejantes al pelo, denominados flagelos. Las bacterias se reproducen dividiéndose en partes iguales, un proceso denominado fisión binaria (Perrin *et al.*, 2005)

En condiciones adversas, ciertos microorganismos producen esporas que germinan cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables. Las esporas son formas o estados bacterianos particularmente estables de una bacteria que puede sobrevivir bajo extremas condiciones de sequedad y de temperatura. Algunos microorganismos forman esporas en una determinada etapa de su ciclo de vida normal. Muchas especies pueden, en circunstancias apropiadas rodearse de una cubierta gelatinosa, que proporciona un medio de unión y les confiere cierta protección frente a otros organismos. Si muchas células comparten la misma cubierta gelatinosa, se dice que presentan limo; de lo contrario, se dice que cada una tiene un cápsula (Perrin *et al.*, 2005)

### **2.1.2 Virus**

Los virus son partículas de un tamaño inferior a la resolución del microscopio óptico (<0,2 mm) y están compuestos principalmente por ácido nucleico, ADN o ARN, rodeado por una cubierta proteica. A falta de maquinaria metabólica, los virus sólo existen como parásitos intracelulares de hospedantes altamente específicos.

Muchas bacterias y ciertos hongos son invadidos por partículas de virus. Los que atacan a las bacterias se llaman bacteriófagos. Pueden ser o virulentos o ser atemperados (lisógenos). Los bacteriófagos virulentos utilizan los recursos celulares para la fabricación de partículas de fagos; a medida que la célula anfitriona muere y se degrada, nuevas partículas de fago se liberan en el medio.

Los bacteriófagos atemperados no tienen ningún efecto inmediato en la célula anfitriona, sino que llegan a fijarse al cromosoma bacteriano. Se pueden transmitir durante muchas generaciones antes de ser activados por algún suceso químico o físico (Perrin *et al.*, 2005)

## **2.2 Fuentes de Contaminación**

Los contaminantes pueden incorporarse al aire desde fuentes naturales o sintéticas. El aire siempre porta contaminantes naturales como polen, esporas, moho, levaduras, hongos y bacterias; los incendios forestales, los vendavales, las erupciones volcánicas y las sequías producen humo, aerosoles y otros contaminantes que entran al aire. Con todo, la contaminación que surge de la naturaleza cuenta poco comparada con los efectos de los contaminantes asociados con las actividades humanas (Jacobson *et al.*, 1962)

Las principales fuentes de contaminantes antropogénicos incluyen la quema de combustibles fósiles, particularmente carbón; las emisiones de fundiciones, las plantas de acero y otras instalaciones manufactureras y las emisiones de fuentes móviles como autos, camiones y aviones. Los contaminantes primarios de esas fuentes mayores son el dióxido de sulfuro (SO<sub>2</sub>), el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), el monóxido de carbono (CO), las partículas en suspensión, el ozono, los hidrocarburos, los aerosoles ácidos de sulfatos, nitratos y los metales pesados. Aunque las emisiones de las manufacturas químicas pueden afectar el área inmediatamente vecina de la fuente, no tienen el mismo impacto sobre la contaminación regional como las ya mencionadas (Smith *et al.*, 1987).

## **2.3 Mortalidad**

Se realizó un meta análisis después de 7 estudios que examinaban las relaciones entre mediciones gravimétricas de partículas llevadas por el aire en los Estados

Unidos, Schwartz (1991), sugirió que un incremento de  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  en el total diario de partículas suspendidas (TPS) está asociado con un incremento de la mortalidad de cerca de 6%. Esta correlación es independiente de los niveles de  $\text{SO}_2$ . El mismo coeficiente TPS también explica el incremento de más de 2 veces en la mortalidad de Londres en 1952. En otro estudio, examinando los certificados de muerte de Filadelfia para el 5% de los días con la mayor contaminación por partículas y el 5% con la menor, durante 1973-1980, Schwartz estableció que el patrón de muertes a menores concentraciones parecía similar al patrón visto en el desastre de Londres en 1952. Hubo poca diferencia entre los días con alta y baja contaminación, pero el total de partículas suspendidas promedió los  $141 \mu\text{g}/\text{m}^3$  los días más contaminados contra  $47 \mu\text{g}/\text{m}^3$  los menos contaminados

El número más alto de muertes en los días de mayor contaminación fue de personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y neumonía, pero el número de muertes por enfermedad cardíaca e infarto con factores respiratorios listados como causas contribuyentes de muerte, también fue elevado (Schwartz *et al.*, 1991,1992).

Observaciones paralelas a aquéllas de Londres en 1952 también implicaron la edad en los riesgos relativos de muerte.

## **2.4 Principales Enfermedades Respiratorias**

Lipfert (1987), condujo una revisión crítica de los estudios sobre la asociación entre contaminación del aire y demanda de hospitalización, y uso de salas de urgencia, incluyendo los estudios de episodios de contaminación del aire, análisis de series de tiempo y estudios transversales. Casi todos los estudios revisados encontraron asociaciones estadísticas significativas entre el uso de hospitales y la contaminación del aire; en promedio, un incremento de 100% en la contaminación estuvo asociado con un 20% más de uso del hospital. El diagnóstico respiratorio fue enfatizado en la mayoría de los estudios y el cardíaco se incluyó en 5 de ellos.

Los contaminantes del aire más a menudo asociados con cambios en el uso del hospital fueron las partículas, los óxidos de sulfuro y los oxidantes. La asociación entre contaminación del aire y uso del hospital estuvo limitada a los mayores episodios de contaminación (Lipfert *et al.*, 1993).

Desde 1985 hasta 1987, en Barcelona, España, Sunyer y colaboradores estudiaron la relación entre admisiones en salas de urgencias por Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y niveles de SO<sub>2</sub> y humo blanco, tomando en consideración los períodos de invierno y verano así como las epidemias de influenza. Encontraron que un incremento de 25 µg/m<sup>3</sup> en dióxido de sulfuro (en 24 horas en promedio) produjo cambios ajustados de 6 y 9% en las admisiones durante invierno y verano, respectivamente. Un cambio similar se encontró para el humo blanco, aunque menor en el verano. La asociación de cada contaminante con las admisiones de casos de EPOC se mantuvo después de controlar por otros agentes de contaminación.

En el distrito Ruhr de Alemania occidental, (Wichman *et al.*, 1985), estudiaron las admisiones hospitalarias, consulta externa, transporte en ambulancias y consultas privadas ocurridas durante un período de contaminación de 5 días en 1985 y las 6 semanas siguientes; compararon la frecuencia de reportes de enfermos en el área de impacto con su frecuencia en una comunidad control. Durante el periodo de contaminación, la mortalidad y morbilidad se incrementaron en el área de impacto sin aumento sustancial en el sitio control. El número total de muertes fue de 8 y 2%, respectivamente; las admisiones hospitalarias en la zona afectada, 15 contra 3% en el área control, y las consultas 12 y 5%, en su orden. El humo proveniente de la quema de matorrales se ha asociado con un incremento de las visitas por asma a las salas de urgencia en Sidney, Australia, al igual que el de la quema de bosques en California. Esos y otros estudios indican que los episodios localizados de contaminación pueden jugar un papel importante en las consultas por complicaciones del asma (Wichman *et al.*, 1985).

## 2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una herramienta desarrollada por el bioquímico Kary Mullis en 1986 con el objeto de amplificar de manera específica un fragmento de ADN. Esta técnica se fundamenta en el principio de la replicación permitiendo la generación de fragmentos generalmente menores de 1500 pares de bases mediante el uso de dos iniciadores de secuencia específica y una ADN polimerasa.

Para realizar una PCR se requieren básicamente 7 cosas:

- 1) El ADN blanco a amplificar
- 2) Una ADN polimerasa termoestable
- 3) Los cuatro dinucleótidos fosfatados
- 4) Dos iniciadores secuencia específica por lo general entre 18 y 25 nucleótidos de longitud
- 5) Solución tampón apropiada con  $Mg^{+2}$
- 6) Agua estéril
- 7) Termociclador.

