

# **ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

“DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis* COMPLEX A PARTIR DE CULTIVOS AISLADOS DE MUESTRAS CLÍNICAS Y CEPAS TIPO, MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).”

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**PATRICIA IVONNE YÁNEZ TORRES**

**DIRECTOR: DR. MARCELO GRIJALVA, PhD**

**CODIRECTOR: DRA. PATRICIA JIMÉNEZ**

**SANGOLQUÍ, 2007**

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.1:</b>	Temperaturas de fusión para distintas longitudes de primers aplicando la fórmula de Wallace.....	43
<b>Tabla 1.2:</b>	Número teórico de ciclos requeridos para la PCR.....	52
<b>Tabla 1.3:</b>	Rango de separación en geles conteniendo distintas concentraciones de agarosa.....	59
<b>Tabla 1.4:</b>	Buffers utilizados en electroforesis.....	61
<b>Tabla 3.1:</b>	Traducción de la secuencia original de los óligos candidatos para primer reverse.....	82
<b>Tabla 3.2:</b>	Temperatura de melting de los cuatro oligonucleótidos candidatos.....	82
<b>Tabla 3.3:</b>	Longitud de los amplicones para las distintas combinaciones de primers.....	83
<b>Tabla 3.4:</b>	Protocolo para la PCR usando <i>Taq</i> DNA polymerase Invitrogen para un volumen de reacción de 30µl.....	86
<b>Tabla 3.5:</b>	Lecturas del fluorómetro y concentraciones reales de cada una de las diluciones del DNA utilizado para la determinación de la sensibilidad del sistema.....	89
<b>Tabla 3.6:</b>	Análisis de costos.....	94

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b>	Mapa circular del cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	21
<b>Figura 1.2:</b>	Electromicrografía de un macrófago atacando a <i>E. coli</i> .....	29
<b>Figura 1.3:</b>	Formación del tubérculo en tuberculosis.....	30
<b>Figura 1.4:</b>	Prueba de tuberculina.....	32
<b>Figura 1.5:</b>	Acercamiento de un cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> que revela la morfología de las colonias de este organismo...	37
<b>Figura 1.6:</b>	Radiografía torácica anteroposterior de un paciente diagnosticado con tuberculosis bilateral avanzada.....	38
<b>Figura 1.7:</b>	Diagrama del proceso de la PCR.....	50
<b>Figura 1.8:</b>	Efecto meseta en la amplificación por PCR.....	52
<b>Figura 1.9:</b>	Estructura química del polímero de agarosa.....	56
<b>Figura 1.10:</b>	Cabina de bioseguridad Clase II, Tipo A y sus partes principales.....	68
<b>Figura 2.1:</b>	Vista de los resultados de un alineamiento de secuencias del gen 16S rRNA para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex con programa ClustalX.....	72
<b>Figura 2.2:</b>	Electroforesis en gel de agarosa de primers forward (F46) y reverse (R50) diluidos.....	73
<b>Figura 3.1:</b>	PCR con DNA obtenido de lisis por calor.....	78
<b>Figura 3.2:</b>	Ensayo de extracción de DNA con y sin lisozima, Kit QIAamp de Quiagen.....	79
<b>Figura 3.3:</b>	Extracción manual de DNA a partir de cultivo con lisozima....	79
<b>Figura 3.4:</b>	Aislamiento de DNA con cóctel de enzimas líticas a partir de suspensiones celulares.....	80
<b>Figura 3.5:</b>	Resultados de ensayo de PCR con primer juego de primers diseñado a partir de la secuencia de inserción IS6110.....	80
<b>Figura 3.6:</b>	Región homóloga en la posición 1420(bp) candidata para primer “forward” de 22bp (F1) perteneciente al gen 16S rRNA para <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> .....	81
<b>Figura 3.7:</b>	Región homóloga en la posición 1466(bp) candidata para primer “forward” de 22bp (F2) perteneciente al gen 16S	

	rRNA para <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> .....	81
<b>Figura 3.8:</b>	Región homóloga en la posición 1598(bp) candidata para primer “reverse” de 22bp (R1) perteneciente al gen 16S rRNA para <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> .....	81
<b>Figura 3.9:</b>	Región homóloga en la posición 1620(bp) candidata para primer “reverse” de 22bp (R2) perteneciente al gen 16S rRNA para <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> .....	82
<b>Figura 3.10:</b>	PCR con primers TbF46 y TbR50. Optimización de <i>Ta</i> .....	84
<b>Figura 3.11:</b>	Variación de temperatura de annealing.....	85
<b>Figura 3.12:</b>	Ensayo con concentraciones de MgCl <sub>2</sub> .....	85
<b>Figura 3.13:</b>	Optimización de la concentración de primers para el sistema PCR SuperMix (Invitrogen).....	86
<b>Figura 3.14:</b>	Optimización de ciclos.....	87
<b>Figura 3.15:</b>	Ensayo de contaminación con variación en el número de ciclos.....	88
<b>Figura 3.16:</b>	DNA genómico para prueba de sensibilidad.....	88
<b>Figura 3.17:</b>	Línea de tendencia de las lecturas (valores dados por fluorómetro) versus las diluciones del DNA.....	89
<b>Figura 3.18:</b>	Prueba de sensibilidad.....	90
<b>Figura 3.19:</b>	DNA aislado de una mezcla de sangre humana y suspensiones de <i>M. tuberculosis</i> .....	90
<b>Figura 3.20:</b>	Ensayo de sensibilidad con diluciones seriadas de DNA extraído de muestras artificiales.....	91
<b>Figura 3.21:</b>	Ensayo de especificidad del sistema.....	93

## LISTADO DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b>	Fórmula para el cálculo de <i>Tm</i> de oligonucleótidos.....	109
<b>Anexo 2:</b>	Cálculo de la <i>Tm</i> de productos.....	109
<b>Anexo 3:</b>	Protocolo para aislamiento de DNA genómico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a partir de cultivo.....	110
<b>Anexo 4:</b>	Protocolo para aislamiento de DNA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a partir de muestras artificiales.....	114
<b>Anexo 5:</b>	Micobacterias atípicas.....	115
<b>Anexo 6:</b>	Equipos utilizados en el aislamiento de DNA.....	119
<b>Anexo 7:</b>	Equipos utilizados para pre-PCR, PCR y post-PCR.....	120
<b>Anexo 8:</b>	Preparación de geles de agarosa.....	122

## NOMENCLATURA UTILIZADA

**A:** Adenina

**BAAR:** Bacilos Ácido Alcohol Resistentes, su equivalente en inglés es AFB  
(Acid Fast Bacilli)

**BCG:** Bacilo Calmette-Guerin

**bp:** Base pairs (pares de bases)

**C:** Citosina

**CTAB :** Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (Bromuro de cetiltrimetilamonio)

**DNA:** Desoxiribonucleic Acid (Ácido desóxilribonucleico)

**G :** Guanina

**Kb :** kilo-bases

**L-J:** Lowenstein-Jensen

**Mb:** Mega-bases

**MSP:** Ministerio de Salud Pública

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

**PPD:** Purified Protein Derivative (Derivado Proteico Purificado)

**T:** Timina

**Ta:** Temperatura de annealing o hibridación de los primers

**Taq:** *Thermus aquaticus*

**TB:** Tuberculosis

**Tm:** Temperatura de melting o fusión de los primers

**U:** Uracilo

**WHO:** World Health Organization

**Z-N:** Ziehl-Neelsen

## RESUMEN

Con el presente trabajo se pretende establecer un sistema de detección molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que incluye las especies: *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*; en formato “in house” con sensibilidad y especificidad altas respecto a los sistemas utilizados en forma cotidiana.

El diseño de este sistema parte de la selección de un gen específico altamente conservado dentro del grupo a analizar. El gen 16S rRNA fue elegido y estudiado a fin de determinar la secuencia con mayor homología entre las especies agrupadas en el complejo a partir de la cual se diseñaron los primers respectivos.

Para optimización del sistema se extrajo el DNA de cultivos aislados de *Mycobacterium tuberculosis* con lo cual se determinaron el protocolo y programa de ciclamiento para la PCR. El producto de amplificación se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% obteniéndose un fragmento de aproximadamente 220bp.

La sensibilidad se estableció mediante la aplicación del sistema optimizado a diluciones seriadas de DNA de concentración conocida para determinar el límite de detección que es de 101.12ng/ml.

La especificidad fue determinada por dos vías: electrónicamente mediante un análisis de homología con la ayuda de BLAST y también aplicando el sistema a muestras de DNA humano, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con los cuales no se obtuvieron productos de amplificación.

**Palabras clave:** Diagnóstico tuberculosis, PCR, *Mycobacterium tuberculosis* complex.

## ABSTRACT

In the present dissertation, we attempt to establish a molecular detection system of *Mycobacterium tuberculosis* complex which includes the following species: *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*; by using an “in house” assay with higher sensibility and specificity with respect to traditional microbiology detection systems.

The design of this system is based on the selection of a specific highly-preserved gene common to the group of microorganisms of interest. The 16s rRNA gene was chosen and analyzed in order to determine the region with higher homology among grouped species within the complex considered for primers design.

To achieve the most favorable system conditions, DNA was isolated from *Mycobacterium tuberculosis* cultures. A PCR protocol and a cycling program was designed for that purpose. The amplification product was observed through 2% agarose gel electrophoresis that yielded a fragment with a length of 220bp approximately.

The analytical sensitivity of the assay was determined by the application of the optimized system to serial dilutions of DNA of known concentration. The detection limit was 101.12ng/ml.

Assay specificity was confirmed by two methods: electronic through homology analysis with the help of the BLAST algorithm; and also using human DNA and DNA from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. These assays yielded no amplification products.

**Key words:** Tuberculosis diagnosis, PCR, *Mycobacterium tuberculosis* complex



## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más antiguas que han aquejado a la humanidad y aún en la actualidad continúa siendo una enfermedad infecciosa asesina y un problema de salud universal de enormes dimensiones, a pesar de que se han desarrollado vacunas y antibióticos diversos<sup>28,40a</sup>. La TB es considerada la segunda enfermedad infecciosa más común y la de mayor mortalidad entre las enfermedades infecciosas en el mundo. Debido a los recientes movimientos masivos de la población y el SIDA, la tuberculosis ha retomado su importancia dentro de la salud pública<sup>27</sup>. Su asociación con SIDA y la infección con VIH ha significado que la TB sea la principal causa de muerte entre los individuos VIH (+) con una tasa de mortalidad estimada del 13%.<sup>49</sup>

La TB es una enfermedad muy contagiosa y su transmisión se realiza, al igual que la gripe, a través del aire. La TB, además de los pulmones, puede afectar a otros tejidos como los huesos, causando deformidades óseas. Debido a que este tipo de tejido puede conservarse por largo tiempo, ha sido posible identificar huesos con signos de tuberculosis que datan de hace más de 4,000 años.<sup>40a</sup>

El origen de *M. tuberculosis* ha sido también el blanco de investigaciones recientes. Se cree que las bacterias del género *Mycobacterium* en un inicio se encontraban en el suelo y que ciertas especies fueron evolucionando hasta ser capaces de vivir en mamíferos. Luego, con el proceso de domesticación del ganado, hace unos 25,000 años, el patógeno pasó de estos animales al humano evolucionando a *M. tuberculosis*.<sup>40a</sup>

El diagnóstico temprano es uno de los pasos más importantes en el manejo de la tuberculosis<sup>27</sup>, una detección temprana y un tratamiento oportuno pueden limitar la transmisión del bacilo por lo que la necesidad de mejorar las técnicas de diagnóstico tradicional ha sido inminente.

Entre las nuevas técnicas aplicadas para el diagnóstico de tuberculosis se encuentran: la determinación serológica de antígenos, cromatografía de gases – espectroscopia de masas y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).<sup>27</sup>

A partir de su introducción a los laboratorios de micobacteriología, las técnicas de amplificación han tenido gran acogida debido al alto impacto que representa en la velocidad y precisión de los resultados. Mientras que para diagnosticar una infección mediante cultivo, por ejemplo, se necesitan varias semanas, con la técnica de la PCR se requieren apenas unas horas.<sup>35</sup>

Desde hace varios años atrás se han venido desarrollando distintos sistemas de diagnóstico en formatos “in house” y comerciales, pero lo que se conoce por experiencia es que por un lado, los sistemas “in house” funcionan en un nivel óptimo bajo las condiciones del laboratorio donde fueron desarrollados y, por otra parte los sistemas comerciales a pesar de ser más eficientes tienen costos muy elevados, también se ha probado que ciertos elementos presentes en los especímenes clínicos son inhibidores de la actividad de la *Taq* polimerasa cuando se usan kits comerciales<sup>30</sup>. Es por estas razones que se recurrió al diseño y desarrollo de un sistema de diagnóstico propio que sea sencillo, efectivo y de costo razonable en relación con la naturaleza de la técnica.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Diseñar y optimizar un sistema de diagnóstico molecular de Tuberculosis mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar un análisis de homología de secuencias propias del genoma de las especies incluidas en el *M. tuberculosis* complex.
- Diseñar los primers que permitan la amplificación de una secuencia específica del genoma de *M. tuberculosis* complex.
- Aplicar la técnica de la PCR para la identificación específica de *M. tuberculosis* complex.
- Determinar la sensibilidad y especificidad analíticas del sistema.

# CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

## 1.1- *Mycobacterium tuberculosis* complex

Al momento, se considera a *M. tuberculosis* como un complejo que incluye las especies *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, y *M. canettii* todas ellas causantes de tuberculosis (TB)<sup>7</sup>. Los organismos del complejo *M. tuberculosis* son responsables de significativas morbilidad y mortalidad entre las personas. Agrupan las siguientes características:

- Pertenecen al orden Actinomycetales, familia Mycobacteriaceae. Son bacilos delgados, no esporulados, no capsulados e inmóviles.<sup>11</sup>
- Son aerobios estrictos de mayor éxito en tejidos con gran contenido de oxígeno, como los pulmones.<sup>6</sup>
- Son patógenos intracelulares facultativos que usualmente infectan a fagocitos mononucleares (i.e. macrófagos)
- Los microorganismos del género *Mycobacterium* presentan un crecimiento lento en comparación con otras bacterias, los tiempos de división celular son largos y muy variables con un tiempo de generación de 12-18 horas por lo que varias semanas pueden transcurrir para que se puedan visualizar sus colonias.<sup>3</sup>
- Son hidrófobos con un alto contenido de lípidos de alto peso molecular en su pared celular. Son relativamente impermeables a la tinción y esto es debido a que las células hidrófobas tienden a agruparse entre si. La pared celular de las micobacterias está compuesta de dos tipos de

polímeros principalmente, arabino galactano micolato y peptidoglicano, los lípidos representan entre el 20 al 40% del peso seco.<sup>3</sup>

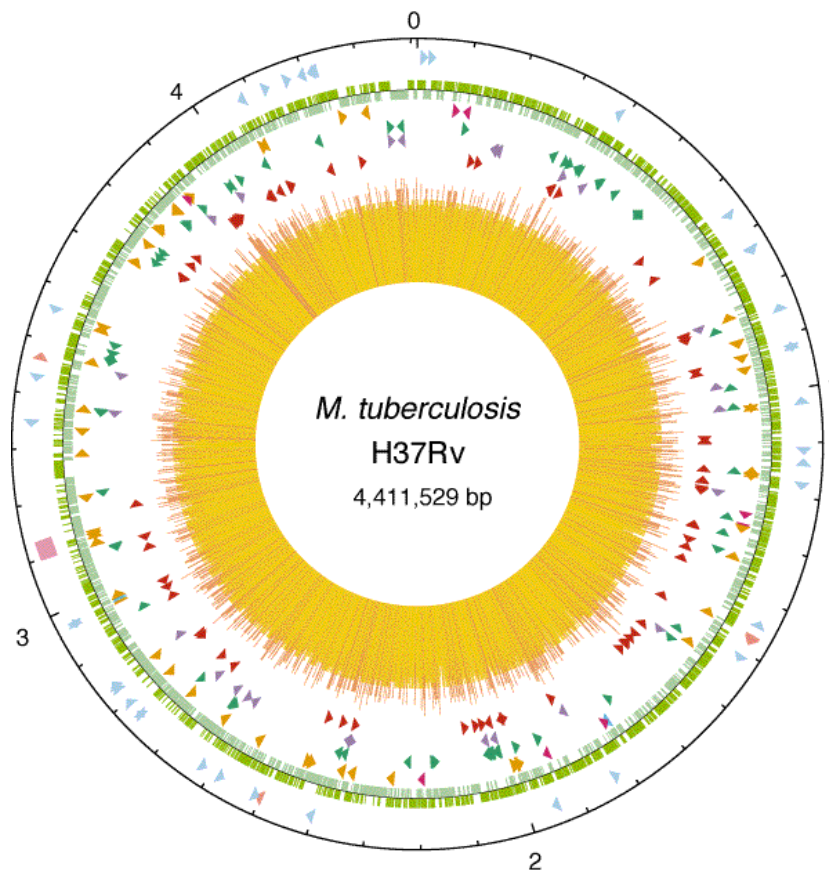
- La única forma de teñirlos es con colorantes combinados con fenol (i.e. técnica Ziehl-Neelsen). Una vez teñidas las células resisten a la decoloración con solventes orgánicos acidificados por lo cual son llamados BAAR.
- Tienen un 99.9% de similitud a nivel de nucleótidos e idénticas secuencias del gen 16S rRNA<sup>5,7</sup> por lo cual se asume que derivan de un ancestro común.

*M. tuberculosis* es el organismo más común del complejo, *M. africanum* y *M. canettii* son patógenos exclusivamente humanos, mientras que *M. bovis* puede transmitirse de animales infectados a los humanos<sup>22</sup>, y *M. microti* infecta principalmente roedores.<sup>7</sup>

Debido al inusual alto grado de conservación de sus genes, se ha sugerido que los miembros del *M. tuberculosis* complex sufrieron un brusco cuello de botella evolutivo al momento de la especiación ocurrida hace 15,000-20,000 años<sup>37</sup>. Se ha especulado también que *M. tuberculosis* evolucionó de *M. bovis* por una adaptación específica del patógeno animal al hospedero humano.<sup>38</sup>

Las infecciones más comunes son las pulmonares y en estos casos los bacilos se encuentran en el esputo en concentraciones de  $10^4$  o más bacilos/ml.<sup>3</sup>

### 1.1.1- *Mycobacterium tuberculosis*



**Figura 1.1:** Mapa circular del cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv. El círculo externo muestra la escala en Mb, con 0 representando el origen de replicación. El primer anillo del exterior denota las posiciones de los genes de RNA estables (tRNAs son azules, los demás rosas) y la región de repetición directa (cubo rosa); el segundo anillo hacia adentro se muestra la secuencia codificante mediante filamentos (en sentido horario, verde oscuro; en sentido antihorario, verde claro); el tercer anillo representa el DNA repetitivo (secuencias de inserción, naranja; familia 13E12 REP, rosa oscuro; profago, azul); el cuarto anillo muestra la posición de los miembros de la familia PPE (verde); el quinto anillo muestra los miembros de la familia PE (púrpura, excluyendo PGRS); y el sexto anillo muestra la posición de las secuencias PGRS (rojo oscuro). El histograma (centro) representa el contenido G+C, con <65% G+C en amarillo y >65% G+C en rojo. La figura fue generada con software de DNASTAR (Tomada de: Cole et al., 1998)

Son varias las especies de *Mycobacterium* que producen TB, sin embargo es *Mycobacterium tuberculosis* el principal agente causante de la infección<sup>16</sup>. En 1882 el microbiólogo alemán Robert Koch describió el agente responsable de la tuberculosis en los humanos, enfermedad que para entonces

causaba 1/7 de las muertes en toda Europa y 1/3 de las muertes en personas jóvenes en edad productiva<sup>28</sup>. En aquel momento el agente era conocido como “bacilo de Koch” y más tarde sería clasificado como *Mycobacterium tuberculosis*.

El genoma completo de *M. tuberculosis* fue secuenciado en el Instituto Sanger y se publicó en junio de 1998. El genoma contiene 4, 411,532bp que codifican 3,959 genes.<sup>8</sup>

### **1.1.2- *Mycobacterium bovis***

La tuberculosis causada por *Mycobacterium bovis*, a pesar de que se presenta en varias especies, es sobretodo un problema humano aunque no se conozcan datos reales sobre la magnitud de personas infectadas con esta micobacteria ya que en forma equivocada se ha subestimado la capacidad infectiva de este agente o se ha dado por hecho su erradicación. Otro factor que influye en este desconocimiento es que en muchos laboratorios de diagnóstico, los métodos aplicados no permiten diferenciar entre una micobacteria y otra e incluso algunos métodos inhiben el crecimiento de *M. bovis*. La TB producida por esta micobacteria continúa siendo una importante zoonosis en los países en desarrollo en todo el mundo.<sup>3</sup>

Existen evidencias de la permanencia de la infección en una población con la micobacteria bovina aún cuando ésta ha sido erradicada de los animales domésticos productores de alimentos. La amenaza principal para las personas es la infección mediante animales para consumo, sobretodo en los países en vías de desarrollo.<sup>3</sup>

El primer caso bacteriológicamente confirmado de tuberculosis pulmonar bovina fue descrito en 1909, y posteriormente con las investigaciones realizadas se concluyó que entre el 1 y el 3% de los casos de tuberculosis pulmonar eran causados por *M. bovis*<sup>2</sup>. El nombre fue oficialmente asignado en 1970 por Karlson y Lessel.

### **1.1.3- *Mycobacterium africanum***

Representa una forma intermedia entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, causa más del 60% de TB pulmonar en habitantes de poblaciones de África tropical<sup>51</sup> y es muy raro en nuestro entorno.

*M. africanum* fue descrito en 1968 y presenta variantes bioquímicas en relación con su distribución en diferentes regiones de África.<sup>24</sup>

Las manifestaciones clínicas producidas por *M. africanum* son distinguibles de las ocasionadas por cualquier otra micobacteria del complejo ya que tiende a producir infecciones diseminadas. Una correcta identificación tiene su importancia epidemiológica, debido a que permite detectar cepas o brotes y aplicar las normas de control adecuadas.<sup>31</sup>

Actualmente el genoma de este organismo está siendo secuenciado en el Instituto Sanger y hasta el momento se han dado lectura a 32.837 Mb lo cual representa un teórico 99.9% del genoma completo.



#### **1.1.4- *Mycobacterium canettii***

Georges Canetti del Instituto Pasteur de París, Francia fue quien aisló por primera vez esta micobacteria en 1969 a partir de una colonia blanda de una variante de *M. tuberculosis* de un granjero de 20 años que sufría de tuberculosis pulmonar. En base a la morfología de sus colonias fue fácilmente discriminada de *M. bovis* y *M. bovis* BCG<sup>36</sup>. Fue añadida a la lista del complejo *M. tuberculosis* en 1997.

Es un organismo poco usual, varía sutilmente de *M. tuberculosis* y es generalmente aislado de pacientes provenientes de África. Se caracteriza por tener una sola copia del gen IS1081, la morfología de sus colonias y por el contenido lipídico de su pared celular.<sup>43</sup>

El tipo de colonia blanda de *M. canettii* puede cambiar a una forma estable de colonia dura la cual no es reversible. Este cambio en la consistencia de la colonia no altera los patrones bioquímicos, de cultivo o de resistencia a fármacos de las cepas aisladas y se cree que este hecho está ligado a la composición lipídica de la pared celular.<sup>43</sup>

#### **1.1.5- *Mycobacterium microti***

Las cepas de *M. microti* fueron aisladas por primera vez en los años 30 a partir de ratas de agua y más recientemente de pacientes inmuno-deprimidos.

En los años 50 y 60, *M. microti* fue considerado como no patógeno para humanos y por esta razón fue utilizado como una vacuna experimental para TB en ensayos realizados en el Reino Unido y República Checa.<sup>40</sup>

Causa tuberculosis en roedores y produce lesiones locales en cobayos y conejos. Sin embargo, al igual que cualquier miembro del complejo de *M. tuberculosis* puede producir infección en el hombre aunque las infecciones provocadas por este patógeno en humanos ocurren muy esporádicamente.

