

00346⁶
2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS

APLICACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR) EN EL DIAGNOSTICO DE LA
TUBERCULOSIS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
MARIA TERESA HERRERA BARRIOS

DIRECTOR DE TESIS: MED. CIR. EDUARDO SADA DIAZ.

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

265603



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

00346

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR) EN EL DIAGNÓSTICO DE LA
TUBERCULOSIS.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

MARIA TERESA HERRERA BARRIOS

DIRECTOR DE TESIS: MED. CIR. EDUARDO SADA DIAZ

MEXICO, D. F.

1998

**Este proyecto se realizó en el Departamento de Microbiología del Instituto
Nacional de Enfermedades Respiratorias bajo la dirección del Dr. Eduardo Sada
Díaz y con el financiamiento de CONACYT 0693P-M9506**

DEDICATORIA

A ti **Bonifacio**, por todo el amor y felicidad que me das cada día.
Gracias por todo.

A mis padres

Flora

y

Miguel

Por todo su amor y ejemplo
que me han brindado.

A ti padre, porque vivirás siempre en mi corazón.

A mis hermanos, por todos los momentos felices que hemos compartido juntos.

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente le agradezco a mi director de tesis el Dr. Eduardo Sada Díaz por brindarme todo su apoyo y confianza para desarrollar este trabajo.

A cada uno de los miembros del jurado por sus aportaciones y comentarios en la *revisión de la tesis*.

Dr. Fernando Montiel Aguirre
Dr. Edmundo de Ibis Lamoyi Velázquez
Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
Dr. Raúl Mancilla Jiménez
Dr. Rafael S. Saavedra Durán
Dra. Yolanda López Vidal

A todos mis maestros por sus enseñanzas.

A mis compañeras de laboratorio Martha Torres, Olivia Hernández, Virginia Arriaga, Ma. Carmen Sarabia y Esther Ramos.

A Martha Torres Rojas por la amistad que nos une.

INDICE

	Página
Abreviaturas.....	1
1. Introducción.....	2
2. Planteamiento del problema.....	20
3. Objetivos.....	21
4. Materiales y Métodos.....	22
5. Resultados.....	35
6. Discusión	60
7. Conclusiones.....	68
8. Bibliografía.....	69
9. Apéndice.....	74

ABREVIATURAS.

TB = Tuberculosis

TBM = Tuberculosis meníngea

M. tuberculosis = *Mycobacterium tuberculosis*

BAAR = Bacilo Ácido- Alcohol- Resistente

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

OMS = Organización Mundial de la Salud

MPM = Marcador de peso molecular

pb = pares de bases

LCR = Líquido cefalorraquídeo

dNTP's = Desoxinucleótidos trifosfatados

ADN = Acido desoxiribonucleico

IS6110 = Secuencia de Inserción 6110 (*Insertion Sequence*)

Dig = Digoxigenina

μorganismos = microorganismos

1. INTRODUCCION.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa generalizada producida principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (denominado Bacilo de Koch descubierto en 1882), aunque en raras ocasiones la enfermedad puede ser causada por *Mycobacterium bovis* (1, 2). Estos microorganismos se caracterizan por ser parásitos intracelulares con una gran capacidad para sobrevivir dentro de los macrófagos haciendo uso de mecanismos de evasión como son: a) Impedir la fusión del fagosoma con el lisosoma al inhibir la acidificación del fagosoma, b) evasión a la acción de las enzimas lisosomales al destruir la membrana fagosomal para escapar al citoplasma y multiplicarse libremente dentro de la célula y además, c) adquisición de resistencia a las enzimas lisosomales y a reactivos intermediarios de oxígeno y nitrógeno (3, 4).

Características de *Mycobacterium tuberculosis*.

M. tuberculosis es un bacilo que pertenece a la familia Mycobactericea dentro del orden de los Actynomycetales y a la clase Schizomicetos (1, 2, 5).

Cabe mencionar que en los tejidos de animales *M. tuberculosis* se presenta típicamente en forma de un bacilo recto y delgado midiendo aproximadamente de 2 a 4 μm de largo y de 0.2 a 0.5 μm de ancho, mientras que en los medios de cultivo sus formas pueden variar de coccoides a filamentosas. Estructuralmente la bacteria es una típica célula procarionte cuya membrana citoplasmática se encuentra cubierta por una pared muy gruesa que contiene grandes cantidades de ácido meso-diaminopimélico y de arabinogalactana (5, 6). La pared posee un alto contenido de lípidos que constituyen más del 60% del peso seco de la bacteria. Estos lípidos se encuentran unidos a las proteínas y a polisacáridos como glucana, manana, arabinogalactana y arabinomanana.

Los glicolípidos y las proteínas se encuentran firmemente unidos a la capa externa de la pared bacteriana y la localización de los lípidos le confieren algunas propiedades como son la impermeabilidad a las tinciones, la hidrofobicidad, la resistencia a la destrucción por ácidos y álcalis, la resistencia a la digestión intracelular por los macrófagos y a la actividad

bactericida del complemento (5). Entre los lípidos extraídos de *M. tuberculosis* con solventes orgánicos neutros se han encontrado ceras verdaderas y glicolípidos.

Se ha descrito que *M. tuberculosis* posee tres factores de virulencia, los cuales, son localizados en la parte externa de la pared bacteriana. Uno de ellos es el factor cordón que ha sido identificado como un micósido, 6, 6'-dimicoliltrealosa responsable del crecimiento de la bacteria en filas paralelas compactas formando serpentinas y se le ha asociado con la capacidad de inducir la formación de granulomas, además de inhibir la migración de los polimorfonucleares al sitio de infección (5-7). Su efecto tóxico es debido a su interacción con las membranas mitocondriales provocando así una disminución de la actividad de las enzimas microsomales dependientes de NAD en varios tejidos (4, 5).