La amplificación del ADN se logra después de 25 a 45 ciclos de replicación obteniéndose así  $2^{(n-2)}$  copias del fragmento amplificado, siendo n el número de ciclos necesarios. Un ciclo de amplificación esta dado por tres fases sucesivas de reacción hechas por lo general a diferentes temperaturas. La primera fase de cada ciclo es la desnaturalización del ADN en la cual las bandas de ADN son separadas generando ADN de banda simple (ADNbs), esto se hace a  $94^{\circ}C$  generalmente con un minuto de duración. La siguiente fase es el “annealing” o hibridización de

iniciadores al ADN. Aquí es importante conocer la temperatura de fusión o  $T_m$  de los iniciadores, la cual generalmente se da por debajo de  $65^\circ\text{C}$ . La tercera fase es la polimerización o extensión de los iniciadores, donde la ADN polimerasa sintetiza las cadenas de ADN nacientes en la dirección  $5' \rightarrow 3'$  a partir de los extremos  $3'\text{OH}$  de los iniciadores. Esta se lleva a cabo a  $72^\circ\text{C}$  por uno a dos minutos. Cumplido el primer ciclo, estas 3 fases se repiten  $n$  veces a fin de completar el número de ciclos de amplificación programados en el termociclador. Terminando estos  $n$  ciclos el ADN debe ser previamente desnaturalizado (Di) por 5 minutos a fin de abrir todo el ADN blanco y finalmente debe extenderse a  $72^\circ\text{C}$  por 7 a 10 min para sellar todos los fragmentos amplificados (Ef). Para terminar debe también programarse una fase a  $4^\circ\text{C}$  para almacenar en refrigerador los productos amplificados para su posterior detección por electroforesis.

Por ejemplo, a partir de una sola molécula de ADN blanco, durante 30 ciclos de amplificación se producirán  $2^{(n-2)}$  fragmentos de ADN, es decir,  $2.68 \times 10^8$  moléculas de ADN.

Dado este potencial de amplificar específicamente el ADN, la tecnología de la PCR se ha convertido en una poderosa herramienta en biología molecular con una gama de aplicaciones cada vez más numerosas.

## **2.6 Detección de Bacterias por Reacción en Cadena de la Polimerasa**

### **2.6.1 Técnica de PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("Polymerase Chain Reaction"), es una metodología con la que se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Esta duplicación de la cadena se lleva a cabo con la ayuda de un "primer" o cebador.

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos

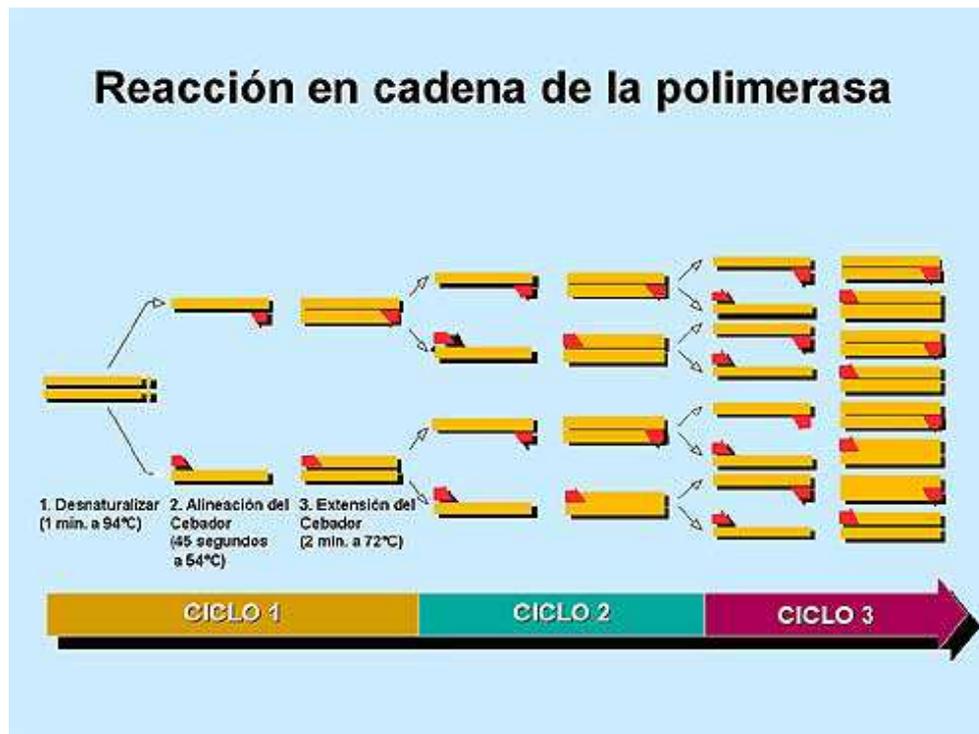
inconvenientes, es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación, lo cual se puede reducir con un control de temperatura más preciso para que el *primer* se una al ADN en la localización correcta, así como también optimizar la secuencia de los *primers* y verificar que el diseño de éstos sea el correcto.

La detección del nivel de amplificación en PCR es muy sencillo, se basa en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que se quiere amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general, para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes para realizar un PCR en Tiempo Real, es la calidad del material de partida. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental.

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación del genoma de interés y determinar el número de copias del fragmento amplificado.

Como se muestra en la Figura 1 el proceso de PCR se compone de ciclos, y estos varían según el tipo de genoma que se desea amplificar.



**Figura 1. Proceso de duplicación de genoma (PCR)**

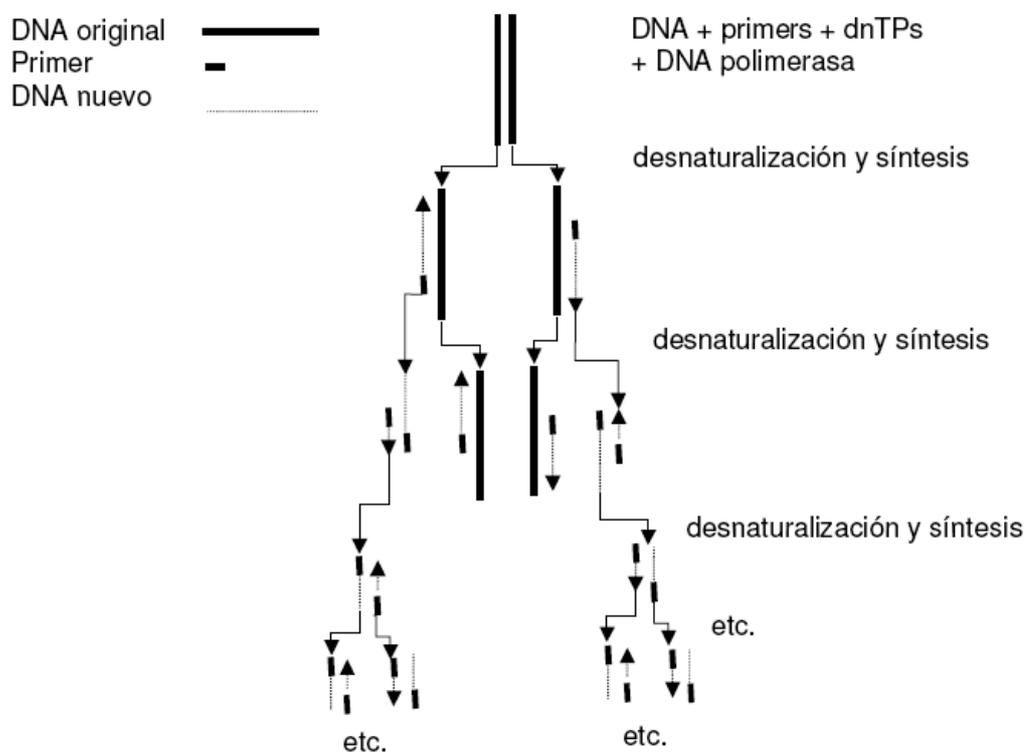
Un ciclo de amplificación se compone de 3 etapas:

- 1) Desnaturalización de los ácidos nucleicos,
- 2) Alineación de un cebador iniciador ("*Primer*")
- 3) Polimerización, por efecto de una polimerasa termo resistente, en un medio rico de nucleótidos libres (dNTPs).

La temperatura de alineación promedio se toma a partir de los datos del fabricante de los cebadores y también se pueden calcular por diferentes algoritmos.

En un ciclo, a partir de una molécula se obtienen dos, en el segundo ciclo de dos se obtienen cuatro y siguiendo una progresión geométrica en 30 ciclos se tendrían 1, 073, 741, 755 copias de cada molécula inicial. Existen ocasiones en las que se realizan hasta 45 ciclos, dependiendo de lo que se desea amplificar.