*M. microti* se diferencia de los demás miembros del complejo en su particular morfología celular de S aunque es difícil distinguirlo basándose en propiedades bioquímicas. Debido a la dificultad del diagnóstico de infecciones causadas por este agente por métodos bacteriológicos, se presume que estas infecciones entre humanos han sido pasadas por alto hasta ahora haciendo imposible estimar la frecuencia en que ocurren.<sup>44</sup>

## **1.2- Incidencia de TB pulmonar**

La Organización Mundial de la Salud informa que la TB causa alrededor de dos millones de muertes cada año en todo el mundo. Un tercio de la población mundial se encuentra infectada y una persona en el mundo adquiere la infección con el bacilo de la TB cada segundo. Entre 5-10% de las personas que adquieren el bacilo (excepto los infectados con VIH) desarrollan la enfermedad en algún momento de su vida<sup>49</sup>, de ahí la enorme importancia de la implementación en los laboratorios de diagnóstico de metodologías que permitan una rápida y efectiva detección del agente causante.

Durante el siglo XX se logró reducir la morbilidad y mortalidad de TB en los países desarrollados, gracias a las prácticas de salud pública, a la aplicación de la vacuna de *M. bovis* BCG (bacille Calmette-Guérin) y el desarrollo de antibióticos en los años 50. Sin embargo esta tendencia se vio

revertida a mitad de los años 80 con la aparición de una nueva enfermedad, el SIDA, cuya relación con la TB se explica más adelante; además del incremento de personas sin hogar y la pobreza. Pero la asignación de fondos, entrenamiento de personal y principalmente un monitoreo en la distribución de antibióticos permitieron una vez más disminuir el número de casos de TB en Estados Unidos y Europa.<sup>13</sup>

En los países en vías de desarrollo el panorama es muy distinto, basta con observar las siguientes estadísticas: La incidencia de TB en América del Norte es inferior a 10 por 100,000 mientras que en Asia se encuentra entre 100 y 300 por 100,000 y en África central es mayor a 300 por 100,000.<sup>40a</sup>

Según los últimos datos, en Ecuador la tuberculosis respiratoria representó la decimoquinta causa de muerte en el año 2004. De un total de 54,729 defunciones, 697 fueron causadas por TB representado así el 1.3% de las defunciones.<sup>19</sup>

Más del 60% de personas infectadas muere si no reciben tratamiento. En esencia, la mayoría de los casos reportados pertenecen al tercer mundo<sup>48</sup> lo cual es lógico tomando en cuenta los niveles de pobreza y las malas condiciones de vida que sufre la mayoría de habitantes de estos países, sin mencionar la falta de difusión de una cultura de prevención y atención médica adecuada<sup>45</sup> condición agravada aún más por la resistencia múltiple a los antibióticos.<sup>10</sup>

El actual aumento de los casos de TB por año, se debe principalmente a la propagación del SIDA<sup>14</sup>. La infección por VIH y TB forman una combinación letal, acelerando uno el progreso de la otra ya que el VIH debilita el sistema inmune. Una persona VIH-positiva e infectada con TB es muchas veces más

propensa a desarrollar la enfermedad que otra persona con TB y VIH-negativa. La TB es la principal causa de muerte entre las personas VIH-positivas y representa cerca del 13% de las muertes por SIDA en todo el mundo<sup>14,49</sup>.

Otros factores que también incrementan la ocurrencia de TB son la diabetes mellitus, alcoholismo, desnutrición y terapia inmunosupresora (MSP, 2005).

### **1.3- Transmisión**

Aquellas personas que tienen la enfermedad en sus pulmones pueden infectar a otras personas<sup>49</sup>. Los bacilos tienden a diseminarse con facilidad resultando la infección pulmonar, la mayoría de las veces, de la inhalación de pequeñas gotas de secreciones respiratorias que contengan cierto número de bacilos<sup>16</sup> y que son liberadas cuando la persona enferma tose, estornuda, habla o escupe.

Sin la aplicación de un adecuado tratamiento, cada persona con TB activa infectará entre 10 y 15 personas cada año. Sin embargo, no todas las personas infectadas con el bacilo de la TB desarrollarán la enfermedad ya que el sistema inmune se encarga de bloquear la acción del bacilo el cual, rodeado de una cubierta serosa, puede permanecer latente por años hasta que el sistema inmune se debilite aumentando la posibilidad de desarrollo de la enfermedad.<sup>49</sup>

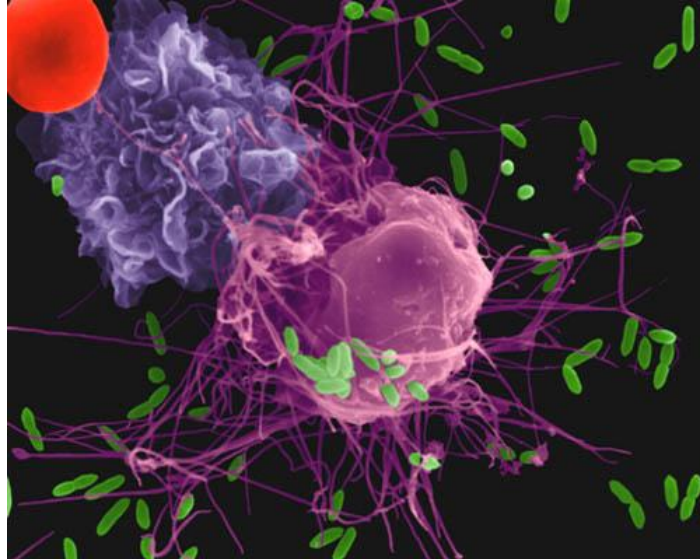
Es posible también que la transmisión se de a partir de especies animales susceptibles y sus productos, puede citarse como un ejemplo, la leche.<sup>28</sup>

Un problema creciente es la multirresistencia a fármacos cuya causa principal es el abandono del tratamiento por parte del paciente<sup>10</sup>. Los casos de TB multirresistente son poco tratables por lo que suelen ser mortales. Las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos por lo que debe suponerse que todos los pacientes que han recibido tratamiento con anterioridad poseen bacilos multirresistentes mientras no sea demostrado lo contrario.

Una cepa multirresistente se define como aquella que presenta resistencia a la isoniazida y rifampicina, con o sin resistencia a otros fármacos.<sup>25</sup>

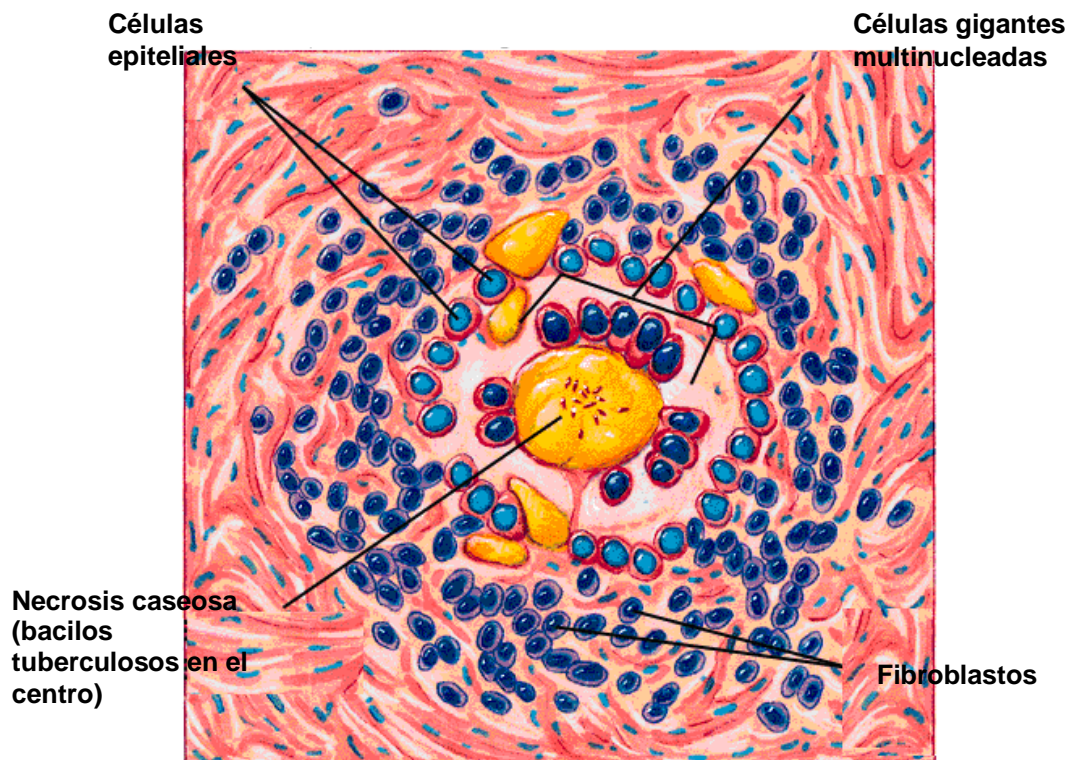
#### **1.4- Manifestaciones clínicas**

En los pulmones, los bacilos son fagocitados por los macrófagos alveolares, los cuales extienden su membrana plasmática formando pseudópodos que engloban al agente extraño formando vesículas llamadas fagosomas<sup>16</sup>. Como respuesta de hipersensibilidad se forman pequeños nódulos duros conocidos como tubérculos, de ahí el nombre de la enfermedad. A menudo el proceso se detiene en esta fase, aunque las bacterias suelen permanecer vivas en el interior de los fagosomas de los macrófagos donde se multiplican. Eventualmente, cuando los macrófagos infectados se lisan, liberan un gran número de bacilos.



**Figura 1.2:** Electromicrografía de un macrófago (rosa) atacando a *E. coli* (verde). El monocito (púrpura) ha sido reclutado mediante factores solubles secretados por el macrófago. La esfera roja es un eritrocito. (Tomado de: Goldsby, 2003)

Los mecanismos que pueden explicar la supervivencia de las micobacterias en el interior de los macrófagos son: resistencia a los productos oxidativos, inhibición de la fusión de los fagosomas y lisosomas e inhibición de la difusión de enzimas lisosomales. Puede ser que después de un tiempo el tubérculo cambie su consistencia a una similar a la del queso, entonces la lesión se conoce como caseosa (Figura 1.3). Si estas lesiones llegan a calcificarse se las llama complejos de Ghon los cuales se pueden observar en una radiografía de tórax.<sup>28</sup>



**Figura 1.3:** Formación del tubérculo en tuberculosis (Tomado de: Talaro. 1999)

Puede ocurrir que las lesiones tuberculosas se licuen y formen cavernas tuberculosas llenas de aire. Cuando estas cavernas se forman, la micobacteria puede diseminarse a otras partes del cuerpo denominándose a esta fase como “tuberculosis de reactivación” debido a que los bacilos se reactivan en el sitio donde ocurrió la infección inicial.<sup>28</sup>

La enfermedad tiene una lenta evolución con un período de incubación de 4 a 12 semanas. Los síntomas de la TB incluyen fiebre, sudoraciones nocturnas, pérdida excesiva de peso y del apetito, fatiga y tos y manifestaciones de la lesión pulmonar con expectoración sanguinolenta.<sup>28</sup>

El patrón clínico más común que sigue a la infección con *M. tuberculosis* se denomina tuberculosis pulmonar y aparece en cerca del 90% de las personas infectadas (OPS, 2000).

## **1.5- Métodos de diagnóstico tradicional**

Se les ha denominado métodos de diagnóstico a todas aquellas pruebas que se realizan en forma rutinaria en los laboratorios clínicos para la determinación de *M. tuberculosis*<sup>28</sup>. El diagnóstico de TB pulmonar se establece por:

- Síntomas respiratorios: tos con expectoración sin importar el tiempo de evolución, dificultad para respirar (disnea), dolor torácico y expectoración sanguinolenta (hemoptisis).
- Síntomas generales: sudoración (diaforesis), fiebre, dolor de cabeza (cefalalgia), falta de apetito (anorexia) y extrema debilidad muscular (adinamia).

Las pruebas convencionales para el diagnóstico de TB incluyen: radiografía de tórax, baciloscopía, cultivo y la prueba cutánea de tuberculina o PPD (Derivado Proteico Purificado).

### **1.5.1- Prueba cutánea de tuberculina**

La prueba de la tuberculina se basa en la inmunidad celular que adquieren las personas que son infectadas con *M. tuberculosis* debido a que los macrófagos fagocitan a los bacilos actuando principalmente las células T sensibilizadas. Esta prueba fue desarrollada en 1890 por Koch y consiste en inyectar un derivado proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis* debajo de la piel (prueba de Mantoux). Cuando las células T han sido sensibilizadas



reaccionan frente a estas proteínas y se produce en 48 horas una reacción de hipersensibilidad retardada con enrojecimiento y endurecimiento de la zona alrededor del lugar de la punción.<sup>28</sup>

La positividad de la reacción se evalúa por el tamaño del endurecimiento (Figura 1.4). Un resultado positivo en una persona joven puede indicar tuberculosis activa mientras que en personas de mayor edad sería consecuencia de enfermedad previa, de la vacunación o un falso positivo. Se recomienda para ambos casos realizar cultivo y radiografías de tórax.<sup>28</sup>

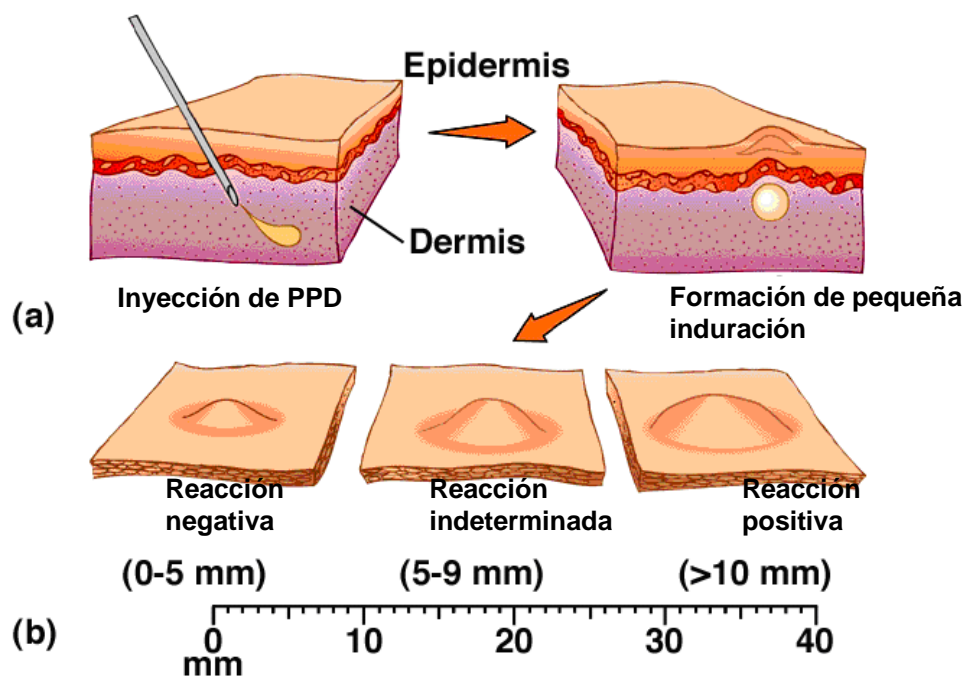


Figura 1.4: Prueba de tuberculina. (Tomado de: Talaro, 1999)

### 1.5.2- Baciloscopía

Esta es una prueba utilizada para detectar la presencia de micobacterias e involucra principalmente la tinción y el examen microscópico directo de un espécimen de esputo. La técnica recibe también los nombres de: “*Acid fast bacilli stain*”; “*AFB stain*”; “*Tuberculosis smear*”; “*TB smear*”.

La muestra ideal para una baciloscopia es el esputo ya que la sensibilidad disminuye para otro tipo de muestras.<sup>6</sup>

Esta técnica de examen microscópico directo es fundamental en toda investigación bacteriológica de TB y se aplica tanto para el diagnóstico como para control de tratamiento.

Un examen de 3 o 6 baciloscopias puede detectar hasta el 80% de los enfermos siempre y cuando la expectoración sea de origen bronquial y el personal de laboratorio esté capacitado en la técnica<sup>39</sup>.

Resulta complicado y toma un tiempo considerable el identificar los bacilos de TB en el esputo mediante microscopia debido a que la pared celular de estos organismos posee características estructurales especiales. Se espera que el tiempo de retraso en la determinación de AFB positivo sea aproximadamente 75 días, retraso que puede ser causado además por el paciente y/o por el médico tratante. Un paciente con AFB positivo puede infectar en los países subdesarrollados a entre 3-5 personas sanas.<sup>27</sup>

Existen 2 tinciones principales: Ziehl-Neelsen (Z-N), que demuestra la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes; y Truant, que permite por fluorescencia la visualización de las micobacterias. La más aplicada es la tinción de Z-N a pesar de que la de Truant es más sensible pero sin embargo más costosa ya que requiere de la adecuación de un cuarto oscuro para un microscopio de luz ultravioleta.

#### 1.5.2.1- Tinción Ziehl-Neelsen

La tinción Z-N fue descrita por primera vez por dos alemanes: el bacteriólogo Franz Ziehl y el patólogo Friedrich Neelsen<sup>4</sup>. Todos los

microorganismos que se tiñen con esta técnica se los conoce como “bacilos ácido-alcohol resistentes” o BAAR. Aunque *M. bovis* y *M. tuberculosis* son BAAR, las demás micobacterias y otros actinomicetales y corinebacterias lo son también, por lo que la presencia de BAAR no garantiza que se trate de *M. tuberculosis* o *M. bovis*.

Esta técnica se divide en fases de coloración, decoloración y coloración de contraste. Primero, se extiende la muestra de esputo sobre un portaobjetos, se fija la placa pasándola un par de veces por la llama y luego se realiza la coloración. En el momento de tomar la muestra, si el esputo no es producido se puede llevar a cabo una broncoscopia<sup>42</sup>.

La coloración consiste en cubrir la superficie del extendido con fucsina fenicada. Con la llama de un mechero se calienta la placa por debajo de ésta hasta que se emitan vapores blanquecinos. Luego, la fucsina es eliminada lavando la placa con agua a baja presión.

Para la decoloración, se cubre el extendido con alcohol ácido y se lava con agua a baja presión. Una vez decolorada la placa se procede a la coloración de contraste para lo cual se cubre la superficie del extendido con azul de metileno. Las placas teñidas se secan a temperatura ambiente y una vez secas se observan al microscopio.<sup>3</sup>

Los bacilos aparecen como bastones delgados, ligeramente curvos, teñidos de rojo, con gránulos más coloreados en su interior por lo general, aislados, en parejas o en grupos sobre el azul claro de la tinción de contraste.<sup>6</sup>

Si se observan micobacterias, el espécimen debe llevarse a un medio de cultivo; algunas veces, aún si no se observan bacilos se realiza el cultivo

debido a que es posible que el número de éstos no sea suficiente como para poderlos observar.<sup>42</sup>

La sensibilidad alcanzada por este método es de 104 AFB/ml.<sup>30</sup>

#### 1.5.2.2- Técnica de Truant

Fue descrita por Haggeman en 1937 y se basa en la observación a través del microscopio ultravioleta de campo oscuro de micobacterias que se colorean con una mezcla de fluorocromos<sup>6</sup>. Los extendidos son teñidos con la solución colorante de auramina-rodamina.<sup>22</sup>

La lectura se realiza con facilidad y rapidez pero presenta algunas desventajas que son:

- Debe trabajarse de preferencia en un cuarto oscuro.
- El personal debe tener un nivel de capacitación más elevado que para la microscopía corriente.
- La mayor parte de los productos patológicos contienen partículas fluorescentes lo cual puede inducir a error.
- Su aplicación se justifica en laboratorios que procesan más de 50 muestras diarias y cuentan con los recursos suficientes para equipamiento y mantenimiento.

#### 1.5.3- **Cultivo**

El cultivo está dirigido a aquellas muestras en las que se sospecha una escasa población bacilar, como aquellas provenientes de estudios de

contactos, imágenes radiológicas patológicas pulmonares, pediátricas y en muestras de procedencia extrapulmonar.

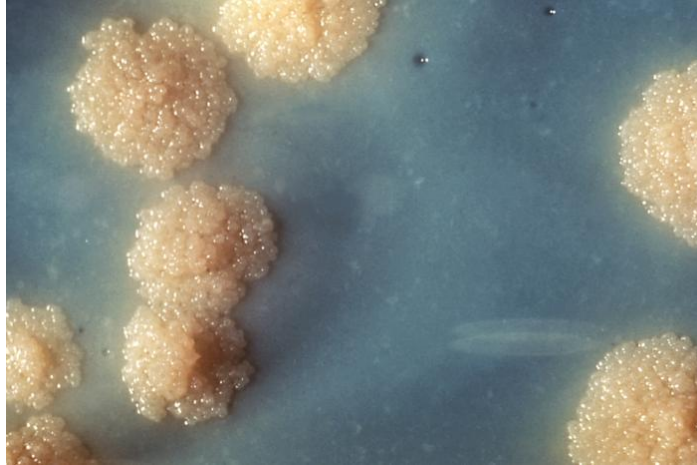
El cultivo para *Mycobacterium tuberculosis* es una técnica que requiere mayor tiempo, equipamiento y costo que la baciloscopía, pero ofrece una mayor sensibilidad y especificidad (100%)<sup>39</sup>.

Es el método más sensible y específico para detectar micobacterias. Estos microorganismos necesitan medios enriquecidos especiales como el medio Lowenstein-Jensen (L-J) que, sin ser el ideal, es el que reúne más condiciones para usarlo en forma masiva en países como el nuestro.

Entre las condiciones que deben controlarse para el cultivo están la temperatura, la cual es óptima para el desarrollo y crecimiento de las micobacterias entre 35 y 37°C, con un pH de 6.7 a 6.9 y en presencia de 5-10% de CO<sub>2</sub> para estimular el crecimiento.<sup>6</sup>

Antes de proceder al cultivo, es preciso realizar un paso previo de descontaminación, ya que en ciertas muestras pueden existir otros microorganismos de la flora normal. Para esto la muestra debe homogenizarse con el fin de liberar el bacilo del moco, material celular y tejidos que puedan estar presentes y luego se incuba con NaOH al 4% con rojo de fenol, se centrifuga, se elimina el sobrenadante y por último se neutraliza con ácido clorhídrico 1N o ácido sulfúrico 8% para luego proceder a la siembra en los medios de cultivo.<sup>3</sup>

Se siembran de 3 a 3.5ml en cada tubo de medio L-J. Para obtener un cultivo positivo, la muestra deberá contener al menos 10 bacilos viables por ml<sup>3</sup>. Para poder observar resultados del cultivo se necesitan entre 1 y 8 semanas.<sup>35</sup>



**Figura 1.5:** Acercamiento de un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* que revela la morfología de las colonias de este organismo. (Tomado de: Public Health Image Library, CDC. 2006 [http://phil.cdc.gov/])

La superficie incolora y rugosa es una característica típica de la morfología observada en las colonias de *M. tuberculosis*. Un examen macroscópico del patrón de crecimiento colonial es aún una forma de identificación del microorganismo.