Para comenzar el proceso de PCR se realiza un paso inicial, el cual consiste en una desnaturalización inicial, que se puede lograr eficientemente manteniendo la temperatura de 94°C durante 5 minutos. Si existe la sospecha de que las muestras no están completamente purificadas (sospecha de proteínas), se puede elevar la temperatura inicial hasta los 96 °C durante 2 minutos y después a 94 °C por los 3 minutos restantes. La Figura 2 muestra gráficamente el proceso de duplicación del ADN.



**Figura 2. Proceso de duplicación de ADN**

## **2.7 Medidas de Prevención y Control de Contaminación del Aire**

Los principales pasos que se deben seguir para evitar lesiones y muertes asociadas con los episodios de contaminación aguda del aire son los siguientes:

- Reconocer las condiciones meteorológicas como vientos de baja velocidad e inversiones térmicas que podrían originar acumulaciones de contaminantes en el aire. Los meteorólogos en la National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA, tienen un programa permanente para reconocer la presencia de condiciones adversas en los Estados Unidos. Ellos alertan a la Environmental Protection Agency (EPA) cuando se detectan tales condiciones.

- Medir los niveles de contaminación del aire durante las condiciones meteorológicas adversas y prevenir la acumulación de niveles peligrosos de contaminantes.

1. La EPA, en conjunto con las agencias locales y del estado, tiene una monitorización permanente del aire que cubre regiones industrializadas muy grandes de los Estados Unidos. Por tanto, un sistema es un lugar para la monitorización en esas áreas durante condiciones meteorológicas adversas. Si una inversión térmica o un estancamiento del aire ocurren fuera del área de la red de monitorización se pueden usar recursos federales, del estado o del gobierno local.

2. Cuando los niveles de contaminación exceden el estándar de corto plazo, la EPA o la agencia responsable da la alerta. La EPA tiene la autoridad para cerrar las fábricas si las emisiones continúan durante el fenómeno meteorológico adverso.

- Asegurar que todo el personal de guardia o que trabaja en la zona inmediata sea médicamente evaluado según sus condiciones cardíacas o respiratorias preexistentes y asegurar el equipo de protección apropiado y las precauciones de seguridad.

- Alertar a los segmentos susceptibles de la población para la toma de acciones apropiadas y minimizar su exposición a niveles peligrosos de contaminación. Los departamentos de salud han desarrollado guías para tal efecto.
- Aconsejar a las personas residentes en las áreas con niveles importantes de contaminación sobre las medidas tendientes a reducir la exposición. Estas incluyen, limitar las actividades fuera de casa, mantener las ventanas cerradas y vigilar los cambios en su propio estado de salud. Las personas deben ser instruidas sobre los signos tempranos de alarma y los síntomas de exposiciones potencialmente serias: flujo nasal, dolor de garganta, lagrimeo, dolor torácico, cefalea, náuseas, mareo, tos y respiración superficial. Estas personas deben buscar atención médica.
- Notificar al personal médico del riesgo potencial en la salud de la contaminación del aire y asegurarse que están preparados para reconocer los problemas posiblemente relacionados con la población a cargo. El personal médico debe estar especialmente atento en la búsqueda de presentaciones clínicas sutiles de los efectos tóxicos de sustancias como sulfuro de hidrógeno, monóxido de carbono y debe saber cómo tratar a los pacientes que las manifiesten.
- Divulgar la información. A menudo un episodio de contaminación del aire ha pasado desapercibido para la mayoría de la población en el área involucrada. Durante los episodios de Londres y Nueva York, muchas de las enfermedades y muertes no se relacionaron con la pobre calidad del aire en los reportes. Los medios, particularmente la televisión y la radio, pueden jugar un papel importante al informar al público sobre los efectos adversos y las precauciones que se deben tomar. Esas precauciones incluyen simples medidas voluntarias como no fumar, mantener una dieta adecuada, aprender a reconocer los síntomas y los pasos a seguir si aparecen. Es importante disponer de una red de comunicación que permita, al identificar las condiciones meteorológicas adversas y una acumulación de aire contaminado, que la información fluya por los canales apropiados a los medios de amplia difusión (Etze & French, 2000).

### III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1 Análisis Previos

Se utilizaron los filtros con muestra de partículas suspendidas en el aire  $PM_{10}$  que el Instituto Municipal de Ecología (IME) proporcionó para llevar a cabo el presente proyecto. Se contó con cuatro equipos de muestreo de alto volumen de la marca TISCH. Se utilizó el método gravimétrico (NOM-CCAM-002-ECOL/1993) para determinar la concentración de partículas.

Como se puede observar en la Figura 3, el IME (Instituto Municipal de Ecología) tiene operando sus muestreadores en 4 sitios estratégicamente distribuidos en la ciudad de Hermosillo, ubicaciones que a continuación se describen:

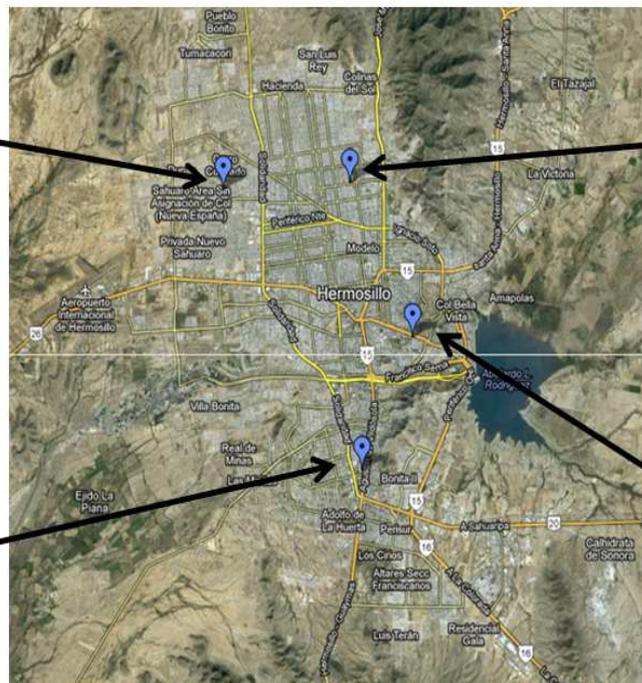
- 1.- Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora (CESUES), Ubicado en Ley Federal del trabajo y Calle 3 en la Colonia Apolo en el Norte de la ciudad.
- 2.- Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicios (CBTIS 206), Ubicado en Colombia y Potam, Fraccionamiento Camino Real, al Noroeste de la ciudad.
- 3.- Edificio de la Dirección de Inspección y Vigilancia del Ayuntamiento de Hermosillo, 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, ubicado en Agustín de Vildósola Final Sur, al sur de la ciudad.

Se tomó un filtro tamaño carta, por ser este el que se ajusta al equipo de muestreo y se extrajeron 12 muestras de un área determinada.

Se colocaron dos porciones de la muestra obtenida dentro de un tubo de 2 mL con rosca, con perlitas de vidrio y solución de lisis para romper el tejido por vibración en un equipo denominado FastPrep (MO BIO). La muestra puede permanecer dentro de solución de lisis bastante tiempo, ya que ésta sustancia conserva la muestra.

2.- Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicios (CBTIS 206), Colombia y Potam Fraccionamiento Camino Real, al Noroeste de la ciudad.

4.- Colegio de Bachilleres Plantel Villa de Seris, ubicado en Agustín de Vildósola Final Sur, al sur de la ciudad.



1.- Centro de Estudios Superiores del Estado de Sonora (CESUES) Ley Federal del trabajo y Calle 3 en la Colonia Apolo

3.- Edificio de la Dirección de Inspección y Vigilancia del Ayuntamiento de Hermosillo, ubicado en Morelia 220 entre Carbo y Palma, Colonia Casa Blanca.

**Figura 3. Sitios de muestreo ubicados en la Ciudad de Hermosillo**

### 3.2 Extracción de ADN

El primer paso para la determinación de las bacterias existentes en el filtro es la extracción de su ADN, para eso existen varias técnicas, las más comunes son: extracción de ADN con Gene Clean normal, otra es calentando la muestra a 94°C durante 10 minutos y con Buffer GT.