#### **1.5.4- Radiografía simple de tórax**

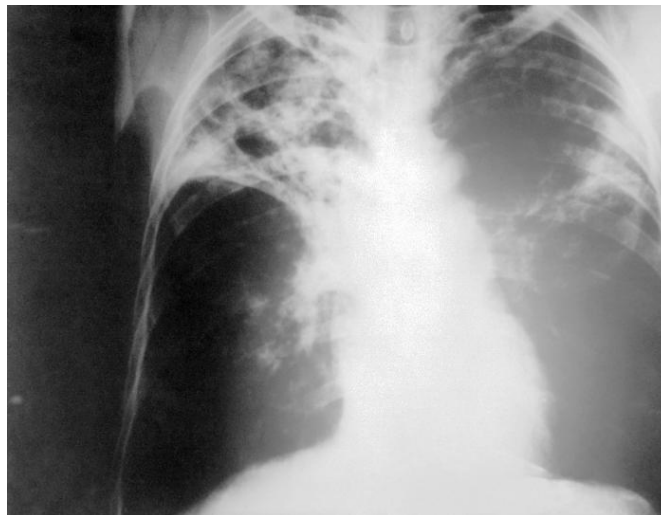
La radiografía de tórax solo orienta la sospecha de la enfermedad, no es un método de confirmación diagnóstica.<sup>39</sup>

La vista más utilizada es la ántero-posterior. En la TB pulmonar activa, se observan cavidades y/o infiltraciones en la parte superior de los pulmones aunque las lesiones pueden aparecer en cualquier parte de los pulmones.

Las viejas lesiones usualmente se presentan como nódulos pulmonares con o sin cicatrices fibrosas y pérdida de volumen. Los nódulos y las cicatrices fibrosas pueden contener bacilos tuberculosos de reproducción lenta con el

potencial de una progresión futura a TB activa. Por el contrario, las lesiones nodulares calcificadas tienen un riesgo muy bajo de una futura progresión a TB activa.

Las anomalías encontradas en la radiografía de tórax pueden sugerir, mas nunca diagnosticar TB. Sin embargo, pueden usarse para descartar la posibilidad de una TB pulmonar en una persona que ha tenido reacción positiva a la prueba cutánea de tuberculina sin la presencia de los síntomas de la enfermedad.



**Figura 1.6:** Radiografía torácica anteroposterior de un paciente diagnosticado con tuberculosis bilateral avanzada (Tomado de: Public Health Image Library, CDC. 2006 [<http://phil.cdc.gov/>])

## 1.6- El Diagnóstico Molecular

A pesar de que los métodos utilizados de forma tradicional permiten detectar de manera eficaz la presencia de micobacterias, la necesidad de la aplicación del tratamiento respectivo al paciente en forma inmediata, ha dado paso al desarrollo de técnicas moleculares que permitan obtener resultados en un tiempo mucho más corto y con alta especificidad.<sup>35</sup>

Antes de introducir técnicas moleculares en cualquier laboratorio de diagnóstico es necesario hacerse las siguientes preguntas estratégicas: ¿cuál es el organismo blanco?; ¿qué espécimen clínico será analizado?; ¿las pruebas moleculares satisfacen los criterios de altas sensibilidad y especificidad, velocidad, simplicidad y relevancia clínicas?

Por lo general, las técnicas de diagnóstico molecular están indicadas para la detección de organismos que no pueden crecer *in vitro* o para los cuales las técnicas de cultivo disponibles tienen muy baja sensibilidad; también para la detección de organismos que requieren de medios complejos y/o tiempos de incubación prolongados<sup>30</sup>. Tomando en cuenta estos criterios se ha concluido que el diagnóstico de TB mediante técnicas moleculares es aplicable.

Cualquier segmento de ácido nucleico puede ser amplificado usando DNA polimerasa y primers debidamente diseñados partiendo de una secuencia conocida<sup>30</sup>. Aún cuando el número de bacilos presentes en la muestra sea muy bajo (teóricamente sólo uno) éste puede ser detectado por la técnica de PCR.

La PCR permite detectar DNA de diversas fuentes como: esputo, líquido céfalo raquídeo, suero, fluido pleural, orina y biopsias.<sup>27</sup>

## 1.7- PCR

Descubierta por el bioquímico norteamericano Kary Mullis en abril de 1983, la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, es una técnica relativamente sencilla y muy versátil; se trata de una síntesis bidireccional repetitiva de una secuencia específica de ácido nucleico y que implica 3 procesos críticos: (1) la hibridación de los primers al DNA blanco de cadena



simple; (2) la extensión de los primers, convirtiendo al DNA de cadena simple a doble cadena, y (3) la desnaturalización del DNA para reiniciar el proceso<sup>12</sup>. Estos procesos pudieron automatizarse gracias al uso de una polimerasa termoestable aislada a partir de *Thermus aquaticus*, conocida comercialmente como *Taq* polimerasa.

### 1.7.1- Elementos de la PCR

#### 1.7.1.1- DNA polimerasa termoestable

Es la enzima que cataliza la síntesis del DNA, ésta es aislada de dos clases de organismos: termófilas e hipertermófilas de los reinos *Eubacteria* y *Archeobacteria*, y termófilas del dominio *Archaea*. En la actualidad pueden encontrarse una variedad de enzimas que difieren en fidelidad, eficiencia y capacidad de sintetizar grandes productos de DNA. La enzima más utilizada y exitosa sin embargo, continúa siendo la *Taq* polimerasa obtenida de *Thermus aquaticus*, un organismo de la familia termófila *Archaea*.

La *Taq* polimerasa tiene una actividad específica de aproximadamente 800,000 unidades/mg de proteína, con una eficiencia de extensión de alrededor de 70%<sup>34</sup> y una vida media de 30min a 95°C<sup>50</sup> por lo que no se recomienda más de 30 ciclos de amplificación.

Una PCR estándar contiene entre  $2 \times 10^{12}$  y  $10 \times 10^{12}$  moléculas de enzima, ésta se vuelve limitante cuando la cantidad de moléculas de producto se encuentra entre  $1.4 \times 10^{12}$  y  $7 \times 10^{12}$ .<sup>34</sup>

Si bien la *Taq* polimerasa es ampliamente utilizada para amplificaciones de rutina de fragmentos de pequeño tamaño, cuando se necesita una mayor

fidelidad, el templado tiene varios miles de bases de longitud o se pretende clonar mRNA por RT-PCR (PCR- reverso transcriptasa), otras enzimas pueden presentar ventajas significativas para estos propósitos<sup>34</sup>. Se sabe que la combinación de dos o más polimerasas puede ayudar a incrementar la producción de amplicón, debido a que las capacidades de las enzimas se complementan entre sí.

#### 1.7.1.2- Primers

Los primers también conocidos como iniciadores o cebadores, son un par de oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región complementaria del DNA molde o templado que se desea amplificar, marcan el inicio de la síntesis del DNA por la *Taq* polimerasa y determinan la especificidad y eficiencia de la amplificación. Un diseño cuidadoso de los primers garantiza una alta producción del amplicón deseado, la ausencia de productos inespecíficos y facilita el posterior manejo del producto.

El diseño de los primers se encuentra afectado por los siguientes factores:

##### *a. Longitud del oligonucleótido*

Tiene influencia en la especificidad del sistema, la temperatura de fusión también conocida como temperatura de melting ( $T_m$ ) y el tiempo que se requiere para que exista una completa hibridación del primer a la secuencia complementaria. Además, debe existir cierta complejidad para que la probabilidad de que la hibridación a secuencias distintas del blanco sea muy baja.<sup>9</sup>

Por ejemplo, existe la probabilidad de  $\frac{1}{4}$  de encontrar una A, G, C o T en cualquier secuencia dada de DNA,  $\frac{1}{16}$  de encontrar cualquier dinucleótido,  $\frac{1}{256}$  de encontrar una secuencia dada de 4 bases; así, una secuencia de 16 bases estará presente estadísticamente una vez en cada 4 294 967 296 bases, esto es casi el tamaño del genoma humano o del maíz y mil veces mas grande que el genoma de *E. coli*. De esta forma la asociación de un oligonucleótido de 22 bases con su secuencia blanco es extremadamente específica, mucho más específica que la unión de anticuerpos monoclonales a antígenos determinantes<sup>9</sup>; siempre y cuando la temperatura de hibridación o annealing (*T<sub>a</sub>*) sea la óptima. La meta es diseñar un oligonucleótido con una *T<sub>a</sub>* de al menos 50°C.

La relación entre *T<sub>a</sub>* y *T<sub>m</sub>* es muy importante en la PCR. Como regla general la *T<sub>a</sub>* está entre 3-5°C bajo la *T<sub>m</sub>* más baja del par de primers que serán utilizados (Innis & Gelfand, 1990). De esta forma, si se desea un oligonucleótido con una temperatura de hibridación de al menos 50°C, correspondería a un primer con una *T<sub>m</sub>* ~ 55-58°C. Sin embargo puede suceder que la *T<sub>m</sub>* determinada de esta forma no sea la óptima por lo que será necesario determinarla empíricamente.

#### *b. Temperatura de fusión (T<sub>m</sub>)*

Ambos primers deben ser diseñados de tal forma que tengan *T<sub>m</sub>* similares, de otra forma la amplificación será menos eficiente o incluso puede no funcionar debido a que el primer con la *T<sub>m</sub>* más alta hibridará mal o inespecíficamente a bajas temperaturas mientras que el oligonucleótido con la *T<sub>m</sub>* más baja puede que no funcione a temperaturas más altas.

Para el cálculo de la  $T_m$  se utilizó la siguiente fórmula sencilla conocida también como fórmula de Wallace:

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \text{ } ^\circ\text{C} \quad (\text{Rychlik \& Rhoads, 1990})$$

donde:

$G$  = número de nucleótidos de guanina

$C$  = número de nucleótidos de citosina

$A$  = número de nucleótidos de adenina

$T$  = número de nucleótidos de timina

Pueden aplicarse otras fórmulas más complejas (Anexo 1) para obtener resultados más precisos, sin embargo, la fórmula anterior permite obtener una buena aproximación y no afecta el diseño del sistema.

En la Tabla 1.1 se muestran valores de  $T_m$  de primers de varios tamaños usando la fórmula de Wallace asumiendo un contenido de GC del 50%.

Tamaño del Primer	$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$	Tamaño del Primer	$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$
4	12°C	22	66°C
6	18°C	24	72°C
8	24°C	26	78°C
10	30°C	28	84°C
12	36°C	30	90°C
14	42°C	32	96°C
16	48°C	34	102°C
18	54°C	36	108°C
20	60°C	38	114°C

**Tabla 1.1:** Temperaturas de fusión para distintas longitudes de primers aplicando la fórmula de Wallace.

Las temperaturas calculadas de esta forma son inexactas en los valores extremos; hay que tener cuidado además de que la  $T_m$  del producto sea lo suficientemente baja para asegurar que esté totalmente desnaturalizada a 94°C lo cual asegurará una PCR más eficiente, aunque esto no siempre es necesario. En general, productos entre 100–600 pares de bases se amplifican eficientemente en muchas reacciones.<sup>21</sup>

#### *c. Especificidad*

Depende parcialmente del tamaño del primer. Se debe elegir primers cuya secuencia sea única en el DNA molde, una secuencia altamente repetitiva puede resultar en un “smear” cuando se amplifica DNA genómico.

Ya que la *Taq* polimerasa es activa en un amplio rango de temperaturas<sup>15</sup>, puede extender los primers a temperaturas de hibridación bajas pero, si la temperatura es demasiado baja puede darse una hibridación inespecífica que será extendida por la polimerasa si existiera una homología pequeña en el extremo 3' del primer. Por regla general, una  $T_m$  adecuada se encuentra entre 55-72°C correspondiente a 18-24bp de longitud del primer con un 50% de G+C.<sup>21</sup>

#### *d. Complementariedad en la secuencia de los primers*

Se debe tener cuidado de que el primer no presente homología en sí mismo en más de 3bp ya que existe el riesgo de que se formen estructuras de doble cadena que causarán interferencia con la hibridación al templado. Por otro lado, la homología en los extremos 3' del par de primers puede ocasionar la formación de dímeros (primer dimers) y otras estructuras secundarias como

horquillas que reducen la eficiencia de la reacción disminuyendo la cantidad de producto por competencia.<sup>32</sup>

*e. Contenido de G+C*

La composición de bases recomendada es 45-55% de G+C. El primer elegido no debe contener regiones de poliG o poliC ya que existe el riesgo de que se produzca hibridación inespecífica. Las regiones poliA y poliT también deben evitarse ya que son lugares donde el complejo templado-primer puede deshibridarse<sup>32</sup> disminuyendo la eficiencia de la amplificación. En síntesis, el contenido nucleotídico de un primer debe ser una mezcla casi al azar.

*f. Secuencia 3' terminal*

El apareamiento correcto de los primers se controla esencialmente por las características del extremo 3' de éstos, por las razones mencionadas anteriormente. Otra variable que debe considerarse es la presencia de residuos de C o G en el extremo 3' del primer (G, C, CG o GC) que asegurará que el extremo 3' hibride correctamente debido a los tres puentes de hidrógeno que sirven de enlace entre estos residuos; además ayuda a aumentar la eficiencia de la amplificación reduciendo la posibilidad de que ocurra una deshibridación.

*g. Secuencia 5' terminal*

Para incrementar la estabilidad de la hibridación del primer con el templado, se recomienda incluir en esta región y en las zonas centrales de los oligos, residuos de GC por la estabilidad de los enlaces entre ellos.

#### 1.7.1.3- Deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs)

Una PCR estándar contiene cantidades equimolares de dATP, dCTP, dTTP y dGTP. Para mezclas de reacción de *Taq* polimerasa que contengan 1.5mM de  $MgCl_2$ , se recomiendan concentraciones de 200-250 $\mu$ M de cada dNTP que permiten la síntesis de 6-6.5 $\mu$ g de DNA en una reacción de 50 $\mu$ l. Concentraciones muy altas de los mismos (>4mM) resultan inhibitorias al parecer, debido a que atrapan a los iones  $Mg^{2+}$ . La mínima concentración de dNTPs que permite obtener una buena cantidad de producto amplificado (0.5-1.0pmoles de producto de ~1kb de longitud) es 20 $\mu$ M de cada dNTP.<sup>34</sup>

#### 1.7.1.4- Cationes divalentes

Todas las DNA polimerasas termoestables requieren de cationes divalentes libres, usualmente  $Mg^{2+}$ , como cofactores para su actividad. Ciertas polimerasas menos eficientes trabajan también con buffers que contienen  $Mn^{2+}$ .

Debido a que los dNTPs y oligonucleótidos se unen al  $Mg^{2+}$ , la concentración molar del catión pueden exceder la concentración molar de los grupos fosfato cedidos por los dNTPs más los primers. Por lo tanto es imposible recomendar una concentración óptima de ión  $Mg^{2+}$ , aunque una concentración de 1.5mM en forma de  $MgCl_2$  es usada en forma rutinaria. Se ha reportado que el aumentar la concentración de  $Mg^{2+}$  de 4.5mM a 6mM la hibridación inespecífica ha disminuido en unos casos y ha aumentado en otros. La concentración óptima de  $Mg^{2+}$  debe entonces determinarse en forma empírica para cada combinación de primers y templado.<sup>26</sup>

#### 1.7.1.5- Buffer

Una PCR estándar incluye KCl y buffer Tris-Cl 10mM a un pH entre 8.3 y 8.8. Su capacidad tamponadora es necesaria para crear las condiciones óptimas para la actividad de la *Taq* polimerasa ya que durante la fase de extensión de la PCR a 72°C, el pH de la mezcla de reacción cae en más de una unidad.

#### 1.7.1.6- DNA templado

El DNA templado o molde puede ser añadido a la mezcla de PCR en forma de cadena simple o doble y contiene las secuencias blanco a ser amplificadas. Según la conformación de las moléculas del templado, se conoce que los que adoptan formas circulares cerradas son amplificados menos eficientemente que los DNA lineales. A pesar de que el tamaño del templado no tiene mayor influencia en la efectividad de la reacción, la amplificación de secuencias contenidas en un DNA de alto peso molecular (>10kb) se puede mejorar con un paso previo de digestión con enzimas de restricción, siempre y cuando se tenga cuidado de que éstas no corten dentro de la secuencia blanco.<sup>34</sup>

Una PCR bajo condiciones óptimas es capaz de detectar una sola copia de la secuencia blanco, sin embargo varios miles de copias del DNA blanco son incluidas en la reacción.



## 1.7.2- Procesos críticos de la PCR

### 1.7.2.1- Desnaturalización

Dos hebras de ácido nucleico forman enlaces de hidrógeno entre sus bases complementarias (G – C y A – T ó U) y forman una doble cadena estable, antiparalela. Para lograr que se encuentre en forma de cadena simple el DNA debe ser sometido a calentamiento a una temperatura superior a la  $T_m$  de la cadena doble o parcialmente doble, y enfriarse rápidamente, esto asegura que las hebras desnaturalizadas o separadas no vuelvan a unirse.<sup>9</sup>

La temperatura de desnaturalización del DNA templado de cadena doble está dada por el contenido de G+C. Mientras mayor es la proporción de G+C, mayor la temperatura requerida para separar las hebras del templado y mientras mayor sea la longitud de las moléculas de DNA, mayor será el tiempo y la temperatura para una desnaturalización completa. Si el tiempo o la temperatura aplicados son menores a los requeridos, únicamente aquellas regiones ricas en A+T serán separadas.

Para la *Taq* polimerasa, la temperatura de desnaturalización está entre 94-95°C, la temperatura máxima que puede soportar la enzima durante 30 ciclos o más sin sufrir daño excesivo.

En el primer ciclo, la desnaturalización se lleva a cabo durante 5 minutos con en fin de lograr una separación completa de las moléculas más grandes del DNA templado.

### 1.7.2.2- Hibridación

La temperatura usada para el paso de hibridación o annealing de los primers a las secuencias complementarias del DNA es clave para el éxito de la reacción.

Una consecuencia de tener una  $T_a$  muy baja es que uno o ambos primers hibridarán a secuencias distintas del blanco original como resultado de desapareamientos de una sola base o a la tolerancia de hibridaciones parciales, lo cual es adecuado si se quiere amplificar secuencias blanco similares o relacionadas; sin embargo pueden obtenerse de esta forma productos no deseados inespecíficos.<sup>9</sup>

Una temperatura muy alta, por otro lado resulta en una mínima hibridación de los primers y la baja producción de amplicón, debido a que la probabilidad de hibridación del primer es reducida. Cabe considerar también que un par de primers con  $T_a$  muy diferentes no darán productos únicos y pueden también resultar en un amplificación asimétrica inadvertida.<sup>9</sup>

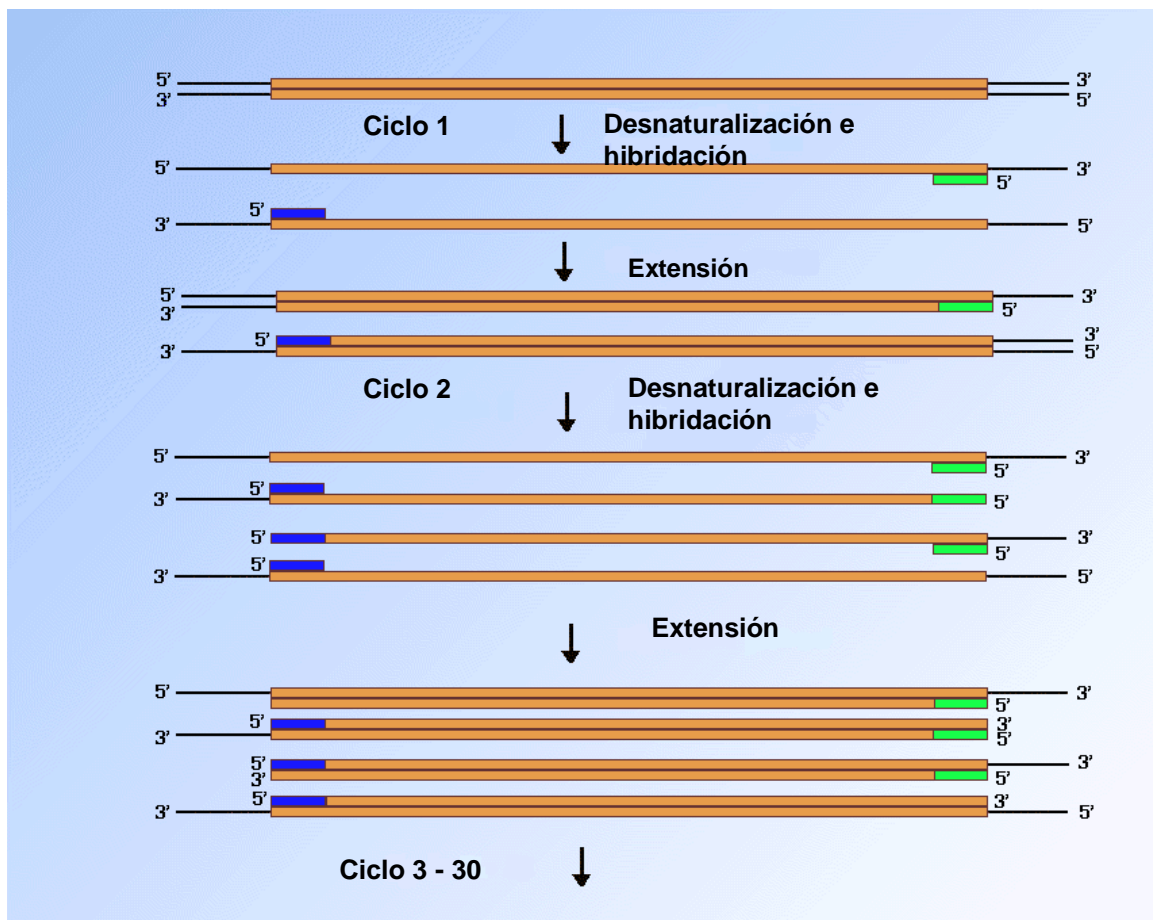
La fase de hibridación es rápida, muchos de los primers hibridan en forma eficiente en 30seg, a menos que la  $T_a$  sea muy cercana a la  $T_m$  o a menos que los primers sean inusualmente largos.<sup>9</sup>

Es conveniente en muchos casos optimizar las condiciones de hibridación realizando una serie de ensayos de PCR a temperaturas entre 2-10°C bajo la menor de las  $T_m$  calculadas para el par de primers. Alternativamente, los termo-ciclos pueden ser programados para usar progresivamente menores temperaturas de annealing en cada par de ciclos consecutivos ("touchdown" PCR; Don et al. 1991) o también "gradient PCR" con gradientes progresivos de temperatura.

### 1.7.2.3- Extensión

Es la fase en la cual los primers hibridados marcan sitio donde la DNA polimerasa realiza la síntesis de la cadena complementaria en sentido 5' → 3'. Para la *Taq* polimerasa la temperatura óptima de hibridación está entre 72-78°C con una tasa de polimerización de ~2000 nucleótidos/min.<sup>34</sup>

Cuando se amplifican fragmentos de DNA pequeños, durante el primer ciclo la extensión ocurre más allá del sitio de unión del otro primer en la cadena complementaria, en el ciclo siguiente ya se obtienen los primeros amplicones de la longitud esperada y del tercer ciclo en adelante la amplificación se realiza en forma geométrica obteniéndose fragmentos con terminaciones truncadas, con acumulación exponencial de los productos. (Figura 1.7)



**Figura 1.7:** Diagrama del proceso de la PCR (Tomado de: Borek, D. 1997)

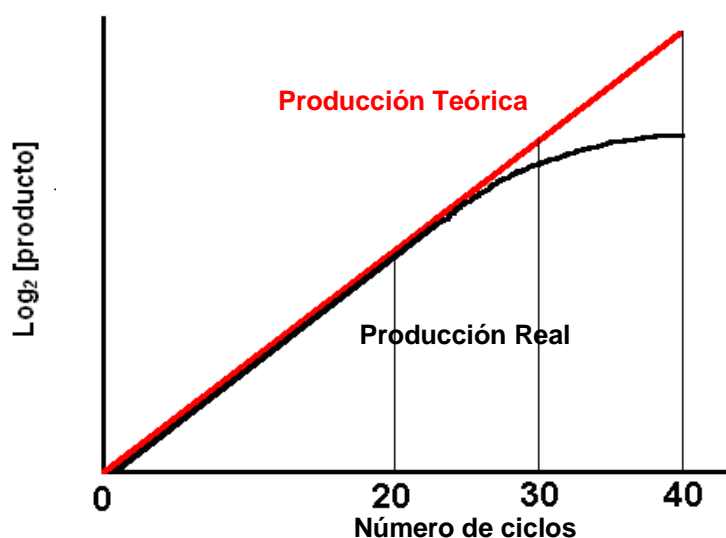
El tiempo asignado para la extensión es de 1 minuto por cada 1000bp de producto. Tiempos mayores son útiles en los ciclos finales cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima ( $>1\text{nM}$ ), y cuando la cantidad presente de dNTPs o primers se vuelve limitante<sup>9</sup>. Puede programarse una extensión final de 4min para permitir la extensión de todos los productos aunque se ha probado que el resultado no se altera significativamente.<sup>34</sup>

### 1.7.3- Número de ciclos

El número de ciclos de amplificación necesario para producir una banda visible en un gel depende en gran medida del número de copias de DNA templado presente al inicio de la reacción y la eficiencia de la extensión y amplificación de los primers. Una vez establecida la fase geométrica, la reacción procede hasta que uno de los componentes se vuelve limitante. En este punto, los productos amplificados específicos suelen ser máximos, considerando que los productos amplificados inespecíficos suelen ser apenas detectables. Este es el caso generalmente después de  $\sim 30$  ciclos en PCRs que contienen  $\sim 10^5$  copias de secuencia blanco y *Taq* DNA polimerasa con una eficiencia de  $\sim 70\%$ .<sup>34</sup>

La degradación de los reactivos (dNTPs, enzima), su agotamiento (primers, dNTPs), la inhibición del producto final (formación de pirofosfato), la competencia de productos no específicos por los reactivos y la competencia por la unión de los primers de productos concentrados ( $>10\text{nM}$ ) re-hibridados pueden ser la causa del llamado “efecto meseta” (Figura 1.8), que es la

atenuación en grado exponencial de la acumulación de producto en las últimas fases de la PCR cuando el producto alcanza 0.3-1.0nM<sup>15</sup>.



**Figura 1.8:** Efecto meseta en la amplificación por PCR (tomado de: Coyne et al., 2001)

La Tabla 1.2 muestra el número teórico de ciclos requeridos para generar 10ng de un producto de 200bp en PCRs que corren a distintas eficiencias (Y) y conteniendo diferente número de DNA templado inicial.

Y	BLANCOS					
	1	10	100	1,000	10,000	100,000
1.00	34	30	27	24	20	17
0.95	35	32	28	25	21	18
0.90	36	33	29	26	22	18
0.85	38	34	30	27	23	19
0.60	40	36	32	28	24	20
0.75	42	38	33	29	25	21
0.70	44	40	35	31	27	22
0.65	46	42	37	33	28	23
0.60	49	45	40	35	30	25
0.55	53	48	43	37	32	27
0.50	57	52	46	40	35	29
0.45	62	56	50	44	38	31
0.40	69	62	55	48	42	35
0.35	77	70	62	54	47	39
0.30	88	79	71	62	53	44
0.25	104	93	83	73	62	52
0.20	127	114	104	89	76	64
0.15	165	149	132	116	99	83
0.10	242	218	194	170	145	121

**Tabla 1.2:** Número teórico de ciclos requeridos para la PCR (Tomado de: Sambrook & Russell, 2001). En azul, el número de ciclos necesarios cuando se utiliza *Taq* polimerasa.

#### **1.7.4- Inhibidores**

Cualquier elemento que se encuentre en exceso en la mezcla de reacción podrá inhibir la PCR. Los inhibidores más comunes son la proteinasa K (la cual puede degradar la DNA polimerasa termoestable), fenol y EDTA. Otras sustancias que pueden también causar interferencia son los detergentes iónicos, heparina, polianiones tales como espermidina, hemoglobina y colorantes de carga para geles tales como azul de bromofenol y xilen-cianol. En varios casos la principal causa de producciones bajas o erráticas son los contaminantes en el DNA templado, el cual es a menudo el único componente de la reacción que es provisto por el investigador.

Muchos problemas con la PCR pueden ser solucionados por una simple limpieza del templado mediante diálisis, precipitación con etanol, extracción con cloroformo y/o cromatografía a través de la resina apropiada.<sup>34</sup>

#### **1.8- Electroforesis**

La electroforesis en gel es un método sencillo y eficiente que fue desarrollado en los años 70 por Daniel Nathans, su función principal es separar macromoléculas, incluyendo ácidos nucleicos o proteínas, de acuerdo a su tamaño, carga eléctrica y otras propiedades físicas.<sup>29</sup>

Un gel, es un coloide en su forma sólida. El término electroforesis describe la migración de partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Etimológicamente “electro” se refiere a la energía de la electricidad y “foresis” del griego *phoros* que significa “llevar a través”; por lo tanto la

electroforesis en gel se refiere a la técnica en la cual las moléculas migran a través de un gel motivadas por una corriente eléctrica.<sup>1</sup>

Unos electrodos activados en cada extremo del gel proveen la fuerza conductora. La separación de grandes moléculas depende de dos fuerzas principales: la carga y la masa. Cuando una muestra biológica (proteínas o DNA) disuelta en un buffer se carga en un gel, estas dos fuerzas actúan en forma simultánea, la corriente eléctrica de un electrodo repele a las moléculas, mientras que son atraídas por el otro electrodo. La fricción que el gel ejerce sobre la muestra actúa como un cedazo que separa a las moléculas de acuerdo a su tamaño. Las moléculas son forzadas a moverse a través de las porosidades y la tasa de migración de éstas dependerá de la fuerza del campo, tamaño y forma de las moléculas, la hidrofobicidad relativa de las muestras y la fuerza iónica y temperatura del buffer en el cual las moléculas se mueven.

Con la aplicación de métodos de tinción, las macromoléculas que han sido separadas pueden ser observadas en forma de una serie de bandas que se distribuyen a lo largo del gel.<sup>1</sup>

Algunas moléculas biológicas importantes tales como aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables y por lo tanto, a determinado pH existen en solución como especies cargadas: cationes o aniones. Dependiendo de la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el ánodo (+) o el cátodo (-).<sup>47</sup>

El método estándar utilizado para la separación, identificación y purificación de fragmentos de DNA es la electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida. Esta técnica es sencilla, rápida y capaz de resolver fragmentos de DNA que no pueden separarse de forma adecuada por otros

procedimientos, tales como la centrifugación por gradiente de densidad. Además, la ubicación del DNA en el gel puede ser determinada directamente por tinción con concentraciones bajas de bromuro de etidio.

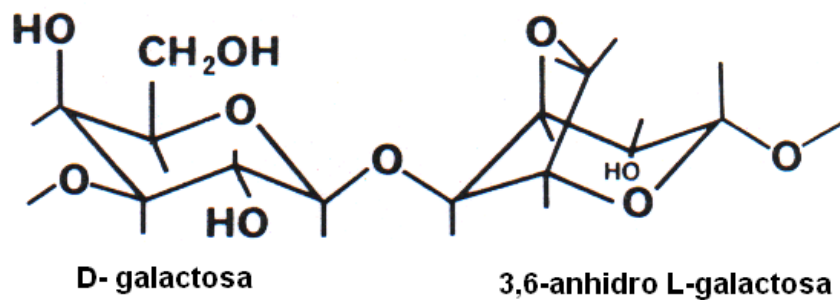
El bromuro de etidio (EtBr) es un colorante aromático fluorescente que se intercala en la doble hélice del DNA. Aquellas bandas que contienen al menos 20pg de DNA, pueden ser detectadas por observación directa del gel en luz UV a la cual el EtBr emite una luz roja-anaranjada que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una doble cadena de DNA. Debido a que este colorante se intercala en el DNA, tiene un poderoso efecto mutágeno que puede ser cancerígeno o teratógeno<sup>1</sup>. Por esta razón se han desarrollado nuevos colorantes como SYBR Green o SYBR Safe que mejoran la tinción y son menos carcinogénicos, aunque éstos son suspendidos en DMSO, el cual puede pasar rápidamente a través de la piel.

Los geles de agarosa y poliacrilamida se pueden preparar en varios tamaños, formas y porosidades y además se pueden correr en configuraciones distintas. La selección adecuada de estos parámetros está en principal relación con el tamaño de los fragmentos que se esperan separar. Los geles de poliacrilamida se corren en configuración vertical en un campo eléctrico constante y han mostrado ser más efectivos para separar fragmentos de DNA pequeños (5-500bp), su poder de resolución es bastante alto y pueden separarse entre sí fragmentos de DNA cuyo tamaño difiere en 1bp, sin embargo tienen la desventaja de ser más difíciles de preparar y manejar que los geles de agarosa.<sup>33</sup>



### 1.8.1- Electroforesis en gel de agarosa

La agarosa, extraída de algas marinas es un polímero lineal cuya estructura básica la comprenden unidades repetitivas de agarobiosa que a su vez está formada por la combinación de unidades de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa.



**Figura 1.9:** Estructura química del polímero de agarosa (Sambrook & Russell, 2001)

Los geles de agarosa tienen un poder de resolución inferior a los geles de poliacrilamida ya que dan lugar a un tamaño de poro mayor, sin embargo poseen un rango de separación amplio. DNAs de entre 50bp a 20Kb de longitud pueden separarse en geles de agarosa de varias concentraciones. Por lo general, los geles de agarosa se corren en configuración horizontal bajo un campo eléctrico de fuerza y dirección constantes. DNAs de mayor tamaño (> 10 000Kb de longitud), pueden ser separados por electroforesis de campo pulsado, en el cual la dirección del flujo eléctrico es cambiado periódicamente.<sup>1</sup>

Los aparatos utilizados para correr los geles de agarosa existen en varios tamaños y diseños, la elección entre las distintas variantes es principalmente un asunto de preferencia personal y necesidades. La configuración más

utilizada es la horizontal, que fue desarrollada por Walter Schaffner y cuyas ventajas sobre la configuración vertical son las siguientes:

- Pueden utilizarse bajas concentraciones de agarosa ya que todo el gel se sostiene sobre el tanque.
- Los geles pueden ser de una gran variedad de tamaños.
- El manejo del gel y carga de las muestras son tareas más sencillas.
- Los aparatos son durables y no muy costosos.

Los moldes para los geles son por lo general de plástico y pueden ser colocados en el interior del tanque de electroforesis. La electroforesis se lleva a cabo con el gel sumergido en el buffer. La resistencia al paso de la corriente suele ser la misma en el gel que en el buffer con lo que se garantiza que una fracción considerable de la corriente pasa a través del gel.

Para la selección de un tanque de electroforesis adecuado, se deben tomar las siguientes consideraciones:

- Debe facilitar la observación del gel en luz UV durante la corrida, es decir que incluya un molde en el cual se prepara el gel, y que el mismo sea fácil de desmontar del tanque en cualquier momento de la corrida para ser observado en un transiluminador de luz UV.
- Debe incluir variedad de peines que ayuden a generar distinto tamaño y número de pocillos (al menos 16 pocillos por fila) lo cual hace posible que se analicen simultáneamente varias muestras de DNA.
- También debe incluir una tapa con las conexiones eléctricas y que mantenga sellado el tanque mientras el sistema se encuentra en funcionamiento. Es importante también que facilite el reemplazo de electrodos rotos o corroídos.

- Debe contar con las facilidades para desechar el buffer completa y rápidamente. No es correcto desechar el buffer directamente a la cañería ya que este contiene EtBr.
- El diseño del tanque debe permitir la circulación del buffer entre las cámaras aniónica y catiónica.

Cuando un campo eléctrico es aplicado a lo largo del gel mediante una fuente de poder conectada al tanque, el DNA que se encuentra cargado negativamente a un pH neutro debido a la presencia de grupos fosfato, migra hacia el ánodo.<sup>29</sup>

### **1.8.2- Parámetros que determinan la tasa de migración**

#### **1.8.2.1- Tamaño del DNA**

Las moléculas de un DNA bicatenario lineal migran a través de la matriz del gel a una tasa inversamente proporcional al  $\log_{10}$  del número de pares de bases<sup>17</sup>. Moléculas más grandes migran más lentamente porque existe mayor fricción y porque se enrollan en sí mismas a través de los poros del gel; la velocidad también será proporcional a la fuerza del campo eléctrico aplicado, mientras el tamaño del DNA no exceda el valor máximo determinado por la concentración del gel.<sup>17</sup>

#### **1.8.2.2- Concentración de agarosa**

Un fragmento lineal de DNA de determinada longitud migra a una tasa que depende de las concentraciones de agarosa. Existe una relación lineal

entre el  $\log_{10}$  de la movilidad electroforética del DNA ( $\mu$ ) y la concentración del gel ( $\tau$ ), descrita por la ecuación:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \tau \quad (\text{Sambrook \& Russell, 2001})$$

donde  $\mu_0$  es la movilidad electroforética libre del DNA y  $K_r$  es el coeficiente de retardo, una constante que está relacionada con las propiedades del gel y con el tamaño y forma de las moléculas. Utilizando geles de distintas concentraciones, es posible resolver un amplio rango de moléculas de DNA.<sup>34</sup>

Agarosa (% p/v)	Rango separación (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

**Tabla 1.3:** Rango de separación en geles conteniendo distintas concentraciones de agarosa (Tomado de: Sambrook, 1989; Sambrook & Russell, 2001).

### 1.8.2.3- Composición nucleotídica y temperatura

Contrario a los geles de poliacrilamida, el comportamiento del DNA en los geles de agarosa no se ve afectado en forma significativa por la composición del DNA ni por la temperatura a la que se corre el gel la cual es en general la temperatura del ambiente. Las movilidades relativas de los fragmentos de DNA de tamaños distintos no cambian entre 4 y 30°C.<sup>1</sup>

#### 1.8.2.4- Presencia de colorantes

El EtBr reduce la movilidad electroforética del DNA lineal en cerca del 15% debido a que se intercala entre las bases apareadas, aumentando la longitud del DNA lineal y circular relajado, haciéndolos más rígidos.

#### 1.8.2.5- Composición del buffer de electroforesis

La fuerza iónica y la composición del buffer afectan en cierta medida la movilidad del DNA. Para tener una idea de la magnitud del efecto producido por la ausencia de iones se puede tomar como ejemplo el caso de que el buffer sea omitido del gel por error, la conductancia eléctrica es mínima haciendo que el DNA migre muy lentamente. Por otro lado, cuando la fuerza iónica del buffer es alta, en el caso de que por error se utilice un buffer 10x por ejemplo, la conductancia eléctrica es muy eficiente y genera mucho calor, en el peor de los casos, el gel se funde y el DNA se desnaturaliza.<sup>34</sup>

Existen varias opciones de buffers para electroforesis, la elección dependerá de las condiciones de trabajo, las muestras que se utilicen y el enfoque del estudio.

Los buffers de electroforesis suelen prepararse soluciones concentradas y se almacenan a temperatura ambiente.

Buffer	Concentración final	Solución stock
TAE	1x Tris-acetato 40mM EDTA 1mM	50x Tris base 242g Ácido acético glacial 57.1ml
TPE	1x Tris-fosfato 90mM EDTA 2mM	10x Tris base 108g Ácido fosfórico (85%, 1.679g/ml) 15.5ml EDTA 0.5M (pH 8.0) 40ml
TBE	0.5x Tris-borato 45mM EDTA 1mM	5x Tris base 54g Ácido bórico 27.5g EDTA 0.5M (pH 8.0) 20ml

**Tabla 1.4:** Buffers utilizados en electroforesis (Sambrook & Russell, 2001).

El buffer que se utiliza tradicionalmente es TAE, aunque su capacidad amortiguadora es más bien baja y tiende a desgastarse en electroforesis prolongadas (el ánodo se vuelve alcalino y el cátodo ácido), por lo cual es recomendable que exista recirculación del buffer entre los reservorios de la cámara cuando el corrimiento se realice a corriente alta y durante un largo periodo de tiempo.

Los buffer TPE y TBE son algo más caros que TAE lo cual se justifica por su capacidad amortiguadora superior. Los fragmentos de DNA lineal de doble cadena migran casi 10% más rápido en buffer TAE que en TBE o TPE, pero el poder de resolución de estos sistemas es casi idéntico, excepto cuando el DNA es del tipo superenrollado cuando la resolución es mejor en TAE que en TBE.<sup>34</sup>

Existen además “buffers de carga” compuestos generalmente de azul de bromofenol, que se mezclan en pequeñas cantidades con las muestras y cuya función principal es la de sumar densidad a la muestra y darle color, lo cual será de ayuda para observar el recorrido de éstas a lo largo del gel.

#### 1.8.2.6- Voltaje

A medida que el voltaje aplicado se incrementa, mayor es la velocidad de migración del DNA, pero se debe tener cuidado de que el voltaje no exceda los 20V/cm de gel (distancia entre los dos electrodos no la longitud de éste) manteniendo una temperatura de ~30°C

#### **1.8.3- Visualización de geles**

Los colorantes del marcador de peso molecular y el buffer de carga actúan como un “frente” que corre más rápidamente que el mismo DNA. Cuando este frente ha recorrido alrededor de 2/3 de la longitud del gel de agarosa se detiene la corriente y el gel es retirado de la cámara de electroforesis para ser llevado a un transiluminador donde una lámpara de luz UV ilumina el gel y permite observar las bandas de DNA. Es importante protegerse de la radiación UV utilizando gafas de seguridad.

Existen ciertos modelos de transiluminadores con cámaras fotográficas incluidas que permiten fotografiar los geles y almacenar las fotografías en discos de 3 ½ pulgadas para luego poder editarlas en un ordenador; incluso existen algunas más modernas que se conectan directamente al ordenador para su edición con software especiales.

## 1.9- Medidas de Bioseguridad

Para la aplicación rutinaria en el laboratorio de un sistema de diagnóstico de TB o cualquier otra enfermedad infecciosa, es siempre de enorme importancia trabajar bajo determinados parámetros de bioseguridad que garanticen al personal de laboratorio, estar libres de adquirir una infección debida al contacto continuo con los agentes patógenos.

Las medidas de Bioseguridad son un conjunto de prácticas que deben realizarse en forma rutinaria. La principal medida es mantener el orden y cuidado al momento de llevar a cabo cada técnica<sup>3</sup> en especial durante el manejo y procesamiento de las muestras clínicas.

La incidencia de TB en el personal de los laboratorios que manejan *M. tuberculosis* es tres veces mayor que en los laboratoristas que no trabajan con este agente. Las infecciones tanto por *M. tuberculosis* como por *M. bovis* son un riesgo comprobado para el personal de laboratorio. Los bacilos pueden estar presentes en el esputo, lavado gástrico, orina, líquido cerebroespinal y en gran variedad de tejidos lesionados.<sup>3</sup>

Existe riesgo de infección en el personal que maneja muestras para el diagnóstico de TB. La principal vía de infección es la respiratoria, por lo que resulta importante evitar la inhalación de aerosoles (en especial gotitas de 3 a 5mm de diámetro) que se producen durante la manipulación de líquidos contaminados y llegan de manera fácil hasta los alvéolos pulmonares. Debido a la dosis infectante muy baja de *M. tuberculosis* para humanos (DI50% <10 bacilos), todas las muestras y cultivos aislados deben considerarse como



potencialmente infecciosos y manejarse con todas las medidas de seguridad necesarias.

### **1.9.1- Personal**

Todo el personal que se encuentra en contacto directo con las muestras como quienes comparten el área física en forma constante o eventual (personal de limpieza, administrativo y de transporte de muestras), debe ser tuberculino (PPD) positivo. Antes de que el personal se incorpore al laboratorio, debe someterse a exámenes médicos, una radiografía de tórax y una prueba con PPD, si la dermorreacción resulta negativa debe vacunarse con BCG y se verifica la positividad.

Es importante también que el personal reciba un entrenamiento técnico que indique las medidas a tomar en el caso de presentarse algún evento y que anualmente se realicen controles radiográficos de tórax.

El laboratorista debe siempre:

- Usar bata larga, de mangas largas y que se cierre por la espalda preferentemente. La bata debe ser de uso personal y quedar en el laboratorio; antes de lavarse debe ser esterilizada en autoclave o hervida.
- Usar mascarilla.
- Procesar las muestras dentro de una cámara de flujo laminar.
- Desinfectar frecuentemente sus manos lavándolas con agua jabón y cepillo.
- Usar pipetas automáticas y puntas con filtro.

### **1.9.2- Área de trabajo**

El laboratorio debe ser un lugar amplio, con ventilación e iluminación adecuadas. El área asignada para la manipulación de las muestras debe ser ubicada lejos de la entrada del laboratorio o lugares donde se produzcan corrientes de aire y debe evitarse la entrada de personas ajenas. Durante la fase de aislamiento de DNA, el tránsito de personas que trabajan en el área debe ser limitado a lo estrictamente necesario.

El área debe contar sólo con los equipos y elementos necesarios que no serán trasladados a otras áreas. Los pisos y paredes deben tener superficies lisas que faciliten su limpieza diaria que debe realizarse con detergente al final de la jornada; el piso no debe barrerse en seco ni encerarse.

El laboratorista es el encargado de desinfectar el área contaminada antes y después de cada sesión de trabajo con hipoclorito de sodio al 5% dejando actuar el desinfectante al menos 30 minutos y encendiendo la luz ultravioleta de la cabina de bioseguridad por al menos 15 minutos, de igual manera se procederá en caso de que se produzca el derrame de una muestra, en cuyo caso se cubrirá con papel absorbente embebido en desinfectante.

Debe aclararse que el empleo de lámparas ultravioleta es una medida de desinfección complementaria orientada a reducir el número de microorganismos en el aire y en las superficies. La efectividad de éstas se ve afectada, sin embargo, por la acumulación de polvo por lo que se recomienda limpiarlas semanalmente con algodón bañado en alcohol. La luz UV debe encenderse cuando las cabinas no se estén operando ya que los rayos UV son nocivos y por otro lado deterioran el látex, caucho y plásticos.

Es de estricta prohibición el fumar, comer, beber, peinarse o aplicarse cosméticos dentro del laboratorio.

### **1.9.3- Cabinas de bioseguridad**

Son parte importante del equipamiento de un laboratorio de diagnóstico de TB. Se utilizan para llevar a cabo operaciones de alto riesgo para la muestra, el operador y el ambiente<sup>3</sup>. Estas situaciones de riesgo son:

- Trasvasar suspensiones celulares con la pipeta.
- Centrifugar líquidos que puedan contener bacilos.
- Decantar el líquido sobrenadante después de la centrifugación.
- Destapar tubos después de centrifugar o agitar.
- Agitar tubos que contengan líquidos que puedan contener bacilos.