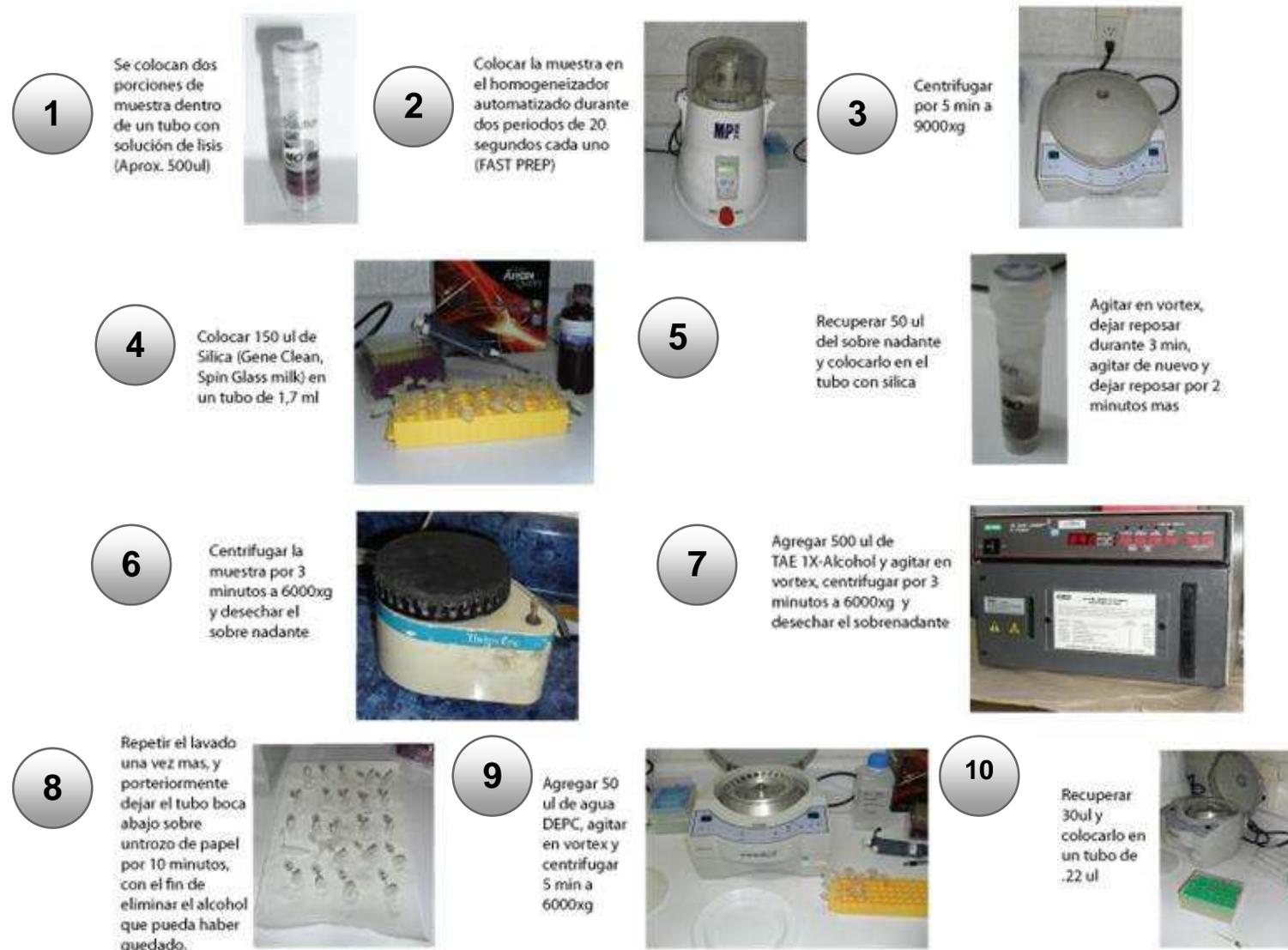
Para las muestras oficiales se decidió que por ser el más sencillo y a su vez eficiente el método de Gene Clean sin calentar, fue el que se empleo para realizar la extracción de ADN.

En la Figura 4 se puede apreciar el protocolo de extracción de ADN por el método de Gene Clean.

### **3.3 Cuantificación de ADN**

La cuantificación se realiza en un NANO DROP 2000 por triplicado y se realiza un promedio con el fin de reducir cualquier error que se pueda haber producido en la lectura. NANO DROP es un espectrofotómetro empleado para cuantificar ácidos nucleicos y proteínas el cual trabaja con muestras de 0.5  $\mu\text{L}$ . En éste caso, se trabajó con un microlitro de muestra y presenta las siguientes ventajas:

- \* Realiza la medición en menos de 5 segundos.
- \* Brinda medidas de ADN, RNA, la concentración de proteínas y la relación 260/280, que indican una pureza adecuada.
- \* Tiene un amplio rango de lectura de concentración (2  $\text{ng}/\mu\text{L}$  – 15,000  $\text{ng}/\mu\text{L}$  dsADN).
- \* Fácil calibración, solo se usa un fluido de control (puede ser agua DEPC, ver anexo II).
- \* Bajo costo de operación (No requiere consumibles).
- \* Tiene un software amigable con el usuario, el cual es compatible con la mayoría de las computadoras.



**Figura 4. Protocolo de Extracción con Gene Clean.**

El procedimiento de lectura es:



Con el brazo levantando se pipetea un microlitro ( $\mu\text{L}$ ) de la muestra directamente sobre el pedestal



Se cierra el brazo y se forma una columna con la muestra.



El pedestal se ajusta automáticamente a la mejor altura de lectura que es entre 0.05 mm y 1 mm.



Cuando la lectura se completa, la superficie se limpia solamente con un papel especial y así queda listo para la siguiente medida.

### 3.4 Preparación de una Reacción de PCR

La técnica de PCR se llevó a cabo en un equipo de nombre ROTOR GENE RG-3000, el cual se encuentra conectado a una computadora desde donde se programa y se va verificando el avance en tiempo real de la PCR.

En este equipo se configuran los cambios que se harán para cada programa, la duración de los ciclos, entre otras configuraciones particulares del *primer* utilizado. En la reacción de PCR se preparó primero una mezcla de agua (DEPC, ver Anexo II), *primer* RV, *primer* FW, super mix y la muestra a amplificar.

Las cantidades son las siguientes:

7.5  $\mu$ L de Super mix

5.5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DEPC

0.5  $\mu$ L de *Primer* RV

0.5  $\mu$ L de *Primer* FW

Se preparó en un solo tubo perfectamente esterilizado de volumen apropiado las cantidades correspondientes para todas las reacciones, si se amplificarán 10 muestras se prepara para 11, esto con el fin de evitar perder muestras al momento de pasar los 13  $\mu$ L correspondientes para cada reacción a los tubos eppendorf de 0.22 mL.

Se agregan 2  $\mu$ L de la muestra que se va a amplificar así como también se agrega un control positivo y uno negativo, el cual se sugiere sea H<sub>2</sub>O con el fin de descartar un error en el diseño del *primer*.

### 3.4.1 Interpretación de un PCR

Una vez finalizados los ciclos de PCR, se procede a realizar un análisis de disociación (MELT) con el fin de interpretar los resultados arrojados. Al PCR siempre se le debe de introducir un control positivo y uno negativo, con el fin de comprobar que el *primer* está funcionando correctamente, así como también saber si existe alguna contaminación por algún agente externo.

En este trabajo se probaron *primers* para la amplificación de fragmentos de bacterias tipo vibrio (All Vibrio). Estos *primers* no específicos se emplearon con el fin de conocer si el ADN extraído es un conjunto de segmentos de ADN de diferentes bacterias, o si se tiene una cadena específica que sea posible ampliar, en otro estudio se seleccionará el *primer* específico para la detección de las bacterias de interés.

### 3.4.2 Electroforesis

La electroforesis capilar en gel (CGE) es la transposición de la electroforesis en gel de poliacrilamida o de agarosa. El capilar está relleno con un electrolito que contiene al gel. Se produce un efecto de filtración que ralentiza a las grandes moléculas y minimiza los fenómenos de convección o de difusión. Los oligonucleótidos, poco frágiles, se pueden separar de este modo.

El gel empleado se compone de agarosa al 2%, aunque si se desea tener una medición más exacta del ancho de banda se emplea un gel de 4%.