Las cabinas de bioseguridad (CBS) usan filtros HEPA (high efficiency particulate air) en los sistemas de descarga y/o suministro de aire. Los filtros HEPA retienen con una eficiencia del 99.97%, partículas mayores o iguales a 0.3µm incluyendo todas las bacterias, virus y esporas.<sup>46</sup>

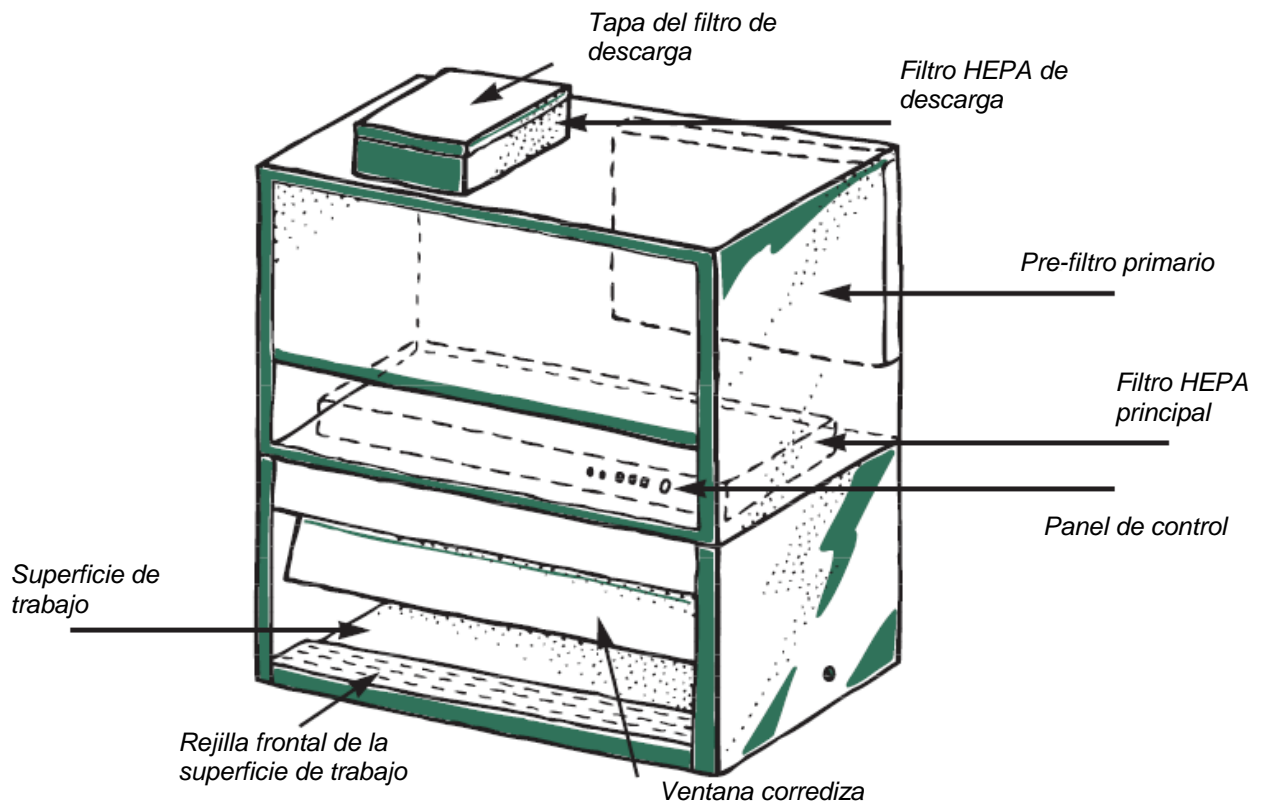
Los riesgos microbiológicos son clasificados en niveles de bioseguridad que van de I a IV; *M. tuberculosis* está clasificado bajo el Grupo de Riesgo III el cual incluye además microorganismos que se encuentran asociados a infecciones adquiridas por vía aérea. Las medidas de precaución se orientan a minimizar la producción y emisión de aerosoles y partículas suspendidas para evitar que sean accidentalmente inhaladas ingeridas o inoculadas por el laboratorista.<sup>46</sup>

Existen tres clases de CBS I, II y III, de las cuales las Clases I y II son las recomendadas para el manejo de especímenes que pueden contener micobacterias.

La CBS Clase I garantiza protección para el personal y el ambiente más no para la muestra. El aire sin filtrar de la habitación es llevado a través de la superficie de trabajo, la protección al personal se logra mediante este flujo de aire hacia el interior con una velocidad mínima de 22.8m/min que se mantiene a través de la abertura frontal. Cualquier microorganismo que se encuentre en el aire es entonces llevado hacia el filtro HEPA. El sistema de descarga proporciona la presión negativa necesaria para que el aire de la habitación sea arrastrado al interior de la cabina<sup>46</sup>. Los filtros deben ser reemplazados cuando el flujo de aire que registre sea menor al límite recomendado.

Las CBS Clase II (Figura 1.10) brindan protección al personal, la muestra y el ambiente. El flujo de aire es arrastrado alrededor del operador hacia el interior de la rejilla de la cabina proporcionándole protección a éste, además, el flujo laminar vertical del aire purificado por el filtro HEPA protege a la muestra minimizando la posibilidad de contaminación cruzada sobre toda la superficie de trabajo. El aire de la cabina es descargado a la habitación por medio de un filtro HEPA de descarga (CBS Tipo A) o puede también conducirse fuera del edificio (CBS Tipo B).<sup>46</sup>

La mejor ubicación para la CBS es lejos de la entrada al laboratorio, apartada de lugares de circulación ya que si las personas transitan frente a la cabina, la frágil cortina de aire puede alterarse. Ventanas abiertas o equipos que causen movimiento de aire no deben estar cerca de la cabina.



**Figura 1.10:** Cabina de bioseguridad Clase II, Tipo A y sus partes principales. (Tomado de: Laboratory services in tuberculosis control, WHO, 1998)

## CAPÍTULO II. MÉTODOS Y TÉCNICAS

### 2.1- Aislamiento de DNA

La conformación de la pared celular de *M. tuberculosis* merece importante atención al momento de diseñar un protocolo de aislamiento de su DNA para lograr un máximo rendimiento y además evitar que alguno de los elementos presentes inhiba la PCR (polisacáridos, hemoglobina).

#### 2.1.1- Procedencia de las muestras

El DNA utilizado para los distintos ensayos, fue extraído de cepas aisladas de *Mycobacterium tuberculosis* provistas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Carlos Andrade Marín de la ciudad de Quito.

#### 2.1.2- Métodos de aislamiento

##### 2.1.2.1- Lisis por calor

Consistió en incubar suspensiones de *M. tuberculosis* en buffer TE pH 8.0 a 96°C durante 10min en un termobloque DAIGGER con el fin de lisar las células. La recuperación del material genético se realizó mediante centrifugación a 10.000rpm durante 10min en una microcentrífuga MiniSpin Plus de Eppendorf. Los detritos celulares precipitan mientras que el DNA se encuentra disuelto en el buffer.

El DNA así obtenido no se encuentra puro, sino en una mezcla de proteínas y otras moléculas lo cual no es relevante ya que la PCR no necesita de un DNA de alta pureza.

#### 2.1.2.2- Aislamiento con kit

Fue utilizado el kit de extracción en columnas QIAamp de Qiagen, siguiendo el protocolo para sangre y fluidos corporales incrementando el tiempo de incubación con proteinasa K para ayudar a la lisis completa de la pared celular del bacilo.

Paralelamente se adicionó al protocolo un paso de incubación con lisozima (20mg/ml) para comprobar si existe mayor rendimiento en la extracción.

#### 2.1.2.3- Aislamiento manual

Se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Cooper (1993) a partir de cultivo y de suspensiones celulares, se introdujo también un paso de incubación con enzimas líticas para obtener un mayor rendimiento (Anexo 3).

Las suspensiones celulares fueron preparadas tomando dos asadas de colonias y suspendiéndolas en 1ml de suero fisiológico estéril para luego almacenarlas a -20°C donde pueden permanecer por varios meses sin sufrir degradación y además, ayuda a reducir los riesgos de contaminación a los que se está expuesto cuando se manipulan cultivos cada vez que se va a realizar una extracción.

## 2.2- Diseño y optimización de la PCR

### 2.2.1- Primers

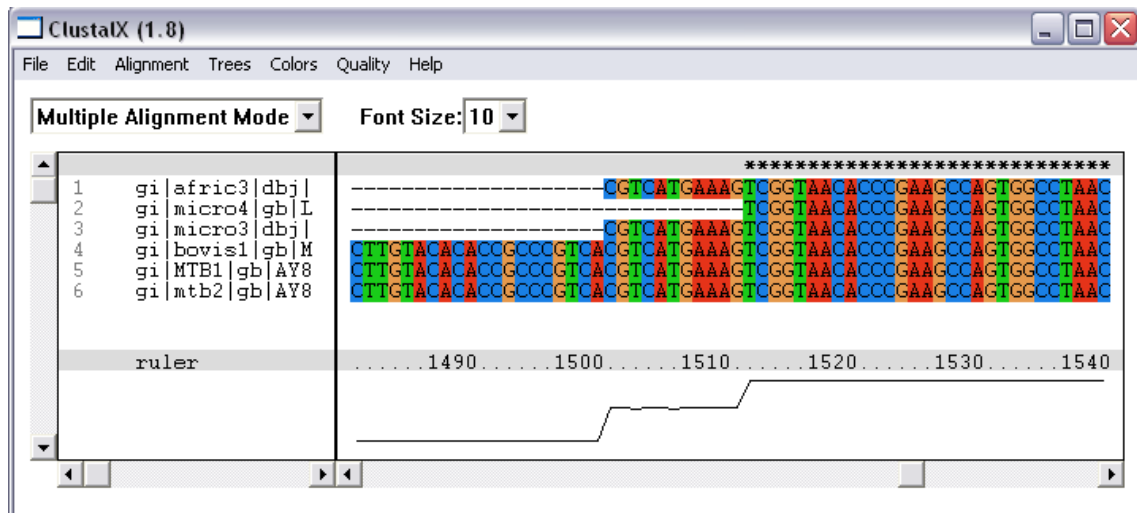
#### 2.2.1.1- Análisis de homología

El análisis de secuencias por homología es el primer paso a seguir para el diseño de los primers. Consiste en la búsqueda en bases de datos de las secuencias pertenecientes al gen específico que se desea amplificar, las bases de datos más completas que se encuentran en la red son las del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El gen, además de específico, puede contener varias copias dentro del genoma aunque no es indispensable. Para *M. tuberculosis* los blancos más comunes para el diseño de primers son la secuencia de inserción IS6110<sup>22a</sup>, el gen 16S rRNA o el gen hsp65<sup>16a</sup>.

Cuando se obtienen estas secuencias, se las lleva a un procesador de texto sin formato, como el bloc de notas, para ordenarlas y cargarlas a un programa de alineamiento. Clustal X es un programa de alineamiento múltiple que brinda un ambiente integrado para llevar a cabo alineamientos múltiples de secuencias y análisis de resultados. El alineamiento de secuencias es presentado en la pantalla (Figura 2.1) con colores para cada base lo que permite visualizar de mejor manera las zonas altamente conservadas y los nombres de las secuencias pueden verse al lado izquierdo de la ventana. Debajo de las secuencias se presenta una regla que inicia en 1 para la posición del primer residuo.





**Figura 2.1:** Vista de los resultados de un alineamiento de secuencias del gen 16S rRNA para *Mycobacterium tuberculosis* complex con programa ClustalX

La línea bajo la regla es usada para marcar las posiciones con la homología más fuerte. Los caracteres “\*” indican las posiciones con un residuo conservado.

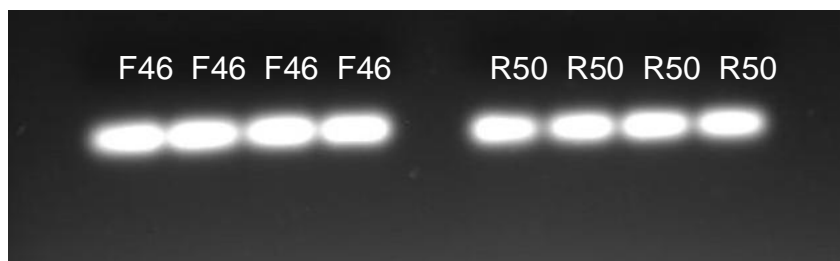
### 2.2.1.2- Diseño de los primers

Después de correr el alineamiento, se examina a lo largo de las secuencias para determinar cual es la región más conservada, la misma no debe tener una longitud inferior a 200bp y se seleccionan las secuencias flanqueantes con una longitud máxima de 22bp a fin de obtener primers con alta especificidad.

Con las secuencias de los primers *forward* y *reverse* bien definidas se procede a calcular la  $T_m$  y pueden ya ser enviadas para ser sintetizadas.

Los óligos sintetizados son entonces diluidos a una concentración final de 100pmoles/ $\mu$ l y almacenados para su posterior uso a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para controlar la correcta dilución, se carga 5 $\mu$ l de cada una de las alícuotas en un gel de

agarosa 0.7% y se lo corre a 120v durante 30min; las bandas uniformes y de similar intensidad indican en forma cualitativa que las concentraciones de los primers y las alícuotas son similares. (Figura 2.2)



**Figura 2.2:** Electroforesis en gel de agarosa de primers forward (F46) y reverse (R50) diluidos.

## 2.2.2- Parámetros de optimización

### 2.2.2.1- Temperatura de annealing

Una vez calculadas las  $T_m$  de los primers forward y reverse, se toma la  $T_m$  más baja del par y se le resta 5 o 6°C, dando como resultado la temperatura de partida para la optimización. Con un aumento de 2°C en cada ensayo hasta alcanzar una  $T_a$  2°C inferior a la  $T_m$  más alta, se realizan distintas PCRs y los productos se corren en un gel de agarosa al 2% durante 40min y a 120v para observar los resultados, la temperatura que logra una mejor amplificación es la  $T_a$  óptima que debe validarse con al menos tres ensayos similares. Resulta conveniente que las  $T_m$  de cada óligo sean lo más cercanas posible para que durante la reacción tengan la misma eficiencia de hibridación.

### 2.2.2.2- Concentración de cloruro de magnesio

La optimización puede lograrse comparando el producto obtenido de una serie de PCRs conteniendo concentraciones de  $MgCl_2$  de entre 1.5mM a

2.5mM con incrementos de 0.5mM, cuidando que las preparaciones del DNA templado no contengan cantidades significativas de agentes quelantes como EDTA o aniones como  $\text{PO}_4^{3-}$ , los cuales pueden secuestrar los iones  $\text{Mg}^{2+}$ .

De igual manera los resultados se aseguran con unas tres repeticiones del ensayo.

#### 2.2.2.3- Número de ciclos

El número ciclos como punto de referencia para la optimización es 30, el más utilizado en PCRs de rutina cuando se utiliza *Taq* polimerasa.<sup>34</sup>

Se pueden entonces realizar distintos ensayos partiendo de 25 hasta los 45 ciclos con incrementos de 5 ciclos en cada uno. Los productos de amplificación se corren en un mismo gel de agarosa al 2% y con las mismas condiciones indicadas anteriormente.

### 2.2.3- **Pruebas de sensibilidad y especificidad**

Una vez optimizados todos los parámetros necesarios, es importante establecer la sensibilidad y especificidad de todo el sistema.

#### 2.2.3.1- Sensibilidad

Consiste en determinar la cantidad mínima de DNA micobacteriano detectable por el sistema que permite obtener productos de amplificación visibles en un gel de agarosa al 2%.

El ensayo se realiza diluyendo en forma seriada (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, etc.) y cuantificando DNA aislado de una suspensión celular de bacilos para luego correr una PCR con cada dilución de DNA. Finalmente, observando el gel de

agarosa, se determina hasta que dilución del DNA hubo amplificación, se determina la concentración de DNA correspondiente y ese es el límite de detección del sistema.

Para determinar una disminución en la sensibilidad que puede ocurrir en la práctica al utilizar muestras clínicas, se diseñó un protocolo de extracción de DNA micobacteriano a partir de muestras clínicas artificiales.

Las muestras clínicas artificiales consisten de 1.5ml de sangre periférica inoculados con 100µl (dos asadas) de colonias bacterianas. Se combinaron pasos para aislamiento de DNA humano a partir de sangre y el protocolo de Cooper (Anexo 4). Con el DNA extraído se realizan diluciones seriadas para luego correr una PCR con cada dilución y determinar, como ya se describió anteriormente, el límite de detección.

#### 2.2.3.2- Especificidad

A fin de determinar si otras especies pueden ser detectadas por el sistema, resultando de esta manera falsos positivos, se realizó una PCR con DNA de especímenes disponibles en el laboratorio: DNA humano, *Eschericia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Otra manera de determinar la especificidad de los primers es ingresando la secuencia del amplicón con los primers en los extremos en la herramienta informática BLAST que determina los niveles de homología de la secuencia ingresada con secuencias de todos los organismos de la base de datos del NCBI.

## **2.3- Electroforesis en gel de agarosa**

### **2.3.1- Preparación del gel**

Para observar el estado e integridad del DNA genómico se prepararon geles de 0.7% de agarosa Invitrogen en buffer TAE 1X teñidos con EtBr. La electroforesis se realiza a 120v durante 2 horas para poder ser observado en el transiluminador.

Los productos de amplificación, al ser de menor tamaño necesitan de una mayor resolución, que se alcanza con un gel al 2% de agarosa preparado igualmente con buffer TAE 1X y teñido con EtBr.

Los geles de agarosa se preparan fundiendo (de preferencia en un microondas) la cantidad adecuada de agarosa disuelta en el buffer hasta obtener una solución cristalina y homogénea que luego se deja enfriar con agitación hasta unos 60°C para luego añadir el EtBr a una concentración final de 0.5µl por cada 10ml de solución del gel, es muy importante utilizar guantes.

La mezcla se vierte en el molde, se inserta el peine a unos 5-10mm del borde del gel, y se deja que endurezca a temperatura ambiente. Mientras el gel se endurece, la agarosa va formando una matriz porosa cuya densidad está determinada por la concentración de agarosa.

Cuando el gel se ha enfriado y endurecido, se remueve el peine con cuidado y se coloca el gel junto con la bandeja que sirvió de molde en el interior de la cámara cuidando que el buffer cubra la superficie del gel. Las muestras que contenían DNA genómico o amplicones se cargaron en los geles

respectivos en los pequeños pocillos dejados por el peine, combinadas con buffer de carga Blue Juice 10X de Invitrogen y se corrieron junto a un marcador de peso molecular 1Kb para DNA genómico y marcador TrackIt de 100bp de Invitrogen para productos de amplificación con los cuales se pudo determinar el tamaño aproximado de las bandas observadas.

### **2.3.2- Observación de los geles**

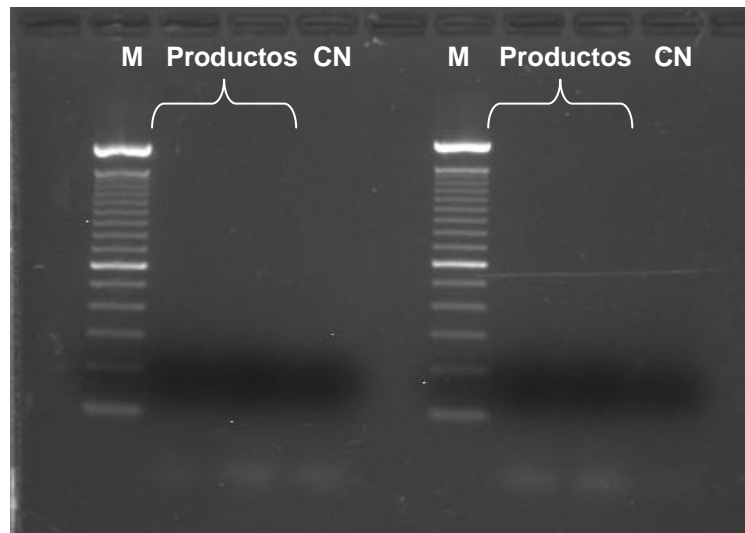
Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron retirados de las cámaras y llevados a un transiluminador de luz ultravioleta UVP BioDoc-It (Anexo 7). Utilizando una longitud de onda de 365nm se observaron y fotografiaron cada uno de los geles para la documentación de los resultados.

## CAPÍTULO III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 3.1- Aislamiento de DNA genómico

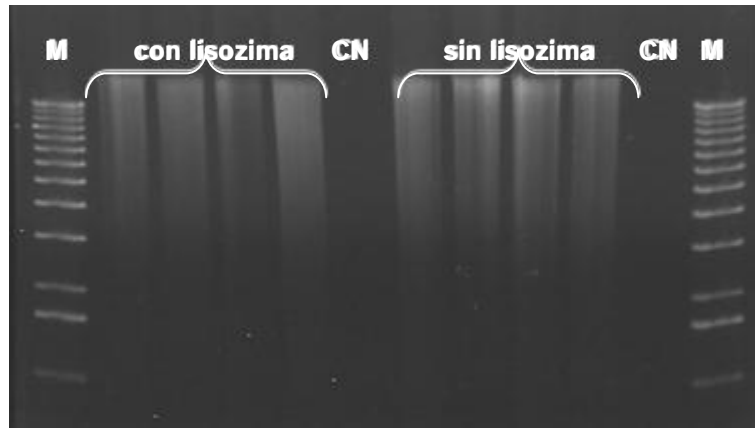
Varios métodos fueron aplicados para la extracción del DNA genómico de *M. tuberculosis* a partir de cultivo en medio sólido L-J.

Debido a que no se necesita de un DNA de excelente calidad para la PCR, se probó la extracción de DNA mediante lisis por calor, pero al ensayar la amplificación de este DNA no se obtuvieron productos. (Figura 3.1)



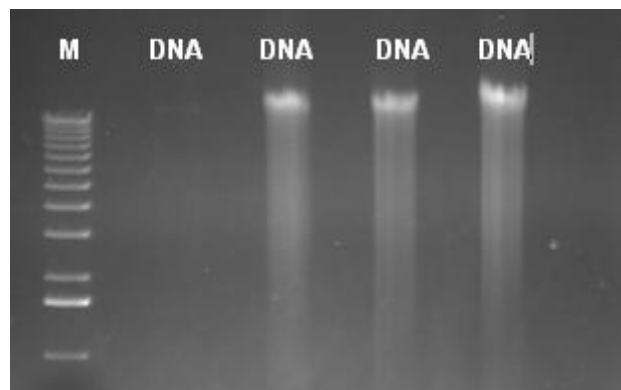
**Figura 3.1:** PCR con DNA obtenido de lisis por calor. M = marcador molecular de 100bp; CN = control negativo. No hay amplificación.

Los siguientes ensayos fueron realizados con el Kit QIAamp de Qiagen obteniéndose DNA en bajas concentraciones por lo que se adicionó al protocolo un paso de digestión con lisozima (20mg/ml). Corriendo el DNA aislado con y sin lisozima en un gel de agarosa al 0.7% (Figura 3.2), no se observó ninguna diferencia en la concentración final.



**Figura 3.2:** Ensayo de extracción de DNA con y sin lisozima, Kit QIAamp de Quiagen. M = marcador de 1kb, CN = control negativo.

En la búsqueda de un protocolo que permitiera obtener DNA genómico de *M. tuberculosis* con un rendimiento alto, se seleccionó un procedimiento de extracción manual desarrollado por Cooper (1993) (Figura 3.3), que aunque requiere de mayor tiempo, la cantidad de DNA que se obtiene y la reducción en costos que implica, lo hacen más apropiado.

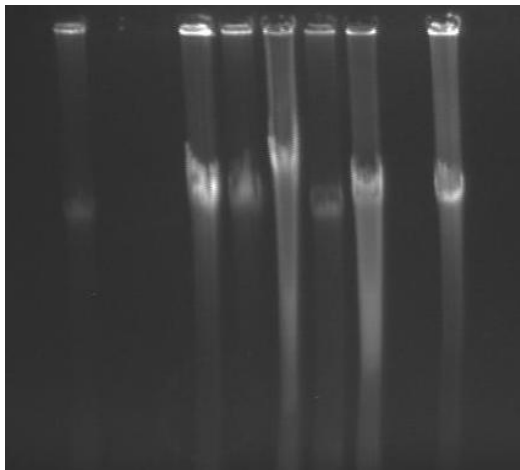


**Figura 3.3:** Extracción manual de DNA a partir de cultivo con lisozima. A diferencia de la extracción con kit, aquí pueden observarse bandas más definidas y concentradas. M = marcador de 1kb.

Para aumentar aún más el rendimiento y la pureza del DNA, se realizó una variante en el protocolo de Cooper (Anexo 3) complementando a la



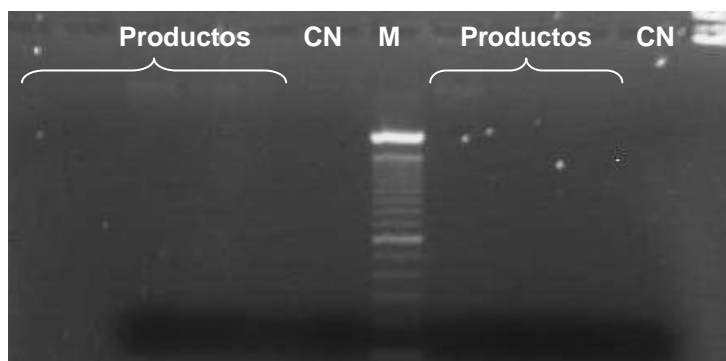
digestión un cóctel lítico (Figura 3.4), el resultado, un DNA más íntegro y concentrado extraído a partir de suspensiones celulares. Éste es el procedimiento definitivo que fue aplicado en todos los aislamientos posteriores.



**Figura 3.4:** Aislamiento de DNA con cóctel de enzimas líticas a partir de suspensiones celulares.

### 3.2- Diseño y selección de primers

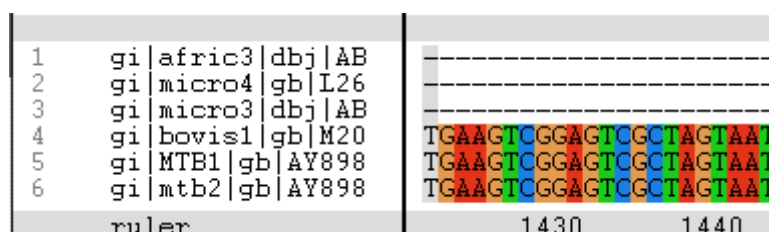
En una primera fase, se trabajó con la secuencia de inserción IS6110 sin que se obtuvieran resultados (Figuras 3.5). Los primers fueron seleccionados en base a los alineamientos realizados con el software ClustalX, de secuencias pertenecientes al gen 16S rRNA obtenidas de la base de datos del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI).



**Figura 3.5:** Resultados de ensayo de PCR con primer juego de primers diseñado a partir de la secuencia de inserción IS6110. M es el marcador de peso molecular de 100bp y CN el control negativo. No existe amplificación.

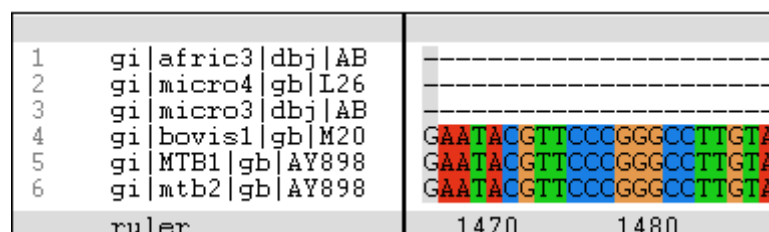
De un grupo de 25 secuencias pertenecientes a las seis especies del complejo *M. tuberculosis* analizadas, se obtuvo una región de ~ 260bp con una homología alta (100%) para el gen 16S rRNA de las dos especies principales en nuestro medio: *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

Siguiendo la recomendación de que el oligonucleótido debe tener una proporción de G+C entre 45-55%, se seleccionaron de cada extremo de la zona homóloga, grupos de regiones con contenidos de G+C y A+T similares como posibles primers forward y reverse (Figuras 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9).



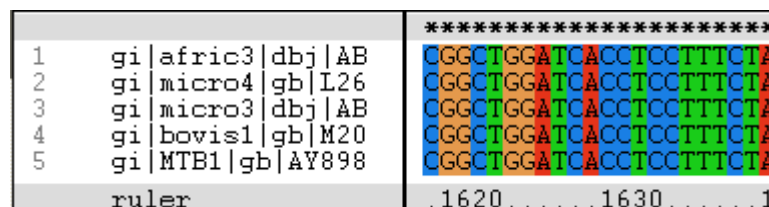
**Figura 3.6:** Región homóloga en la posición 1420(bp) candidata para primer “forward” de 22bp

(F1) perteneciente al gen 16S rRNA para *M. tuberculosis* y *M. bovis*. % (G+C) = 45.45%



**Figura 3.7:** Región homóloga en la posición 1466(bp) candidata para primer “forward” de 22bp

(F2) perteneciente al gen 16S rRNA para *M. tuberculosis* y *M. bovis*. % (G+C) = 55%



**Figura 3.8:** Región homóloga en la posición 1598(bp) candidata para primer “reverse” de 22bp

(R1) perteneciente al gen 16S rRNA para *M. tuberculosis* y *M. bovis*. % (G+C) = 54.5%

				*****	
1	gi	afric3	dbj	AB	GCTGGATCACCTCCTTTCTAAG
2	gi	micro4	gb	L26	GCTGGATCACCTCCTTTCTAAG
3	gi	micro3	dbj	AB	GCTGGATCACCTCCTTTCTAAG
4	gi	bovis1	gb	M20	GCTGGATCACCTCCTTTCTAAG
5	gi	MTB1	gb	AY898	GCTGGATCACCTCCTTTCTAAG
ruler					620.....1630.....164

**Figura 3.9:** Región homóloga en la posición 1620(bp) candidata para primer “reverse” de 22bp (R2) perteneciente al gen 16S rRNA para *M. tuberculosis* y *M. bovis*. % (G+C) = 50%

Debido a que el primer reverse tiene una hibridación antisentido con la cadena complementaria a la secuencia patrón, es necesario traducir el óligo.

Secuencia Original	Secuencia Traducida
R1: 5' CGG CTG GAT CAC CTC CTT TCT A 3'	5' T AGA AAG GAG GTG ATC CAG CCG 3'
R2: 5' GCT GGA TCA CCT CCT TTC TAA G 3'	5' C TTA GAA AGG AGG TGA TCC AGC 3'

**Tabla 3.1:** Traducción de la secuencia original de los óligos candidatos para primer reverse.

Aplicando la fórmula de Wallace, se determinó la  $T_m$  de los cuatro oligonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencia	$T_m$ (°C)
F1	5' TGA AGT CGG AGT CGC TAG TAA T 3'	64
F2	5' GAA TAC GTT CCC GGG CCT TGT A 3'	68
R1	5' TAG AAA GGA GGT GAT CCA GCC G 3'	68
R2	5' CTT AGA AAG GAG GTG ATC CAG C 3'	66

**Tabla 3.2:** Temperatura de melting de los cuatro oligonucleótidos candidatos.

Como puede verse, las  $T_m$  se encuentran dentro de un pequeño rango que abarca 4°C, lo cual resulta positivo ya que podría utilizarse cualquier combinación de primers sin que exista mayor dificultad a la hora de determinar la temperatura de annealing óptima para el par de primers, sin embargo es

importante que la longitud del amplicón sea mayor a 200bp para añadirle especificidad al sistema.

En la Tabla 3.3 se resumen las posibles combinaciones y las longitudes virtuales de los amplicones basado en las secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI.

Combinación	Longitud del amplicón (bp)
F1 y R1	216-217
F1 y R2	218-219
F2 y R1	172-173
F2 y R2	174-175

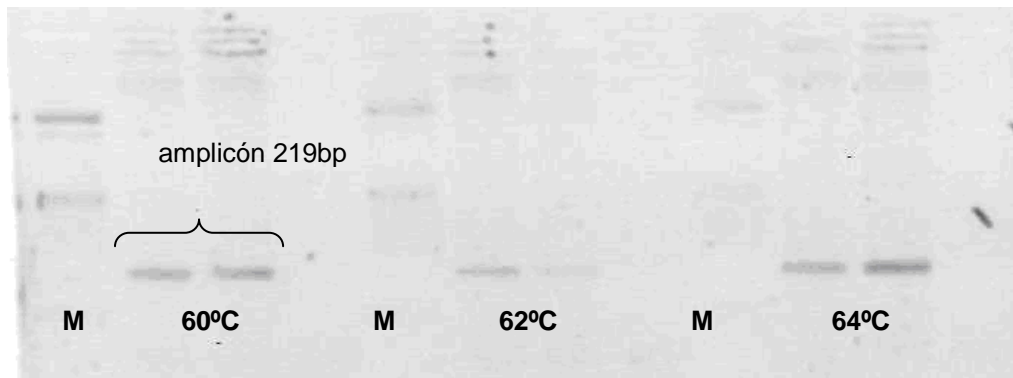
**Tabla 3.3:** Longitud de los amplicones para las distintas combinaciones de primers.

Aunque la diferencia en la longitud entre las combinaciones F1-R1 y F1-R2 no es significativa, se seleccionó esta última debido a que las  $T_m$  correspondientes a cada óligo son más cercanas, y se les dio respectivamente los nombres de TbF46 y TbR50.

### 3.3- Optimización de la PCR

#### 3.3.1- Temperatura de annealing

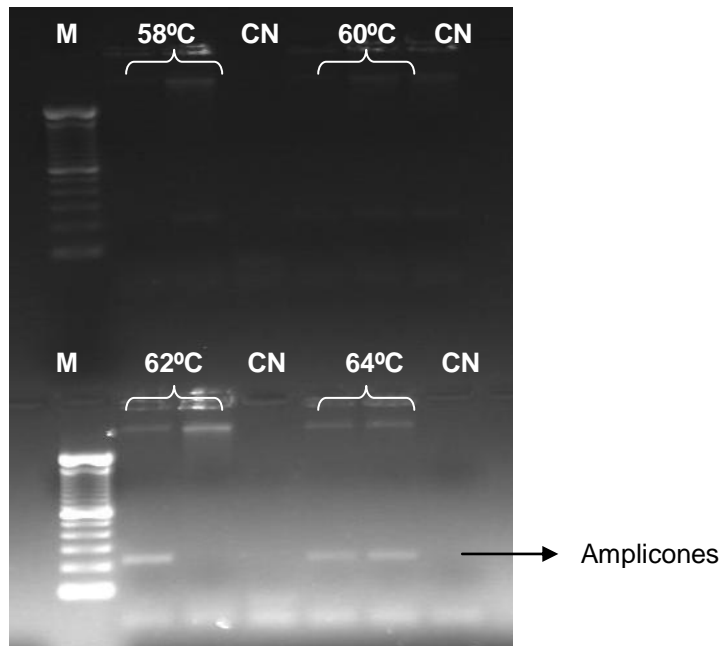
Se partió de la elección de la temperatura de annealing adecuada para el par de primers TbF46 y TbR50 cuyas  $T_m$  son 64 y 66°C respectivamente. En el primer ensayo se probaron  $T_a$  de 60, 62 y 64°C (Figura: 3.10) resultando mejores amplificaciones a 60 y 64°C lo cual es inconsistente tomando en cuenta que a 62°C la cantidad de producto obtenido debe ser intermedia entre las otras dos temperaturas.



**Figura 3.10:** PCR con primers TbF46 y TbR50. Optimización de  $T_a$ , se prueban temperaturas de 60, 62, 64°C. M = marcador 100bp.

Después de obtener estos resultados, el sistema parecía no estar funcionando por lo que se probaron amplificaciones con tres clases distintas de *Taq* polimerasa: *Taq* polymerase, Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen) y *Taq* polymerase (Roche); con el fin de descartar la posibilidad de que la polimerasa que se estuvo utilizando haya sido la causante de esta falta de resultados. Sin embargo no hubo amplificación para ninguna de las polimerasas por lo que se resolvió probar con una nueva remesa de primers.

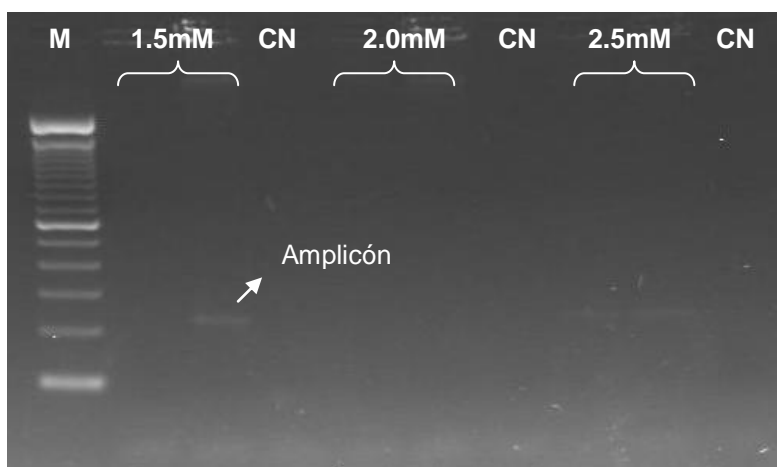
Se realizó un nuevo ensayo ampliando el rango de temperaturas: 58, 60, 62 y 64°C ya que mientras más alta es la  $T_a$  mayor es la especificidad de la hibridación. Se obtuvo un resultado positivo para las cuatro temperaturas con mejor amplificación a 62°C por lo que queda establecida como la  $T_a$  definitiva.



**Figura 3.11:** Variación de temperatura de annealing, 58, 60, 62 y 64°C. Se registra una mejor banda a 62°C

### 3.3.2- Cloruro de magnesio

A continuación, se optimizó la concentración  $MgCl_2$  ensayando concentraciones de 1.5, 2.0 y 2.5mM. El resultado fue una mejor amplificación con la concentración estándar de  $MgCl_2$  de 1.5mM (Figura 3.12) por lo que se mantiene el protocolo propuesto inicialmente mostrado en la Tabla 3.4.



**Figura 3.12:** Ensayo con concentraciones de  $MgCl_2$ : 1.5, 2, 2.5 $\mu$ l. Mejores resultados con 1.5 $\mu$ l/50 $\mu$ l de reacción. El protocolo no cambia.

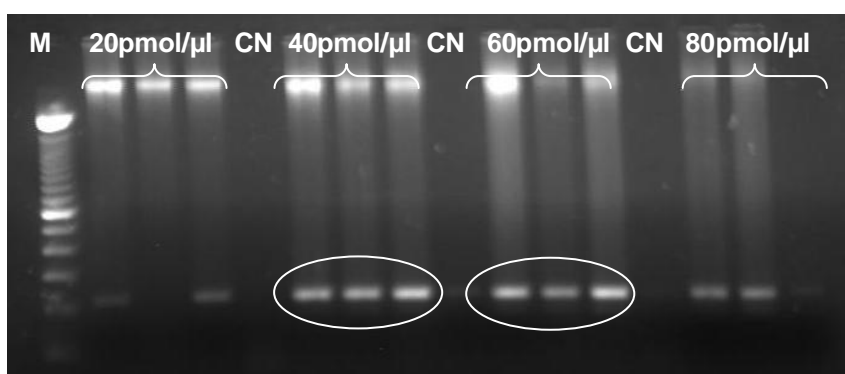
Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
Taq polimerasa	0.3
TbF46	0.18
TbR50	0.18
dNTPs	0.15
MgCl <sub>2</sub>	0.9
Buffer <i>Taq</i>	3.0
DNA	3.0
Agua grado PCR	22.29

**Tabla 3.4:** Protocolo para la PCR usando *Taq* DNA polymerase Invitrogen para un volumen de reacción de 30 $\mu$ l

### 3.3.3- Protocolo alternativo con PCR SuperMix

Como una alternativa al protocolo para PCR propuesto, se ensayó con PCR SuperMix (Invitrogen) que consiste en una mezcla de reacción que contiene Mg<sup>++</sup>, dNTPs y *Taq* polimerasa recombinante en concentraciones suficientes para permitir la amplificación y a la cual sólo se debe añadir las concentraciones adecuadas de primers y DNA ayudando así a reducir el tiempo de ensamblaje de la PCR.

Probando concentraciones de primers de: 20, 40, 60 y 80pmol/ $\mu$ l, se obtuvo una buena amplificación con 40 y 60pmol/ $\mu$ l.

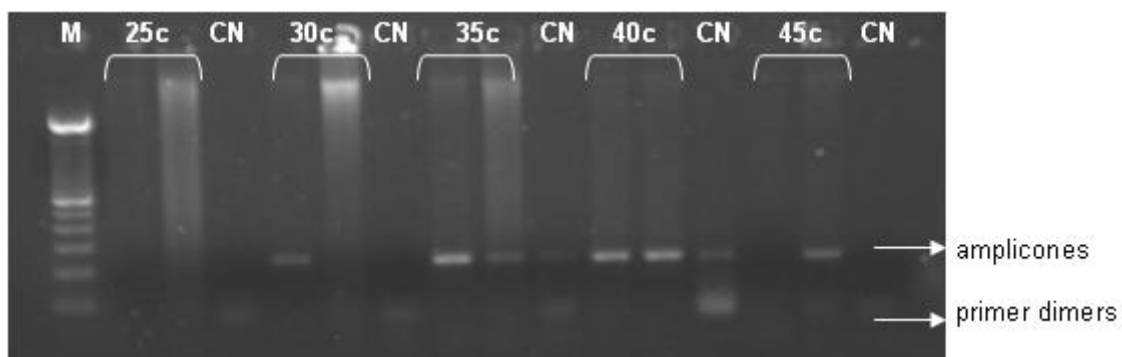


**Figura 3.13:** Optimización de la concentración de primers para el sistema PCR SuperMix (Invitrogen).

Una vez comprobado el funcionamiento del sistema bajo las condiciones establecidas, se probó con éxito la reducción del volumen de la reacción de 50µl a 30µl con el fin de utilizar menor cantidad de reactivos y reducir costos manteniendo la fidelidad de los resultados.

### 3.3.4- Número de ciclos

Como un último paso en el proceso de optimización de la PCR, se determinó el número de ciclos óptimo, que permitiera observar con la mayor nitidez las bandas del amplicón; se ensayaron con: 25, 30, 35, 40 y 45 ciclos obteniéndose una mejor resolución para 35 y 40 ciclos (Figura 3.14), seleccionándose entonces el programa con 35 ciclos que tarda aproximadamente 2.5 horas.

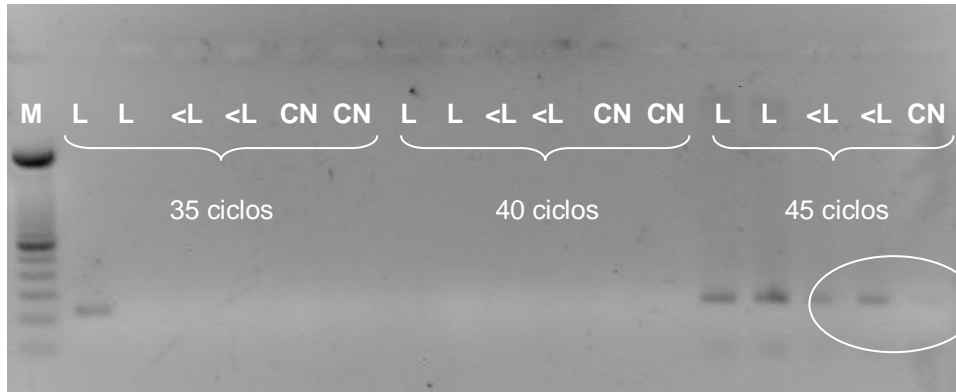


**Figura 3.14:** Optimización de ciclos.

Como puede observarse en la Figura 3.14, a partir de los 35 ciclos, los controles negativos presentan tenues bandas de amplicones indicando la introducción de contaminación en algún punto del proceso. De ahí que el uso de 35 ciclos en el programa de la PCR permite, además de obtener un mejor amplicón, detectar a tiempo la presencia de amplicones contaminantes para de esta manera tomar las medidas apropiadas.



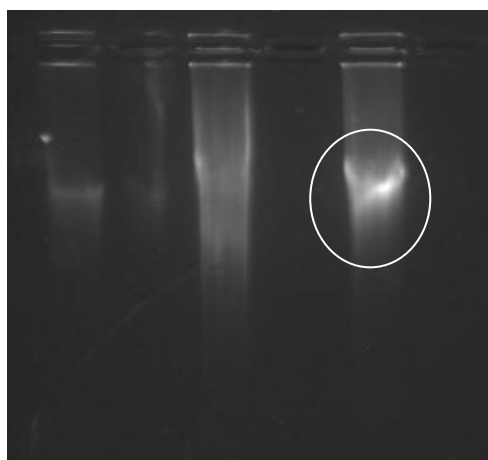
La Figura 3.15 muestra un nuevo ensayo utilizando DNA del límite de detección del sistema y una dilución menos concentrada para mostrar la presencia de amplicones contaminantes utilizando reactivos nuevos.



**Figura 3.15:** Ensayo de contaminación con variación en el número de ciclos. Se observa la presencia de contaminación a partir de los 45 ciclos con bandas en el control negativo y en el DNA bajo el límite de detección. L = límite de detección; <L = dilución inferior al límite de detección.

### 3.4- Sensibilidad

La Figura 3.16 muestra la fotografía del gel de agarosa con el DNA utilizado en la determinación de la sensibilidad del sistema.

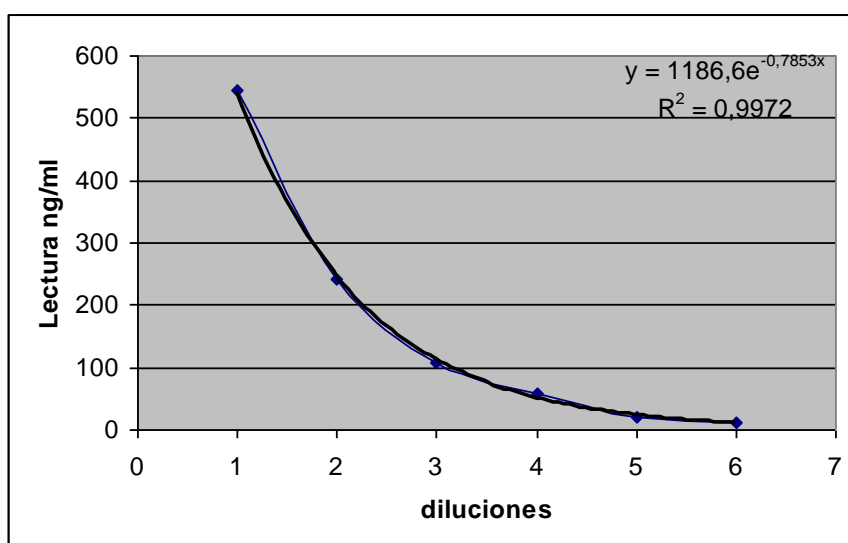


**Figura 3.16:** DNA genómico para prueba de sensibilidad. El círculo señala el DNA seleccionado para cuantificación y preparación de diluciones.

La cuantificación del DNA se realizó con el fluorómetro Qubit y el kit Quant-iT dsDNA HS Assay (Invitrogen) siguiendo el protocolo que indica el fabricante. Las diluciones 1/2 a 1/8, tenían una concentración muy alta que el sistema no pudo cuantificar. Las lecturas y concentraciones reales calculadas de las diluciones 1/6 a 1/512 se muestran en la Tabla 3.5, los datos mostrados para las diluciones 1/1024 a 1/8192 es un cálculo estimado a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva realizada para las lecturas conocidas (Figura 3.17).

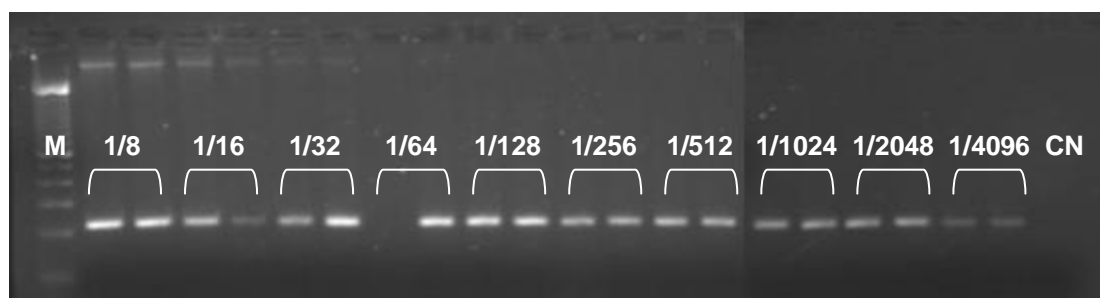
Dilución	Lectura (ng/ml)	Concentración (ng/ml)
1/16	545	54500,00
1/32	241,75	24175,00
1/64	106,8	10680,00
1/128	59,125	5912,50
1/256	21,53	2153,00
1/512	10,73	1073,00
1/1024	4,86	486,00
1/2048	2,2176	221,76
1/4096	1,0112	101,12
1/8192	0,461	46,10

**Tabla 3.5:** Lecturas del fluorómetro y concentraciones reales de cada una de las diluciones del DNA utilizado para la determinación de la sensibilidad del sistema.