Se coloca el gel en una cámara de electroforesis que trabaja a 120 volts, se le da una "pre corrida" de dos minutos, se cargan 10  $\mu$ L de cada una en cada carril de las muestras producto de la polimerización de cadena y se procede a realizar la electroforesis por un periodo de 15 minutos.

Una vez concluido este proceso se retira la placa del gel de la cámara y se coloca dentro del fotodocumentador, con el fin de obtener una imagen de las bandas.

### **3.4.3 Identificación de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se evaluaron en un formato de PCR múltiple los iniciadores para la proteína de membrana externa (*omp2*, 1.000 pb) de *H. influenzae*, la autolisina A (*LytA*, 395 pb) de *S. pneumoniae* y el gen regulador de contacto A (*cgrA*, 230 pb) de *N. meningitidis*, se determinó la sensibilidad y la especificidad de la técnica.

Se realizó la extracción del ADN siguiendo la metodología descrita por (Pitcher *et al.*, 1989). Finalmente, se trabajó utilizando el ADN de los microorganismos a una concentración de 200 ng/ $\mu$ L.

Para el desarrollo de la técnica molecular de PCR en formato múltiple se utilizaron los iniciadores *omp2*, *lytA* y *crgA*. El iniciador *omp2* (outer membrane protein), descrito por (Forbes *et al.*, 1992), amplifica una secuencia que codifica para una proteína externa de membrana de *H. influenzae* y genera un producto de amplificación de 1.000 pb. El iniciador *lytA*, descrito por (Messmer *et al.*, 2006), amplifica la región que codifica para la autolisina (*lytA*) en *S. pneumoniae* y genera un producto de amplificación de 395 pb. Finalmente, el iniciador *crgA* (contact-regulated gene A), descrito por Taha (2000) amplifica la secuencia del gen A regulador de contacto que codifica para una proteína involucrada en la adhesión de *N. meningitidis* a las células blanco y genera un producto de 230 pb.

El análisis bioinformático de los iniciadores se realizó con los programas BLAST y los programas de diseño de iniciadores PrimerSelect y FastPCR.

### **3.4.4 Diseño de PCR**

Las concentraciones de los reactivos y las condiciones del termociclador en la PCR múltiple se determinaron teniendo en cuenta el tamaño y la intensidad de las bandas correspondientes a cada uno de los microorganismos. Se realizó un gradiente de concentración de los iniciadores de 25 a 200 ng/ $\mu$ L. La concentración de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) se determinó evaluando concentraciones de 1 a 4 nM y la temperatura óptima de anillamiento con un gradiente de temperatura de 55°C a 65°C.

La amplificación se realizó en un termociclador PTC 100 (MJ Research, Watertown, MA, USA); los productos obtenidos y el marcador de peso molecular de 50 pb (Promega) se corrieron por electroforesis convencional en geles de agarosa (Ultra pure, Invitrogen) al 1,5 % con bromuro de etidio (BrEt) (0,4  $\mu$ g/ml), a 100 voltios por una hora, se observaron con un transiluminador de luz Ultra Violeta y se fotografiaron con una cámara Polaroid.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Análisis Previos

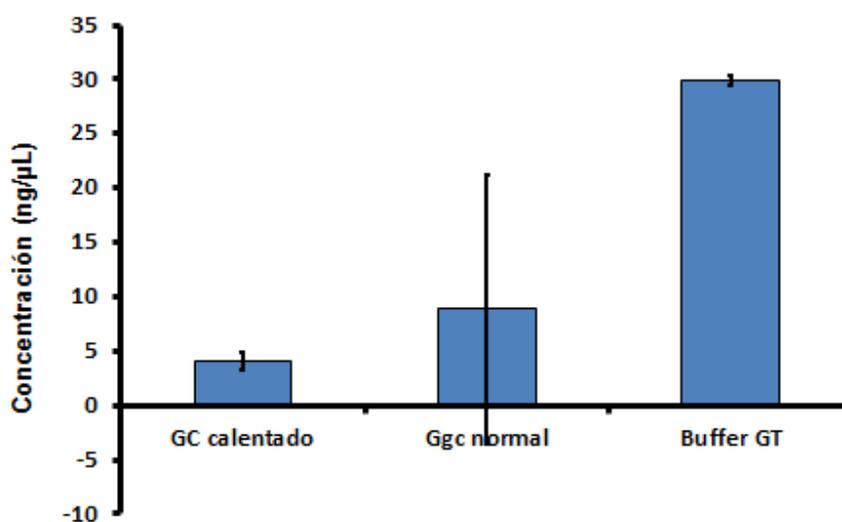
Debido a que el objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones de extracción de muestra y detectar la calidad de ADN obtenido para pruebas de PCR, el primer paso fue determinar si era posible extraer ADN a partir de filtros, almacenados durante 1 año de los cuatro lugares de muestreo. Adicionalmente se probaron tres métodos diferentes para la extracción de ácidos nucleicos: Gene Clean calentando a 94°C, Gene Clean usando el protocolo normal y el método del Buffer Guanidil Tiosulfato (GT).

#### 4.1.1 Extracción y Cuantificación de ADN

Como se puede observar en la Tabla 1, se logró la extracción de ADN a partir de filtros almacenados durante un año de las cuatro estaciones de muestreo. Por otro lado, como se aprecia en la Figura 5, el método que permitió la mayor concentración de ADN, medido por espectrofotometría, fue el de Buffer GT.

Tabla 1: Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN y factor 260/280. Los resultados representan la media de 3 repeticiones de los análisis previos.

<b>Muestra</b>	<b>[ADN]</b>	<b>260/280</b>
GC 94°C	<b>4.8</b>	<b>0.096</b>
GC 94°C	<b>3.33</b>	<b>1.29</b>
GC normal	<b>2.6</b>	<b>-16.19</b>
GC normal	<b>15.1</b>	<b>1.32</b>
Buffer GT	<b>36.1</b>	<b>1.9</b>
Buffer GT	<b>23.63</b>	<b>2.49</b>



**Figura 5. Concentraciones (ng/μL) de ADN usando diferentes métodos de extracción**

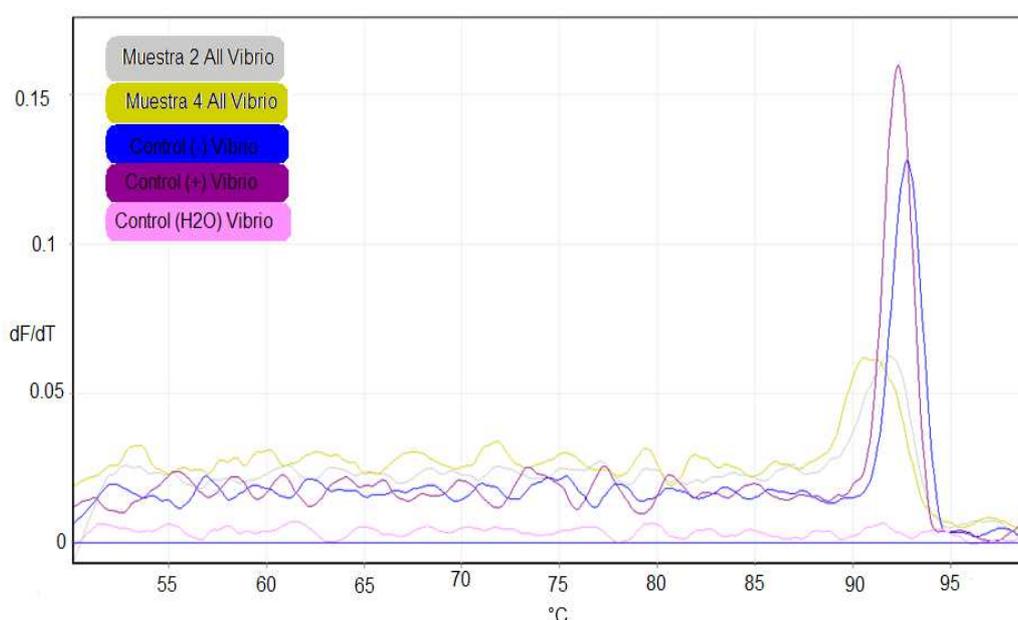
Los resultados anteriores demostraron que si era posible extraer ADN a partir de filtros y que la eficiencia era adecuada. El siguiente paso fue utilizar esta técnica para la extracción de ADN a partir de filtros obtenidos 8 días antes del análisis. Los resultados se muestran en la Tabla 2, observándose una buena recuperación de ADN y factores 260/280 que indican una pureza adecuada, los valores representan la media de tres repeticiones.