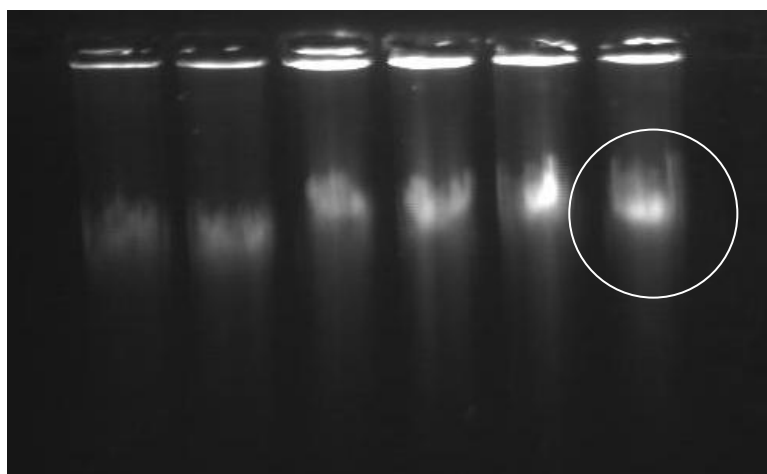
**Figura 3.17:** Línea de tendencia de las lecturas (valores dados por fluorómetro) versus las diluciones del DNA.

La PCR se realizó con las diluciones: 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048 y 1/4096 (Figura 3.18), siendo el límite de detección 1/4096 conteniendo una concentración inicial de DNA genómico de ~101.12ng/ml o su equivalente en términos de reacción 0.3ng/reacción.



**Figura 3.18:** Prueba de sensibilidad con diluciones seriadas de DNA de concentración conocida.

El protocolo diseñado para el aislamiento de DNA a partir de las muestras artificiales permitió obtener DNA de concentración e integridad adecuadas (Figura 3.19) para llevar a cabo el ensayo de sensibilidad con estas muestras.



**Figura 3.19:** DNA aislado de una mezcla de sangre humana y suspensiones de *M. tuberculosis*. El círculo señala el DNA seleccionado para preparar las diluciones.

La sensibilidad alcanzada con este procedimiento, si se comparan las Figuras 3.19 y 3.21, fue 50% inferior a la determinada a partir de cultivo, suponiendo que la concentración de DNA en cada una de ellas fue similar al cuantificado más arriba debido a que el aislamiento se realizó con la misma cantidad inicial de colonias de *M. tuberculosis*. La PCR se realizó con las diluciones: 1/8, 1/32, 1/128, 1/512, 1/1024, 1/2048 y 1/4096 siendo el límite de detección 1/2048.



**Figura 3.20:** Ensayo de sensibilidad con diluciones seriadas de DNA extraído de muestras artificiales. Encerradas en el círculo punteado se encuentran las últimas bandas de amplicón detectables.

### 3.5- Especificidad

La determinación electrónica de la especificidad de los primers TbF46 y TbR50 con ayuda de BLAST dio como resultado el más alto grado de homología (>99%) con las siguientes especies de *Mycobacterium*.

- *Mycobacterium malmoeense*
- *Mycobacterium gordonae*
- *Mycobacterium nebraskense*

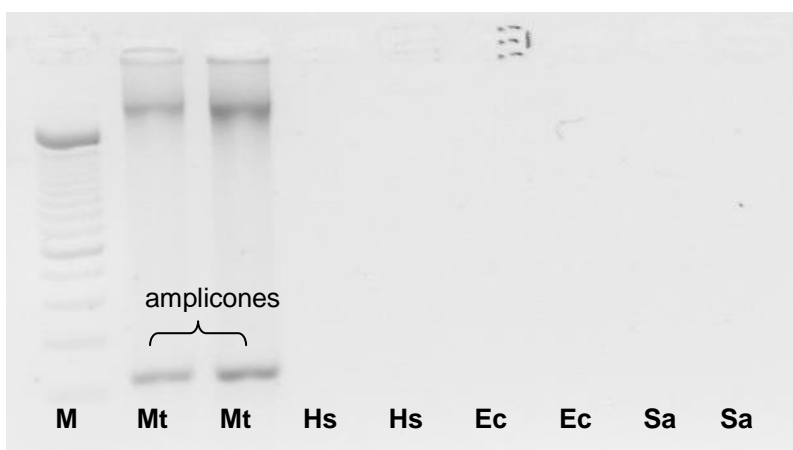
- *Mycobacterium saskatchewanense*
- *Mycobacterium coleregonium*
- *Mycobacterium palustre*
- *Mycobacterium bohemicum*
- *Mycobacterium alsiensis*
- *Mycobacterium immunogenum*
- *Mycobacterium tilburgii*
- *Mycobacterium marinum*
- *Mycobacterium scrofulaceum*
- *Mycobacterium haemophilum*
- *Mycobacterium chimaera*
- *Mycobacterium leprae*

Todas estas especies, excepto *M. leprae*, son conocidas como Micobacterias Atípicas (Anexo 5), especies no tuberculosas, saprófitas, distribuidas en el medio ambiente<sup>23</sup> especialmente en el suelo y el agua. Causantes de enfermedad pulmonar, linfadenitis (generalmente cervical), enfermedad de la piel o de tejidos blandos y enfermedad diseminada en pacientes con SIDA. Los adultos y ancianos son los más afectados y raramente los niños que suelen presentar linfadenitis cervical<sup>35a</sup>.

Sin embargo, son muy raras en nuestro medio y los casos de infección por estos organismos que han sido reportados pertenecen a Norteamérica y el norte de Europa. *M. leprae*, por otro lado es una especie cuya sintomatología no está relacionada con infecciones pulmonares.

En general, la probabilidad de obtener resultados falsos positivos es mínima.

De la prueba de especificidad realizada en el laboratorio, la amplificación ocurrió sólo con el DNA de *M. tuberculosis*.



**Figura 3.21:** Ensayo de especificidad del sistema utilizando DNA de: (Mt) *M. tuberculosis*, (Hs) *Homo sapiens sapiens*, (Ec) *E. coli* y (Sa) *S. aureus*. La amplificación ocurre sólo para *M. tuberculosis*.

### 3.6- Análisis de costos

La justificación en el desarrollo de un sistema “in house” de detección de *M. tuberculosis* cuando existe en el mercado kits con probada eficiencia y alta sensibilidad, es la diferencia en costos que representa.

En los hospitales de la ciudad de Quito donde se realizan pruebas moleculares de tuberculosis, el costo de este examen está entre \$72.00 y \$164.00. El sistema que aquí se propone tendría un costo aproximado entre \$26.00 y \$27.72 por muestra desglosado en la Tabla 3.6

<b>DETALLE</b>	<b>Taq polymerase (USD)</b>	<b>PCR SuperMix (USD)</b>	<b>Hospital 1</b>	<b>Hospital 2</b>
Polimerasa	0.4	5.54		
Marcador de peso molecular	1.68	1.68		
Agua grado PCR	0.01	-		
Buffer de carga Blue Juice 10x	0.03	0.03		
dNTPs	0.39	-		
Agarosa grado electroforesis	1.21	1.21		
Primers	0.02	0.02		
Aislamiento de DNA	10.00	10.00		
<b>Subtotal</b>	17.34	18.48		
<b>50% gastos corrientes</b>	8.67	9.24		
<b>Total</b>	<b>\$26.01</b>	<b>\$27.72</b>	<b>\$72.00</b>	<b>\$164.00</b>

**Tabla 3.6:** Análisis de costos

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES

- El sistema desarrollado permite la detección de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. bovis*, *M. tuberculosis*) de manera rápida y altamente específica. Pudiendo analizarse hasta 16 muestras en una jornada de trabajo.
- La sensibilidad del sistema es de 101.12ng/ml que equivale a 0.3ng/reacción inferior a la registrada para los sistemas de diagnóstico molecular comerciales.
- La especificidad de los primers diseñados es alta. La probabilidad de obtener falsos negativos por las secuencias homólogas pertenecientes a micobacterias atípicas es baja, debido a que éstas son especies muy raras a nivel mundial y más aún en nuestro país y además son consideradas como no patógenas que pueden causar infecciones en personas inmunocomprometidas. Sin embargo se deberá interpretar los resultados en conjunto con el cuadro clínico del paciente para obtener resultados válidos para el tratamiento y manejo.
- El mejor método de extracción de DNA fue el de Cooper complementado por la digestión con enzimas líticas debido a que se obtuvo de esta forma DNA más concentrado y de mayor pureza como pudo observarse en los geles de agarosa.
- Las condiciones óptimas para la PCR son: Temperatura de annealing de 62°C, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> y 35 ciclos de amplificación.



- Para obtener una PCR óptima es esencial un buen diseño de primers para lo cual se debe tener en cuenta parámetros tales como: el tamaño del primer, el contenido (%) en GC y la secuencia del extremo 3'. Algunos de estos parámetros pueden optimizarse fácilmente a mano pero otros es posible hacerlo con herramientas informáticas.
- Los primers seleccionados para esta técnica molecular son: TbF46 y TbR50, ambos con una longitud de 22bp y que permiten obtener un amplicón de 220bp correspondientes al gen 16S rRNA del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.
- La sensibilidad es afectada en un 50% por la utilización de DNA templado extraído de muestras artificiales lo cual podría interpretarse como los mismos valores de sensibilidad al utilizar muestras clínicas. Esto sin embargo es solo una valoración estimada ya que en la práctica la naturaleza de los especímenes clínicos varía, al igual que los protocolos para extracción de DNA micobacteriano.
- Si analizamos la relación costo/beneficio que implica la aplicación de la PCR, los costos que esta representa se justifican debido a que esta técnica evita demoras mediante un diagnóstico temprano de la enfermedad.
- La efectividad de la PCR para el diagnóstico de tuberculosis está relacionada con la experiencia y destreza del personal que lleva a cabo el ensayo.

## RECOMENDACIONES

- La PCR es una técnica que maneja múltiples factores, por lo que es preciso elaborar un esquema de optimización previo que dirija la ejecución de los distintos ensayos.
- Es recomendable que exista separación de las áreas de aislamiento, ensamblaje, PCR y electroforesis ya que éste es un factor que permite tener control sobre una posible contaminación cuyo riesgo está siempre presente. Esta contaminación puede darse tanto por los productos amplificados como por otros especímenes.
- Es pertinente usar la técnica molecular de PCR para una confirmación bacteriológica rápida de existir sospecha de TB en casos BAAR (-) de forma que el tratamiento pueda iniciarse tan pronto como sea posible.
- Se recomienda que para la aplicación de este sistema en muestras clínicas se tenga especial cuidado en la descontaminación de las mismas ya que ciertos elementos presentes como moco, células epiteliales, hemoglobina y microorganismos de la flora normal, dependiendo de la naturaleza del espécimen, podrían inhibir la acción de la *Taq* polimerasa.
- Para mejorar los valores de sensibilidad de este sistema se recomienda usar reactivos de PCR de calidad y eficiencia más altas.
- Para la conservación adecuada y a mediano plazo (algunos meses) de todos los reactivos usados para la PCR es necesario alicuotarlos y mantener la cadena de frío, almacenándolos a -20°C y colocándolos sobre hielo durante su uso. Estos reactivos incluyen: primers, *Taq* polimerasa, dNTPs, DNA templado, enzimas líticas (proteínasa K, lisozima, lisostafina, liticasa).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acquaah, G. (1992). *Practical electrophoresis for genetic research*. Portland: Dioscorides Press.
- 1a. Amr, M., Iwen, P., Tarantolo, S. y Hinrichs, S. (2004). *Mycobacterium nebraskense* sp. Nov., a novel slowly growing scotochromogenic species. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54: 2057-2060
2. Aranaz, A., Liebana, E., Mateos, A. et al. (1996). Spoligotyping of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 34: 2734-2740.
3. Balandro, S., Anzaldo, G., Peña, G. y Betancourt, X. (1996). *Manual de procedimientos de laboratorio*, 18. *Tuberculosis*. (1ª ed.). México
4. Baron, E., Peterson, L. y Finegold, S. (1994). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. (9ª ed.). St. Luis: Mosby
5. Boddingtonhaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, Bottger E C. (1990). Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol*. 28:1751–1759
6. Brooks, G., Butel, J., Morse, S. (2001) *Jawetz, Melnik & Adelberg's medical microbiology*. McGraw-Hill. (22ª ed.) USA.
7. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M. et al. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci*. 99: 3684–3689 [online.] [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.052548299](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.052548299)
- 7a. Campbell, I. A. (2003). Pulmonary disease caused by *M. malmoense* in HIV negative patients: 5-yr follow-up of patients receiving standardised treatment. *Eur Respir J*. 21:478-482

8. Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J. et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393: 537 – 544,
9. Coyne, V. E., James, M. D., Reid, S. J. y Rybicki, E. P. (2001). *Molecular biology techniques manual*. (3<sup>a</sup> ed.) [online.] [www.mcb.uct.ac.za/manual/MolBiolManual.htm](http://www.mcb.uct.ac.za/manual/MolBiolManual.htm)
10. Davis, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*. 264: 375
11. Del Campo, M. et al. (1999). *Manual de laboratorio de tuberculosis y otras micobacteriosis*. Ed. Instituto Mexicano del Seguro Social.
12. Dieffenbach, C., Dveksler, G. (2003) *PCR primer: A laboratory manual*. (2<sup>a</sup> ed.). New York: CSHL press
13. Frieden, T. R., Fujiwara, P. I, Washko, R. M. y Hamburg, M. A. (1995) Tuberculosis in New York City – turning the tide. *N Engl J Med*. 333: 229-233.
14. García, L., Valdespino, J. L., García, M. et al. (1994). Epidemiología del SIDA y la tuberculosis. *Bol Of Sanit Panamer*. 116: 546.
15. Gelfand, D. H. y White, T. J. (1990). Thermostable DNA polymerases. En: Innis, Gelfand, Sninsky and White (eds.), *PCR Protocols* (pp. 129-141). New York: Academic Press.
16. Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B. y Kuby, J. (2003). *Immunology*. (5<sup>a</sup> ed.). New York: W. H. Freeman and Company
- 16a. Güven, S., Yilmaz, E., Kutbay, H. et al. (2004). The diagnostic value of polymerase chain reaction (PCR) in bronchioalveolar lavage. *East J Med*. 9: 7-12

17. Helling, R. B., Goodman, H. M. y. Boyer, H. W. (1974). Analysis of endonuclease R - EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose gel electrophoresis. *J Virol.* 14: 1235.
18. Hoffner, S., Hjelm, U. y Kallenius, G. (1993). Susceptibility of *Mycobacterium malmoense* to antibacterial drugs and drug combinations. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 1285-1288
19. Indicadores Básicos de Salud. (2005). Ministerio de Salud Pública del Ecuador. [online.] [www.msp.gov.ec](http://www.msp.gov.ec)
20. Jones, D., Gelder, C., Ahmad, T. et al. (2001). CD1 genotyping of patients with *Mycobacterium malmoense* pulmonary disease. *Tissue Antigens.* 58: 19.
21. Krawetz, S. A., Pon, R. T. y Dixon, G. H. (1989). Increased efficiency of the *Taq* polymerase catalysed polymerase chain reaction. *Nuclc Acids Res.* 17: 819.
22. *Manual of clinical microbiology.* (4<sup>a</sup> ed.). American Society for Microbiology, Washington, D. C
- 22a. Medapa. N. (2002). What is new in the diagnosis of tuberculosis?, Part I. *ICMR Bulletin.* 32: 8
23. Mederos, L., González, D., Pérez, D., Paneque, A. y Montoro, E. (2004). Linfadenitis causada por *Mycobacterium malmoense* en paciente infectado con virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Chil Infectol.* 21: 229-231
24. Mostowy, S., Onipede, A., Gagneux, S. et al. (2004). Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol.* 42: 3594–3599
25. Mukherjee, J. et al. (2004). Programmes and principles in treatment of multidrug resistant tuberculosis. *The Lancet.* 363: 474-481

26. Newton, C. R. y Graham A. (1994). *PCR*. Scientific Publishers. Oxford
27. Okutan, O., Kartaloglu, Z., Ilvan, A., Cerrahoglu, K., Kunter, E., Aydilek, R. (2000). Polymerase chain reaction in pulmonary tuberculosis. *Eastern Journal of Medicine*. 5: 7-9
28. Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (1999). *Microbiología*. (4ª ed.). Madrid: McGraw-Hill.
29. (1994). *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. (4ª ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
30. Rattan, A. (2000). PCR for diagnosis of tuberculosis: where are we now?. *Ind J Tub*. 47: 79-82
- 30a. Reischl, U., Emler, S., Horak, Z. et al. (1998) *Mycobacterium bohemicum* sp. nov., a new slow-growing scotochromogenic mycobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 48: 1349-1355
31. Remacha, M. A., Parra, I. y Mercadé, B. (2003). Tuberculosis diseminada por *Mycobacterium africanum*. *Arch Bronconeumol*. 39: 376-377 [online.] <http://www.archbronconeumol.org/cgi-bin/wdbcgi.exe/abn/mrevista.pdf?pid=13049959>
- 31a. Richter, E., Schubert, S., Fischer, A y Kristiansen, J. E. (2005). A novel, slow growing mycobacterium species, *M. alsiensis*, causing lung infiltrates. *Sin publicar*.
32. Rychlik, W. y Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucl Acids Res* 18: 6409-6412.
33. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (2ª ed.). New York: CSHL press

34. Sambrook, J. y Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (3<sup>a</sup> ed.). New York: CSHL press
- 34a. Sánchez, T., De Groote, M. A., Graham, J. et al. (2004). Novel species of mycobacterium cross-reactive with *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic probe, isolated from a patient with pulmonary disease (*Mycobacterium coleregonium*). Nation Jew Med Res Cent. *Sin publicar*
35. Scarparo, C., Piccoli, P., Rigon, A., Ruggiero, G., Scagnelli, M., Piersimoni, C. (2000). Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol.* 38: 1559-1562
- 35a. Scheinfeld, N. (2006). Atypical mycobacterial diseases. [online.] [www.emedicine.com/derm/topic930.htm](http://www.emedicine.com/derm/topic930.htm).
36. Seng Goh, K., Legrand, E., Sola, C. y Rastogi, N. (2001). Rapid differentiation of “*Mycobacterium canettii*” from Other *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms by PCR-Restriction analysis of the hsp65 gene. *J Clin Microbiol.* 39: 3705–3708.
37. Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E. et al. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 9869–9874
38. Stead, W. W., Eisenach, K. D., Cave, M. D., Beggs, M. L., Templeton, G. L., Thoen, C. O. and Bates, J. H. (1995). When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. *Am J Respir Crit Care Med.* 151:1267–1268

39. Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades (2000). *Práctica médica efectiva: Tuberculosis pulmonar*. (vol. 2). México
40. Sula, L. y Radkovsky J. (1976). Protective effects of *M. microti* vaccine against tuberculosis. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1:1–6.
- 40a. Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*.16: 463-496
41. Talaro, P. (2005). *Foundations in Microbiology*. (3<sup>a</sup> ed.). WCB/McGraw-Hill
42. Todar, K. (2006). Todar's online textbook of bacteriology. [online.] <http://www.textbookofbacteriology.net/>
- 42a. Torkko, P., Suomalainen, S., Livanainen, E. et al. (2002). *Mycobacterium palustre* sp. nov., a potentially pathogenic, slowly growing Mycobacterium isolated from clinical and veterinary specimens and from Finnish streams waters. *Int J Syst Evol Microbiol*. 52: 1519-1525
43. van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P. E., Hermans, P. W. et al. (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*. 47: 1236–1245
44. van Soolingen, D., van der Zanden, A. G., de Haas, P. E., Noordhoek, G. T. et al. (1998). Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol*. 36: 1840–1845
45. Waaler, H. T. (2002). Tuberculosis and poverty. *Int J Tubercle Lung Dis*. 6: 745-746
46. Weyer, K., Narvaiz de Kantor, I. et al. (1998) Laboratory services in tuberculosis control, part III – Culture. World Health Organization. Geneva. Switzerland.



47. Wilson, K., Walker, J. (1994). *Principles and techniques of practical biochemistry*. (4<sup>a</sup> ed.). Cambridge: Cambridge University Press
- 47a. Wilson, R., Vincent, A., Steingrube, E. et al. (2001). *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudobreaks and contaminated metalworking fluids. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51: 1751-1764
48. World Health Organization. (2002). Global tuberculosis control: surveillance, planning, finance. WHO/CDS/2002.295. World Health Organization. Génova, Suiza.
49. World Health Organization. (2006). Fact sheet N° 104. World Health Organization, Génova, Suiza. [online.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>
50. Yap, E. y McGee, J. (1991). Short PCR product yields improved by lower denaturation temperatures. *Nucleic Acids Research* 19: 1713.
51. Youmans, G. P. (1979). *Tuberculosis*. (ed.), Philadelphia, PA: W. B. Saunders

## GLOSARIO

**16S rRNA:** Es un ácido ribonucleico asociado con la subunidad pequeña de los ribosomas de los procariontes.

**Ácido Nucleico:** Nombre genérico que se aplica indistintamente al DNA o RNA de las dos moléculas informacionales de los seres vivos.

**Adenina, Citosina, Guanina, Timina:** Bases nitrogenadas que conforman el DNA. A menudo se mencionan únicamente por las letras iniciales A, C, G, y T. Por su estructura A se aparea con T (dos enlaces puente hidrógeno) y C con G (tres enlaces puente hidrógeno), de allí el término de "complementarias" y esta propiedad es la base de la replicación del DNA.

**Amplificación:** El aumento en el número de copias de un fragmento específico de DNA; puede ser *in vivo* o *in vitro*.

**Anticuerpo monoclonal:** Anticuerpo monoclonado a partir del cultivo de un único tipo de células (un clon de hibridoma), y que contiene por tanto un sólo tipo de proteínas (inmunoglobulina).

**Antígeno:** Sustancia extraña a un organismo, capaz de desencadenar la producción de una respuesta inmune. Blanco de los anticuerpos.

**BLAST:** (Basic Local Alignment Search Tool) Conjunto de herramientas informáticas que comparan secuencias de DNA o proteínas utilizando los datos que se encuentran disponibles en bases de datos de dominio público. Están diseñadas para encontrar coincidencias de porciones pequeñas de DNA o proteínas entre un conjunto de secuencias mayores. BLAST está disponible en INTERNET su dirección es: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

**Cepa:** En microbiología, conjunto de virus, bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

**Conformación:** Arreglo espacial que adopta una molécula, en virtud de los diferentes ángulos de rotación que pueden adquirir sus enlaces químicos.

**DNA polimerasas:** Enzimas que copian una hebra de DNA que sirve de molde, polimerizando nucleótidos complementarios con el DNA molde. Las polimerasas extienden la cadena agregando nucleótidos al extremo 3' del DNA "creciente". La polimerización de la cadena de nucleótidos ocurre uniendo el grupo hidroxilo del carbono 3' del azúcar al fosfato del futuro nucleótido adyacente.

**DNA templado:** Es la mezcla de DNA que se obtiene después del aislamiento del material genético que será utilizado como molde para la PCR.

**Enzima:** proteína con actividad catalítica, es decir; que acelera una reacción química específica sin destruirse en el proceso. Las moléculas blanco de una enzima se denominan sustratos.

***E. coli:*** Bacteria común que ha sido estudiada intensamente por los genetistas debido al pequeño tamaño de su genoma, su normal falta de patogenicidad y su fácil crecimiento en el laboratorio.