Tabla 2: Concentraciones (ng/μL) de ADN y factor 60/280 extraído de filtros. Los resultados representan la media de 3 repeticiones de un muestreo de 8 días antes de los análisis oficiales.

Muestra	[ADN]	260/280
Buffer GT	55.26	1.86
Buffer GT	35.8	1.42

#### 4.1.2 Reacción de PCR

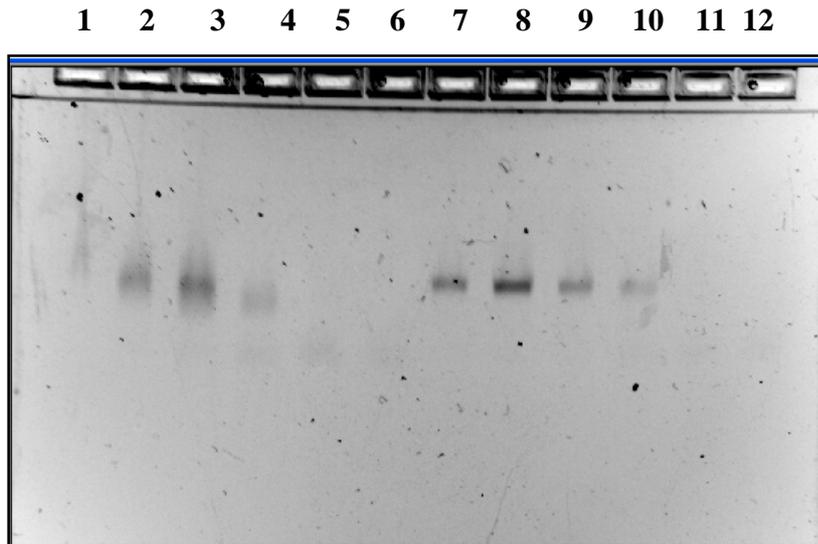
Aunque los resultados anteriores indican una cantidad adecuada de ADN y una pureza aceptable, era necesario confirmar la integridad del ADN obtenido, es decir, que el material recuperado no estuviera degradado. Para demostrar esto, se realizó un ensayo de PCR utilizando como *primers* unos oligonucleótidos diseñados para la amplificación de un fragmento del genoma de bacterias tipo *Vibrio*, denominado “All *Vibrio*”. La Figura 6 muestra un ejemplo de un PCR donde se obtuvo una amplificación de la muestra, así como del control positivo, muestras de 8 días antes del análisis, los picos indican una amplificación comprobando la integridad del ADN obtenido a partir del filtro.



**Figura 6. PCR obtenido usando como templado ADN de muestras extraídas de filtros con partículas  $PM_{10}$ .**

Adicionalmente se realizó electroforesis en gel de agarosa para observar las bandas generadas por los fragmentos amplificados usando ADN de cada método de extracción. Los resultados pueden apreciarse en la Figura 7. A pesar de que los mejores rendimientos de extracción de ADN se obtuvieron con Buffer GT, los resultados en electroforesis indican que las mejores amplificaciones se obtienen

con el uso de GC. Debido a lo anterior, se implementó el uso de GC para la extracción de las muestras de ADN a partir de filtros de muestreo de aire en Hermosillo.



**Figura 7.** Imagen del gel de agarosa con las bandas que muestran las ampliaciones obtenidas. Carriles 1-2, GC calentado; 3-4, GC sin calentar; 5-6, Buffer GT con *primers* para el gen 16/23S. Carriles 7-8, GC calentado; 9-10 GC sin calentar y 11-12 Buffer GT.

## **4.2 Extracciones Oficiales**

Utilizando la técnica estandarizada para extracción de ADN, se procesaron los filtros que serían involucrados en el trabajo oficial sobre el análisis de la calidad microbiológica del aire de Hermosillo.

### **4.2.1 Extracción y Cuantificación de ADN**

La Tabla 3 presenta los resultados de la extracción de ADN de estos filtros tomados el día 11 de febrero del 2011, los colores en cada tabla representan las diferentes estaciones de muestreo. Color blanco: estación Sur; color gris: estación centro, color verde: estación Norte y color azul: estación Noroeste.

De la misma forma se analizaron los filtros de las cuatro estaciones de muestreo tomados el 18 de Febrero del 2011 (Tabla 4).

En las Tablas 5 y 6 se muestran las concentraciones de ADN y la relación proteínas- ADN para el muestreo del 23 de Febrero y 2 de Marzo del 2011, respectivamente.

Tabla 3. Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN y factor 260/280 extraído de los filtros de las cuatro estaciones de muestreo en Hermosillo, tomados el día 11 de febrero del 2011.

<b>Muestra</b>	<b>[ADN]</b>	<b>260/280</b>
1	16	4.88
2	25.3	2.17
3	14	2.47
4	13.43	3.69
5	19.9	6.75
6	13.93	2.57
1	13.73	6.66
2	9.46	8.58
3	5.83	12.9
4	10.53	9.27
5	9.9	13.5
6	9.53	-26.9
1	9.9	6.26
2	11.06	2.71
3	8.83	3.85
4	14.28	3.25
5	5.4	2.71
6	13.96	2.41
1	-.33	0.24
2	2.43	2.73
3	-1.05	0.45
4	-1.25	.36
5	1.1	-.76
6	3.3	1.32

Tabla 4. Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN y factor 260/280 extraído de los filtros de las cuatro estaciones de muestreo en Hermosillo, tomados el 18 de Febrero del 2011.

<b>Muestra</b>	<b>[ADN]</b>	<b>260/280</b>
1	8	1.98
2	8.6	1.5
3	7.8	1.36
4	12.4	1.25
5	15.0	1.43
6	19.5	1.43
1	8.8	1.95
2	5.16	1.8
3	5.1	1.57
4	5.1	1.59
5	2.03	2.8
6	3.5	2.76
1	15.53	1.53
2	25.4	1.32
3	9.2	1.39
4	6.0	3.0
5	4.2	3.24
6	0.93	-2.23
1	3.26	1.61
2	1.26	-23.57
3	17.06	1.49
4	0,6	1.2
5	4.36	3.51
6	8.6	1.48

Tabla 5. Concentraciones (ng/ $\mu$ L) de ADN y factor 260/280 extraído de los filtros de las cuatro estaciones de muestreo en Hermosillo, tomados el 23 de Febrero del 2011.

<b>Muestra</b>	<b>[ADN]</b>	<b>260/280</b>
1	8.46	1.38
2	6.53	1.38
3	3.86	1.36
4	5.0	1.31
5	6.1	1.92
6	8.6	1.49
1	13.36	1.39
2	3.43	1.21
3	9.0	1.22
4	3.7	3.57
5	7.63	1.24
6	19.03	2.97
1	9.93	1.15
2	4.13	1.5
3	3.86	1.22
4	9.46	1.29
5	9.36	1.23
6	17.4	2.15
1	2.76	1.21
2	7.8	1.14
3	7.7	1.39
4	8.36	1.34
5	4.43	1.26
6	3.16	1.21

Tabla 6.: Concentraciones (en ng/μL) de ADN y factor 260/280 extraído de los filtros de las cuatro estaciones de muestreo en Hermosillo, tomadas el 2 de Marzo del 2011.

<b>Muestra</b>	<b>[ADN]</b>	<b>260/280</b>
1	6,5	1,52
2	19,56	1,47
3	11,03	1,26
4	12,9	1,31
5	13,8	1,43
6	18,2	1,26
1	18,2	1,26
2	39,66	1,38
3	10,53	1,25
4	10,3	1,27
5	14,63	1,36
6	20,76	1,33
1	19,2	1,28
2	6,5	1,41
3	10,96	1,38
4	8,73	1,30
5	6,73	1,52
6	7,9	1,54
1	29,43	5,25
2	6,4	1,42
3	7,76	1,52
4	5,56	1,42
5	6,76	1,44
6	3,53	1,05

#### 4.2.2 Reacción de PCR

Se realizo solo un Gel para las muestras amplificadas de la Tabla 3, bajo el *primer* de ERIC, en la Figura 8 se presentan los resultados. Observando en el ultimo carril el marcador de peso molecular, con el cual se podrá saber el ancho de banda de la cadena de ADN amplificada, así como también se podrá saber de este modo a que bacteria puede pertenecer dicha cadena.