**Electroforesis:** Método de separación de grandes moléculas (tales como fragmentos de DNA o proteínas) de una mezcla de moléculas similares. Una corriente eléctrica pasa a través de un medio que contiene la mezcla, y cada clase de molécula viaja a través del medio a una tasa diferente, dependiendo de la carga eléctrica y el tamaño. Los geles de agarosa y poliacrilamida son los medios más comunes para la electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos.

**Extensión:** Adición de nucleótidos en el extremo 3' de los primers hibridados para formar la cadena complementaria a la cadena patrón.

**Fusión (melting):** Separación de las hebras del DNA en razón del aumento de temperatura debido al que la unión mediante puentes de hidrógeno es una unión débil.

**Gen:** Unidad física y funcional del material hereditario que determina un carácter del individuo y que se transmite de generación en generación. Su base material la constituye una porción de cromosoma (locus) que codifica la información mediante secuencias de DNA.

**Genoma:** Término que denota a todo el material genético de un organismo vivo. En un ser humano, por ejemplo, se refiere a todas las secuencias de todos los cromosomas de una célula.

**Hibridación (annealing):** Asociación complementaria específica por medio de puentes de hidrógeno de los primers (que se encuentran en concentraciones altas) a la hebra de DNA monocatenario, al momento de descender la temperatura del termociclador.

**Homologías:** Similitudes en las secuencias de DNA o proteínas entre individuos de la misma especie o entre especies distintas.

**Nucleótido:** Unidad fundamental de los ácidos nucleicos. Constituida por una base, un azúcar y un fosfato.

**Oligonucleótido:** Una cadena con un pequeño número de nucleótidos.

**Patógeno:** Productor o causante de enfermedad.

**PCR:** (Polymerase Chain Reaction) Es una técnica que permite conseguir muchas copias de DNA. Este procedimiento es uno de los más relevantes de la actual revolución en genética molecular. Antes de su advenimiento, la

obtención de grandes cantidades de DNA para su secuenciación era un proceso largo y tedioso. Actualmente la PCR permite obtener rutinariamente copias de DNA provenientes de muestras muy pequeñas.

**Primers:** Los "primers" o cebadores son pequeñas piezas de DNA que hibridan a secuencias específicas. Una vez que los "primers se unen, la DNA polimerasa extiende el DNA desde el extremo 5' hasta el 3' final. Los primers se seleccionan en manera tal que, cuando se forman las dos nuevas copias ellos se superponen ("overlap") en la región de interés.

**Secuencia de DNA:** Orden de encadenamiento de las bases nitrogenadas de los nucleótidos que constituyen el DNA y que cifra toda la información genética. Cuando es codificante (exón), define el orden de los aminoácidos que forman la proteína correspondiente.

**Secuencia conservada:** Una secuencia de bases en una molécula de DNA (o de aminoácidos en una proteína) que no ha sufrido cambios a través de la evolución.

**Secuencias complementarias:** Secuencias de oligonucleótidos que pueden formar una estructura de doble cadena mediante la unión de pares de bases.

**Termociclador:** Un aparato cuya temperatura puede ser programada de tal forma que la cambie rápidamente y de manera cíclica.

## ANEXOS

### **Anexo 1: Fórmula para el cálculo de $T_m$ de oligonucleótidos**

Las temperaturas de fusión de los óligos se calculan de una manera muy exacta con cálculos termodinámicos usando la siguiente fórmula:

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln (c/4)} - 273.15^\circ\text{C} + 16.6 \log_{10} [K^+]$$

donde  $H$  es la entalpía y  $S$  la entropía para la formación de la hélice,  $R$  es la constante molar y  $c$  es la concentración del oligonucleótido.

### **Anexo 2: Cálculo de la $T_m$ de productos**

La  $T_m$  del producto puede calcularse con la fórmula:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log_{10}[K^+] + 0.41 (\%G+C) - 675/\text{tamaño}.$$

Bajo condiciones estándar de PCR de 50 mM KCL, se reduce a:

$$T_m = 59.9 + 0.41 (\%G+C) - 675/\text{tamaño}$$

**Anexo 3: Protocolo para aislamiento de DNA genómico de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de cultivo (Modificado de: Cooper C. 1993)**

1. Se colocan el tubo con la suspensión celular a temperatura ambiente hasta que se haya descongelado.
2. Se centrifuga durante 10min a 14,000rpm y se desecha con cuidado el sobrenadante.
3. Se adiciona al tubo 1ml de buffer TE pH 8 y se incuba a 80°C en termobloque por 60min dando un toque de vórtex cada 15min.
4. Se deja reposar 5min a temperatura ambiente y luego se añaden 20µl de solución I, 20µl de solución II y 20µl de solución III (cóctel lítico).
5. Se agita la suspensión en un vórtex y se incuba a 37°C por 60min.
6. Se añaden después 76µl de solución B. Se agita intensamente la mezcla usando un vórtex y se incuba la suspensión a 65°C por 10min.
7. A continuación, se adicionan 100µl de NaCl 5M y se agita en vórtex. Luego se añaden 80µl de solución CTAB/NaCl y nuevamente se agita vigorosamente los contenidos del tubo en el vórtex. Se incuba la suspensión resultante a 65°C por 10min.
8. Después de la incubación anterior, se adicionan 700µl de solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se mezcla en el vórtex unos 15seg y luego se centrifuga el tubo Eppendorf a 14,000rpm por 5min a temperatura ambiente.
9. La fase superior se remueve con una pipeta (teniendo cuidado de no perturbar o absorber la fase blanquecina intermedia) a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5ml. Se completa el volumen con isopropanol. Se cierra el

tubo y se lo invierte varias veces para mezclar el contenido. Se incuba al menos 30min a -20°C.

10. Los ácidos nucleicos se colectan por centrifugación a 14,000rpm por 30min. Se descarta cuidadosamente el sobrenadante y se añade aproximadamente 1ml de etanol frío al 70% (v/v) con el cual se lava el pellet. Nuevamente se colectan los ácidos nucleicos por centrifugación a 14,000rpm por 15min
11. Se descarta el sobrenadante con cuidado y se evapora el etanol restante dejando reposar los tubos abiertos 30min dentro de la cámara de bioseguridad para evitar contaminación.
12. Se disuelve el pellet en 100µl de buffer TE pH 8 cuidando de que todo el precipitado se disuelva.

NOTA: La solución de ácidos nucleicos puede ser almacenada a 20°C cuando no se encuentra en uso.

### **Preparación de soluciones**

#### **Buffer TE pH 8:**

- Se prepara un solución de buffer Tris 1.0M mezclando 121.1g de Tris base con unos 800ml de agua destilada y desionizada. Se ajusta el pH a 8.0 usando HCl o NaOH y se completa 1lt con agua destilada y desionizada. Esta solución puede autoclavarse y almacenarse a temperatura ambiente.
- Aparte, se prepara una solución de EDTA 0.5M añadiendo 186.1g de Na<sub>2</sub>EDTA a 800ml de agua destilada desionizada, se ajusta a pH 8.0 añadiendo aproximadamente 20g de NaOH en perlas y haciendo un ajuste final con solución de NaOH. Se lleva a un volumen final de 1lt con agua



destilada y desionizada. Esta solución puede autoclavarse y almacenarse a temperatura ambiente.

- A 800ml de agua destilada y desionizada se le agregan 10.0ml de solución Tris 1.0M pH 8.0 y 2.0ml de solución de EDTA 0.5M pH 8.0. Se ajusta el pH a 8.0 y se lleva a un volumen final de 1lt. La solución puede autoclavarse y almacenarse a temperatura ambiente. Las concentraciones finales de los componentes son 10mM de Tris y 1mM de EDTA.

**Solución I (Lisozima 15mg/ml):**

- Se disuelve 30mg de lisozima en 1ml de agua destilada y se lleva a un volumen final de 2ml.
- Se hacen alícuotas de 120µl y se almacenan a -20°C

**Solución II (Lisostafina 1.8mg/ml):**

- Se disuelven 5mg de lisostafina en 2.27ml de agua destilada.
- Se mezcla bien y se divide la solución en alícuotas de 120µl para almacenar a -20°C

**Solución III (Liticasa 5U/µl):**

- Se disuelven 5mg de liticasa en 5ml de agua destilada.
- Se divide la solución en alícuotas de 120µl y se incuba por 30min a 4°C
- Se almacena a -20°C

### **Solución B:**

- Se prepara 100ml de solución de lauril sulfato de sodio (SDS) 10% en agua destilada desionizada ajustando el pH a 7.2 usando HCl. Esta solución puede almacenarse a temperatura ambiente sin esterilizarse.
- Aparte, se prepara una solución 10mg/ml de proteinasa K en agua destilada y desionizada. Se dispensa en alícuotas y se almacena a -20°C. esta solución puede ser sometida a varios ciclos de congelamiento - descongelamiento antes de que empiece a deteriorarse la enzima.
- La solución B se hace mezclando 700µl de la solución de SDS 10% con 60µl de solución de proteinasa K. Se puede almacenar la solución a -20°C y puede ser sometida a varios ciclos de congelamiento - descongelamiento antes de que la enzima empiece a deteriorarse.

### **CTAB/NaCl**

Se disuelve 4.1g de NaCl en 80ml de agua destilada y desionizada usando un agitador magnético. Durante la agitación, se añade 10g de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio). De ser necesario, se puede disolver el CTAB calentando la solución a 65°C. Se deja enfriar la solución a temperatura ambiente y se ajusta a un volumen final de 100ml con agua destilada y desionizada.

**Anexo 4: Protocolo para aislamiento de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras artificiales.**

1. En 3 tubos Eppendorf colocar 0.5ml de sangre con EDTA y adicionar 2 asadas (100µl) de colonias bacterianas. Se pueden colectar las colonias de las suspensiones celulares por centrifugación a 14 000rpm durante 10min. Se deben observar cuidadosamente las medidas de seguridad al trasvasar los bacilos.
2. Congelar lo tubos a -80°C durante 20min.
3. Sacar del congelador y añadir directamente 1ml de agua destilada estéril.
4. Colocar en agitador mientras aún está congelado y agitar por 5min. Comprobar lisis.
5. Centrifugar a 10 000rpm por 10min a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
6. Repetir de 1 a 5.
7. Continuar con el protocolo citado en el Anexo 3.

## Anexo 5: Micobacterias atípicas

### *Mycobacterium malmoense*

- Crecimiento lento, no pigmentada, alto grado de resistencia.<sup>18</sup>
- Patógeno oportunista<sup>18,20</sup> es decir que cualquier persona es portadora pero afecta a quienes se encuentren vulnerables.
- Se encuentran distribuidas en el medio ambiente.<sup>23</sup>
- Casos reportados en Gran Bretaña, Suecia (norte de Europa)<sup>18</sup> y Cuba<sup>23</sup>.
- Causa infección pulmonar en adultos, especialmente ancianos<sup>18,23</sup> y linfadenitis cervical en niños<sup>35a</sup>.
- Mayor incidencia en pacientes inmunodeprimidos y aquellos portadores del VIH.
- Muy pocos individuos expuestos a este microorganismo desarrollan enfermedad<sup>7a,20</sup>, puede existir un componente genético de susceptibilidad.<sup>20</sup>

### *Mycobacterium gordonae*

- Patógeno oportunista<sup>23</sup>, escotocromógeno<sup>35a</sup>.
- Llamado así en honor de Ruth E. Gordon.<sup>23</sup>
- Organismo ubicuo en el medio ambiente. Presente en agua corriente, en la tierra y en el medio hospitalario<sup>23</sup>.
- Extraordinariamente baja patogenicidad, de hecho considerado como no patógeno.<sup>23</sup>
- Colonizador de la superficie corporal y contaminante potencial de los medios de cultivo.<sup>23</sup>

- Junto con el complejo *M. avium* son los patógenos ambientales más frecuentemente identificados en los laboratorios de micobacterias en EUA.

*Mycobacterium nebraskense*<sup>1a</sup>

- Especie de crecimiento lento, escotocromógena, pigmentación amarilla.
- Primeros casos reportados en el estado de Nebraska, EUA.<sup>1a</sup>
- Patógeno oportunista, causa infección pulmonar.
- La secuencia del gen 16S rRNA distinta a las de otras micobacterias. Filogenéticamente próxima a *M. malmoense*, *M. avium*, *M. kansasii* y *M. scrofulaceum*, es decir relacionada con especies de crecimiento lento.

*Mycobacterium saskatchewanense*<sup>35a</sup>

- Especie escotocromogéna de crecimiento lento.
- Causa a menudo enfermedad pulmonar crónica en individuos adultos, linfadenitis en niños y enfermedad diseminada en pacientes inmunocomprometidos.

*Mycobacterium colaregonium*<sup>34a</sup>

- Aislado de paciente con enfermedad pulmonar.

*Mycobacterium palustre*<sup>42a</sup>

- Organismo de crecimiento lento, grupo distinto al de pigmentación amarilla.
- Aislado de especímenes clínicos y veterinarios y fuentes de agua. Casos reportados en Finlandia.

- Relacionado filogenéticamente con *M. kubicae*, otra especie descrita recientemente.
- Micobacteria potencialmente patógena. Causante de linfadenitis en niños.
- La mayoría de las cepas colectadas de aguas naturales.

*Mycobacterium bohemicum*<sup>30a</sup>

- Micobacteria escotocromógena de crecimiento lento.
- Aislada de esputo de pacientes con TB. Patógeno oportunista.
- Secuencia única del gen 16S rDNA.
- Primer caso reportado en República Checa.

*Mycobacterium alsiensis*<sup>31a</sup>

- Causante de infiltraciones pulmonares.

*Mycobacterium immunogenum*<sup>47a</sup>

- Nuevo miembro del complejo *M. fortuitum*, relacionado con *M. abscesus*.
- Produce pseudo-erupciones. Es una especie de crecimiento rápido.
- Más resistente al hipoclorito que bacterias coliformes, relativamente resistentes a agentes desinfectantes como glutaraldehído alcalino y formaldehído.
- Se lo encuentra en el ambiente junto con otras especies micobacterias.
- Alta capacidad de sobrevivir y proliferar en sistemas de agua hospitalarios.

*Mycobacterium tilburgii*

- Casos reportados en Europa Central: Alemania y Holanda.

- Episodios de disuria, hematuria y molestia abdominal en mujer de 45 años, se observaron lesiones en la vejiga con placas amarillas.
- Pérdida de peso en paciente con SIDA, se observaron lesiones en el duodeno con placas amarillas.

*Mycobacterium marinum*

- Organismo fotocromógeno.
- La infección más común es llamada “granuloma de pecera”.

*Mycobacterium scrofulaceum*<sup>35a</sup>

- Organismo escotocromógeno de crecimiento lento.
- Encontrado en fuentes de agua, agua del grifo y en el tracto respiratorio humano.
- Causa escrófula (inflamación de ganglios linfáticos) en niños, una adenitis cervical granulomatosa; y enfermedad pulmonar en adultos.

*Mycobacterium haemophilum*<sup>35a</sup>

- Puede causar múltiples nódulos cutáneos que pueden tener color púrpura y desarrollar en úlceras o abscesos. Por lo general se sitúan en las articulaciones de los miembros.

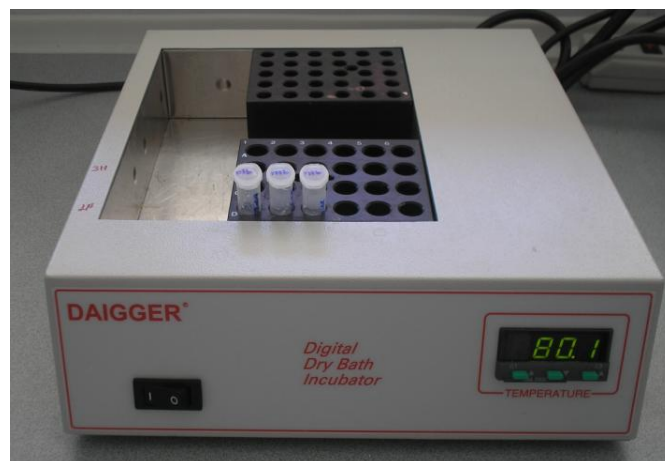
*Mycobacterium chimaera*

- Organismo de crecimiento lento, no pigmentado.
- Encontrado en especímenes respiratorios de pacientes ancianos.
- Relacionado con enfermedades respiratorias en pacientes ancianos.

## Anexo 6: Equipos utilizados en el aislamiento de DNA



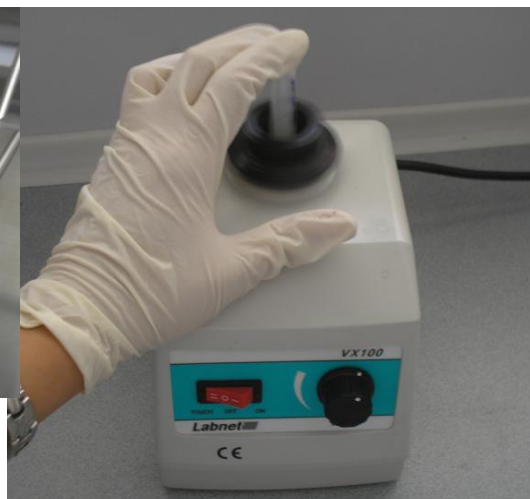
**Cámara de bioseguridad clase II**



**Termobloque**



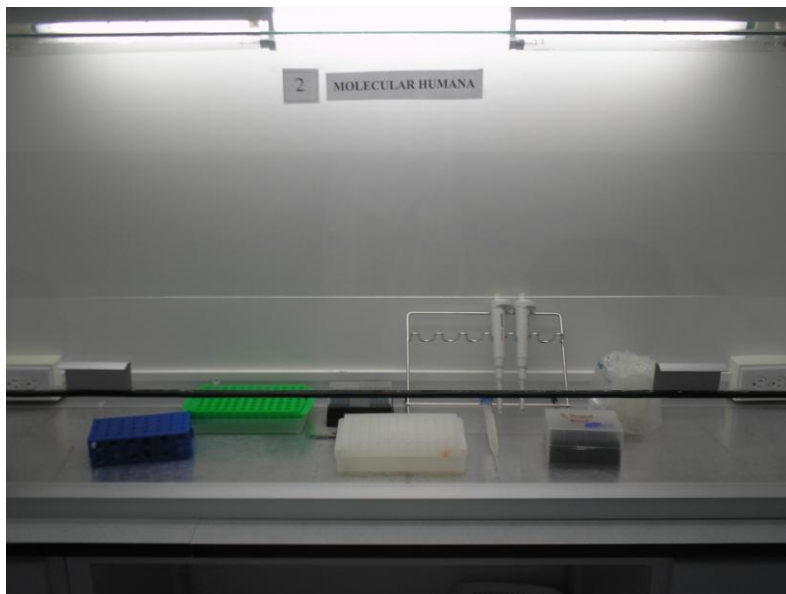
**Centrífuga**



**Vórtex**



## Anexo 7: Equipos utilizados para pre-PCR, PCR y post-PCR



**Cabina de seguridad (Pre-PCR)**



**Termocicladores (PCR)**

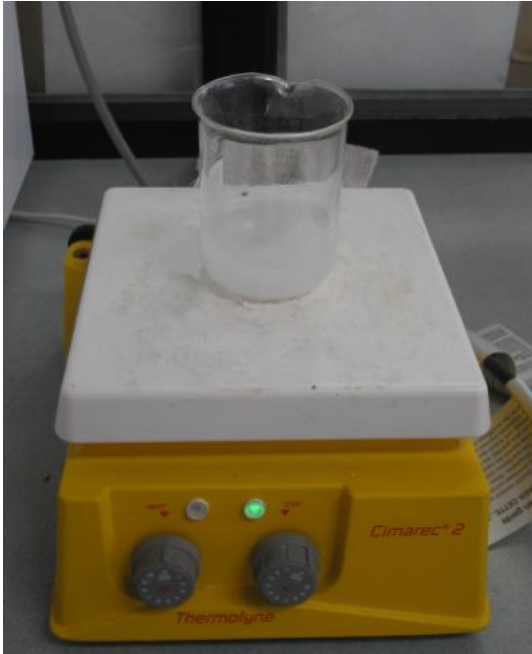


**Fuente de poder y cámara de electroforesis (Post-PCR)**



**Transiluminador**

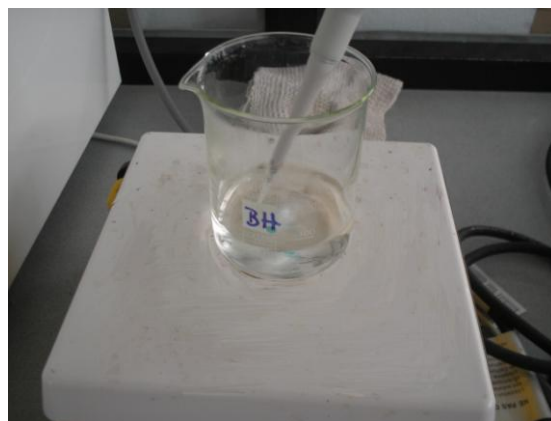
## Anexo 8: Preparación de geles de agarosa



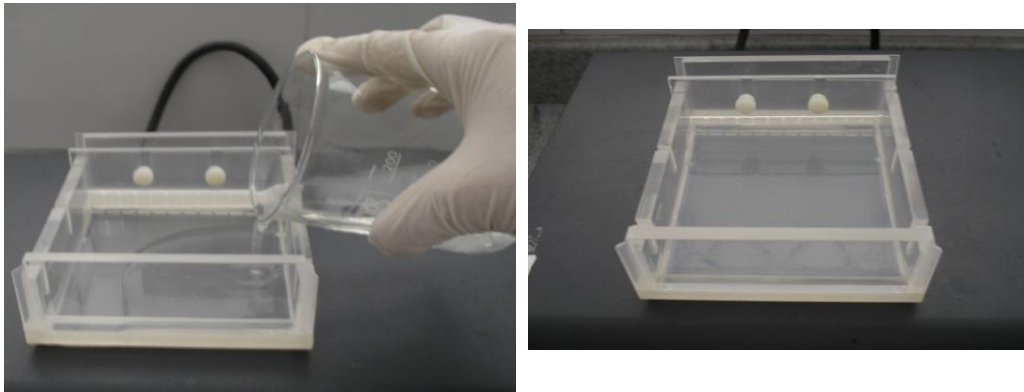
1) Hidratación de agarosa en buffer TAE 1X



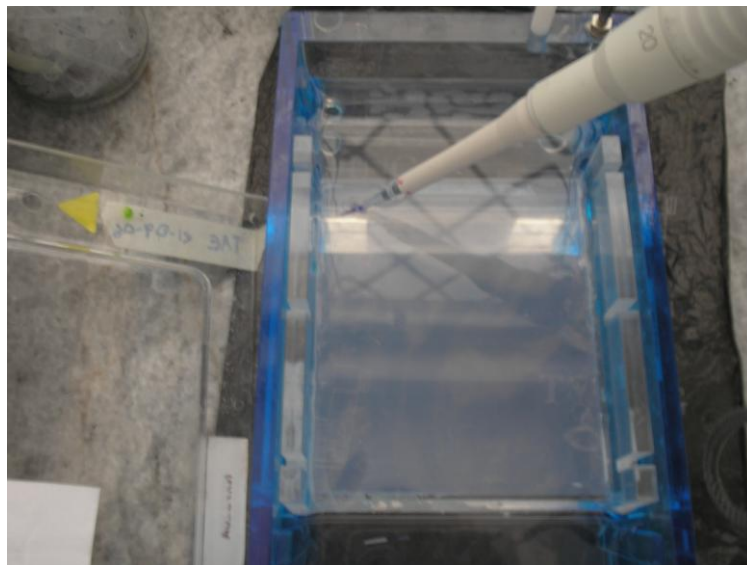
2) Fundición



3) Adición de bromuro de etidio



#### 4) Enfriado



#### 5) Carga de las muestras