En el carril #8 se aprecian varias marcas de banda, lo cual nos indica diferentes tipos de bacterias amplificadas con el *primer ERIC* en dicha muestra.

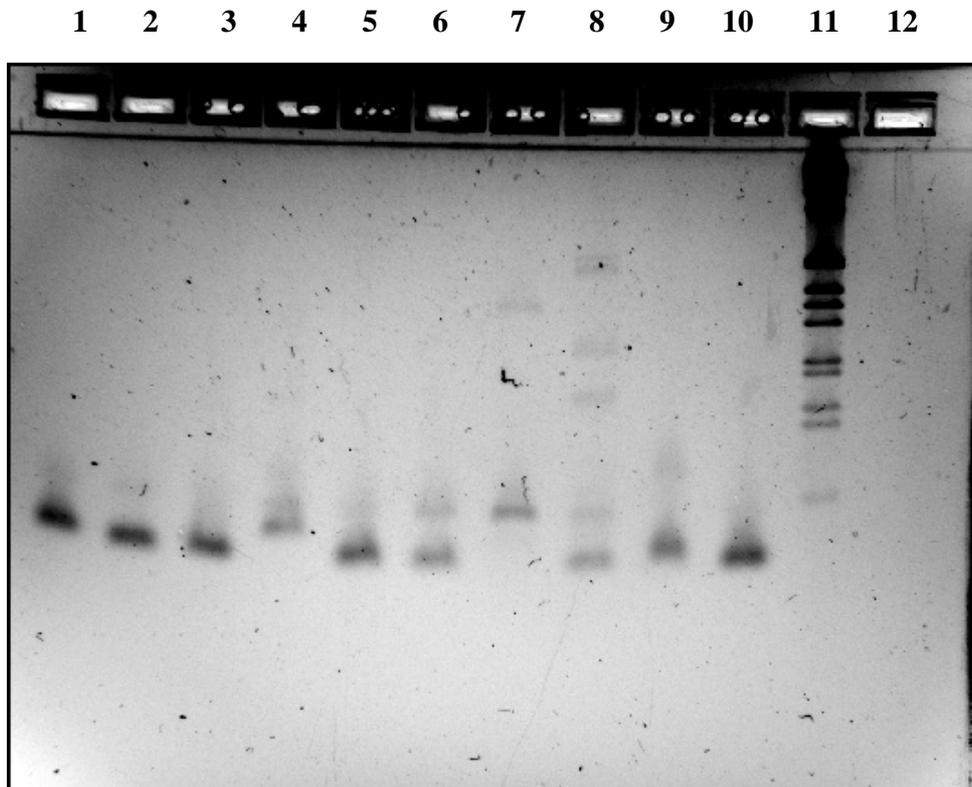
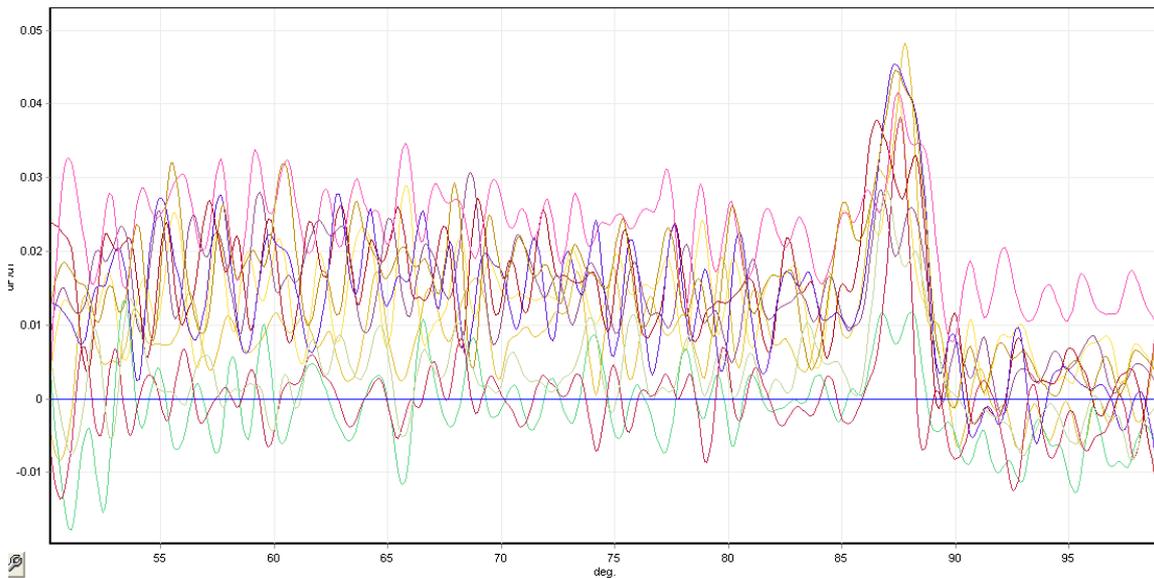


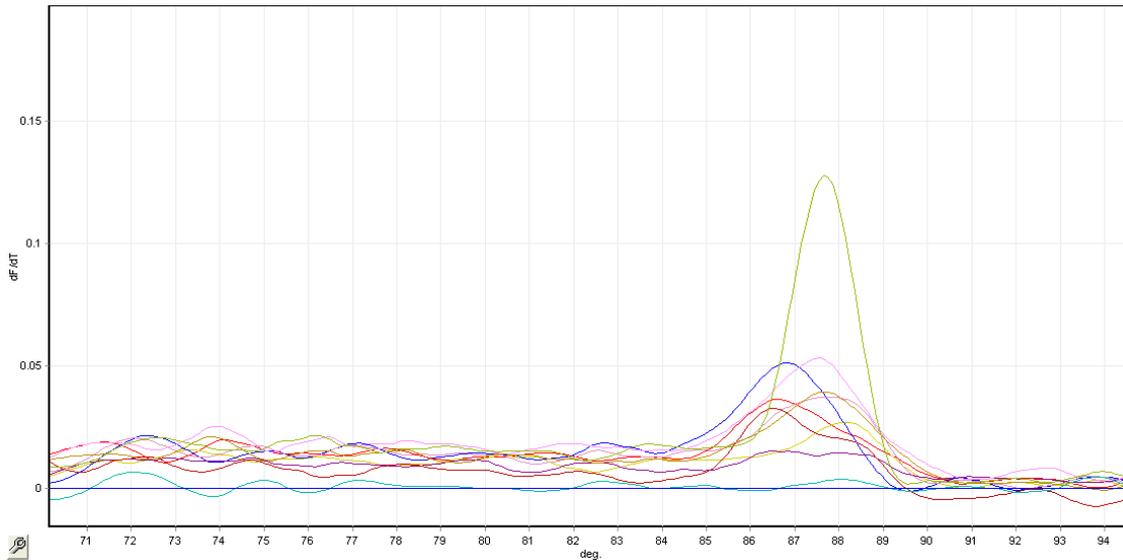
Figura 8. Electroforesis para ERIC

En la Figura 9 se observa cómo se levanta el pico positivo entre los grados esperados (85-90°C) sin embargo, se observa cómo se levantan otros tipos de picos y en diferentes zonas e incluso dentro del rango de grados del positivo los picos son en diferentes formas, por lo cual se aprecia que en esta extracción no se cuenta con una clara presencia de algún tipo de Vibrio.



**Figura 9.- MELT de amplificación de All Vibrio de la Tabla 4**

En la Figura 10 se puede observar el análisis MELT que se realizó una vez concluido el proceso de amplificación PCR, en el cual se puede observar el positivo, el cual en este caso corresponde a un tipo muy similar de Vibrio, solo que en este caso no se realizó la amplificación de un positivo seguro.



**Figura 10. Análisis MELT para amplificación de All Vibrio de la extracción oficial**

#### **4.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la Identificación de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis***

En este trabajo se presentan los resultados de la estandarización de la técnica de extracción del ADN de bacterias en filtros conteniendo partículas del aire de la ciudad de Hermosillo y se dejó para trabajos posteriores la detección de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* por la técnica de PCR.

## V. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio del proceso de extracción de ADN de varios filtros de aire colocados en diferentes puntos de la ciudad de Hermosillo, Sonora, se concluye lo siguiente:

Del muestreo realizado a inicios del 2010 (representados como análisis previos) se encontró que el tiempo transcurrido entre el muestreo y la extracción de ADN no afecta, a pesar de la diferencia de pesos, dado que no se requiere que el microorganismo se encuentre vivo, sino simplemente que su cadena de ADN esté completa.

El método de extracción de ADN que más se ajustó al tipo de resultados que fue requerido para poder realizar una polimerización de cadena de ADN para su posterior identificación es el protocolo de Gene Clean.

De los muestreos realizados de manera oficial se obtuvo una concentración de ADN aceptable, y sobre todo con la relación entre el ADN y la proteína dentro del rango, confirmando que se cuenta con una cadena de ADN de calidad lo cual permitió realizar una ampliación de cadena para diferentes tipos de bacterias.

Durante la presente investigación se logró optimizar el tiempo de extracción ya que Gen Clean es el protocolo que menor tiempo requiere para extraer el ADN del filtro de aire. Así mismo se elaboró un guión de actividades a realizar durante los reposos obligados del protocolo. Se elaboró un patrón a seguir desde la toma de muestra hasta la conservación del ADN para su posterior amplificación.

En base a los resultados obtenidos, se cumplió con el objetivo de este trabajo, ya que se determinó la forma precisa de extracción del ADN permitiendo establecer los pasos a seguir el resto de la investigación.

## VI. RECOMENDACIONES

Una vez concluido el estudio de las partículas del aire de cuatro estaciones de la ciudad de Hermosillo se recomienda lo siguiente:

- Perfeccionar la técnica de identificación de bacterias.
- Realizar monitoreos de manera mensual y reportar al Instituto Municipal de Ecología (IME).
- Colocar al menos 4 puntos más de monitoreo ambiental con el fin de obtener un muestreo más representativo de la ciudad.
- Realizar un plan preventivo de control de emisiones a autos, industrias, hogares con estufas de leña, taquerías, etc.
- Realizar monitoreos en la zona industrial con el fin de detener a tiempo que la contaminación llegue a la ciudad, y a su vez cuidar la calidad de vida de los trabajadores de dicha zona.
- Informar a los responsables de salud municipal sobre las necesidades de los habitantes.
- Para poder asegurar el tipo exacto de bacteria y sus consecuencias sobre la salud de los habitantes de dicha ciudad requiere de un estudio más específico con sus *primers* correspondientes y sobre todo, de la elaboración de *primers* específicos.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

Childs, K.D., Simpson, C.A., Warren-Serna, W., Bellenger, G., Centrella, B., Bowling, R.A., Ruby, J., Stefanek, J., Vote, D.J., Choat, T., Scanga, J.A., Sofos, J.N., Smith, G.C., Belk, K.E. *J. Food Prot.* (2006). Molecular characterization of *Escherichia Coli* O157:H7 hide contamination routes: feedlot to harvest.

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

DNASTAR. (2006) Software for molecular biology [www.dnastar.com](http://www.dnastar.com)

Duclos P, Sanderson LM, Lipsett M. (1990) The 1987 forest fire disaster in California: assessment of emergency room visits. *Arch Environ Health*; 45:53-8.

Etze, R A; French, J. G. Contaminacion del aire. *Ef adv.* (2000) factores de riesgo. Impactos en la salud. Prevencion y mitigacion. Control de riesgo. Organización Panamericana de la Salud. Bogotá.D.C. CO.  
<http://www.crid.or.cr/digitalizacion/pdf/spa/doc12849/doc12849.pdf>

Forbes K, Bruce K, Ball A, Pennington T. (1992) Variation in length and sequence of porin (omp2) alleles of non-capsulate *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol.* 6:2107-12.

<http://www.nanodrop.com/Productnd2000sample.aspx>

Jacobson A. (1962) Natural sources of air pollution. In: Stern A, editor. *Air pollution*. Academic Press. New York 75-208.

Krzyzanowski M, Wojtyniak B. (1991) Air pollution and daily mortality in Cracow. *Public Health Rev*;19: 73-81

Lipfert F. (1993) A critical review of studies of the association between demand for hospital services and air pollution. *Environ Health Perspect*; 101:229-68.

Maroziene y Grazuleviciene, 2002; Barclay y et al., 2005

Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR. (2004) Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.*49:249-54.

NCBI. BLAST. Consultada: julio 13 de 2006. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

NOM-025-SSA1

OMS (Organización Mundial de la Salud); Diciembre de 2005. Nota descriptiva N°294.

Parra E., Castañeda E., Moreno J., Identificación de Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae y Neisseria meningitidis por reacción en cadena de la polimerasa [http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S0120-41572007000300015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S0120-41572007000300015&script=sci_arttext)

Pitcher D, Saunders N, Owen R. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letts Appl Microbiol 8:151-6.

Platero M. A.M. (2008) Estudio Polifásico de la diversidad microbiana de quesos artesanales elaborados con leche cruda de vaca. Granada, España

Sambrook and Russell. Molecular Cloning; Third Edition, Volume 2 ([www.molecularcloning.com](http://www.molecularcloning.com))

Schwartz J. (1994) What are people dying of on high pollution days? Environ Resposability 64:26-35.

Schwartz J. (Rev 1991/1992) Particulate air pollution and daily mortality: a synthesis. Public Health 19:39-60

Smith KR. (1987) Biofuels, air pollution and health: a global review. New York: Plenum Press.

Spix C, Heinrich J & Dockery D. (1993) Air pollution and daily mortality in Erfurt, East Germany, 1980-1989. Environ Health Perspect, 101:518-26.

Sunyer J, Saiz M, Murillo C, Castellsague J, Martinez F, Anto J. (1993) Air pollution and emergency room admissions for chronic obstructive pulmonar disease. Am J Epidemiol; 137:701-5.

Taha MK. (2000) Simultaneous approach for nonculture PCR- based identification and serogroup prediction of N. meningitidis. J Clin Microbiol. 38:855-7.

University of Helsinky. FastPCR © 1998-2007 (for Windows). [Consultada: julio 13 de 2006]. Disponible en: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>.

Weissensteiner T, Griffin H, And Griffin A, PCR Technology: Current innovations; Second Edition.

Wheaton EE. (1992) Prairie dust storms - a neglected hazard. Natural Hazards; 5:53-63.

Wichman H, Mueller W, Allhoff P, et al., (1989) Health effects during a smog episode in West Germany in 1985. *Environ Health Perspect*; 81:129-30.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO I

#### Protocolo de Extracción de ADN por Buffer G.T. (Guanidil Tiosulfato)

- 1.- Agrega la muestra del filtro en un tubo con 9000  $\mu$ L de GT BUFFER, agitar en vortex
- 2.- Centrifugar a 12000 xg por 3 minutos.
- 3.- Agregar 40  $\mu$ L de Silica en un nuevo tubo, agitar bien la silica antes de agregarla.
- 4.- Recuperar 600  $\mu$ L de la solución sobre nadante en el tubo con silica, se mezcla en vortex.
- 5.- Centrifugar a 12000 xg por 15 segundos (no más de 20 seg.). Luego desechar la solución sobrenadante.
- 6.- Lavar la silica con 500  $\mu$ L de GT Buffer. Mezclar en vortex hasta que la silica se resuspenda.
- 7.- Centrifugar a 12000 xg por 15 segundos (no más de 20 seg.). Luego desechar la solución sobrenadante.
- 8.- Agregar 1 ml de Etanol al 70% para lavar el pellet de Silica. Agitar en vortex hasta que el pellet de silica se re suspenda.
- 9.- Centrifugar a 12000 xg por 15 segundos (no más de 20 seg.). Luego desechar la solución sobrenadante.
- 10.- Agregar 50  $\mu$ L de DEPC H<sub>2</sub>O, re suspender la silica e incubar la muestra a 55°C por 10 minutos. Agitar en vortex de nuevo y centrifugar a 12000 xg por 2 minutos.
- 11.- Recuperar 30  $\mu$ L del sobre nadante y agregar a un tubo pequeño.

## **ANEXO II**

### **Agua DEPC**

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.

FICHA DE SEGURIDAD DEL AGUA DEPC (Dietilpirocarbonato)