Otro factor son los sulfátidos que son glicolípidos que reaccionan con el rojo neutro en condiciones alcalinas. El papel que se les ha asignado es el de incrementar la toxicidad del factor cordón favoreciendo la formación del granuloma, además de tener la capacidad de inhibir la fusión fagosoma-lisosoma y promover la sobrevivencia de la bacteria dentro de los macrófagos (4, 8).

Los micósidos son el tercer factor de virulencia caracterizados por ser glicolípidos especie-específicos y peptidoglicolípidos de la bacteria. Los glicolípidos de superficie especie-específicos de *M. tuberculosis* son lipooligosacáridos que contienen trealosa. Se ha observado que ciertos micósidos inducen la formación de una zona clara alrededor de la bacteria fagocitada y probablemente su función es la de conferirle cierto grado de resistencia a la destrucción intracelular (4).

M. tuberculosis es un aerobio estricto con multiplicación binaria, inmóvil, sin flagelos, no esporulado y no se ha descrito que sea productor de endotoxinas o exotoxinas. Otra característica importante de este microorganismo es su lento crecimiento, esto, en parte debido al gran contenido de lípidos en su pared. Su temperatura óptima para crecer es entre 35 a 37°C a un pH entre 6.5 y 7.2 (5-7, 9). En los medios de cultivo sintéticos el microorganismo se divide aproximadamente cada 15 a 20 horas, de manera que para tener un cultivo se necesitan más de dos semanas de incubación. Sin embargo, cuando el medio es suplementado con glicerol, sales de amonio, asparagina o una mezcla de aminoácidos se ve incrementada su velocidad de crecimiento.

La bacteria muestra una preferencia nutricional por los lípidos y se le puede aislar con relativa facilidad de las muestras clínicas en medios sólidos con huevo como son el Lowenstein-Jensen y Petragrani en un periodo de 3 a 6 semanas. Sus colonias en medio sólido son rugosas y sin pigmento, usualmente en forma de cordones o bandas serpentina (5).

El complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

El término "complejo tuberculoso" ha sido utilizado para referirse a 4 especies de micobacterias entre las que se incluyen a *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum* (10, 11). Esta asociación ha sido respaldada por los hallazgos realizados por Eisenach y colaboradores (11) quienes con el objetivo de determinar la cercanía genética de algunas especies de micobacterias extrajeron ADN cromosómico de tres cepas de referencia de *M. tuberculosis*, dos aislados clínicos de *M. tuberculosis*, dos cepas de referencia de *M. bovis*, dos de *M. bovis* BCG y una cepa de referencia de *M. kansasii*. Posteriormente el material genético de estas micobacterias fueron tratados con nueve endonucleasas (Bam H1, Pst E II, Eco R1, Hind III, Kpn I, Pst I, Sal I, Sma I y Sst II) para posteriormente hacer un análisis de patrones de restricción por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y observaron que el único patrón diferente entre las micobacterias fue el mostrado por *M. kansasii*. Después llevaron a cabo hibridaciones utilizando ocho sondas de ADN marcadas con ^{32}P provenientes de clones de una genoteca de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv, donde se utilizó al bacteriófago lambda 1059 como vector de clonación. Sus resultados mostraron que *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG pertenecen a la misma especie existiendo algunas regiones del cromosoma que muestran una relación evolutiva muy cercana entre los miembros del complejo tuberculoso incluyendo a *M. microti* y *M. africanum*, pero también existen regiones de alta divergencia.

Epidemiología de la tuberculosis.

La tuberculosis es la principal causa de muerte ocasionada por sólo un agente infeccioso (12-14). A pesar de ser una de las enfermedades más antiguamente descritas,

hasta nuestros días sigue constituyendo un serio problema de salud pública a nivel mundial.

Se ha estimado que aproximadamente una tercera parte de la población mundial (1,700 millones) ha sido infectada por *M. tuberculosis* y la mayor parte de esta población se encuentra principalmente en los países en desarrollo y está en riesgo de desarrollar la enfermedad. La proporción de personas infectadas en los países desarrollados y los países en desarrollo es similar; sin embargo, en los países desarrollados el 80% de las personas infectadas son mayores de 50 años, a diferencia de lo que ocurre en los países en desarrollo en donde el 75-80% de las personas infectadas son menores de 50 años. La mayoría de los enfermos son adultos jóvenes en etapa económicamente productiva entre los 15-49 años y niños expuestos al contagio desde el nacimiento y durante su infancia (12-1). De acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1989 se reportaron 1.3 millones de casos y 450,000 muertes ocasionadas por la tuberculosis en países en desarrollo afectando principalmente a niños menores de 15 años (12, 14).

En el año de 1992 a nivel mundial se registraron más de 8 millones de nuevos casos de tuberculosis y 2.7 millones de muertes y en abril de 1993 la O.M.S. declaró a la tuberculosis como un problema mundial de salud y advirtió que la ineficiencia de los programas de control de la enfermedad pueden ocasionar que para la última década del presente siglo se registren 90 millones de nuevos casos y más de 30 millones de muertes (14-16).

Existen diversos factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la enfermedad y algunos de ellos son los escasos recursos económicos, la falta de atención médica, la desnutrición, los estados de inmunodeficiencia, la sobrepoblación, el aumento de la esperanza de vida, el hacinamiento y la mala ventilación en la vivienda.

A partir de los años ochenta se ha observado un incremento alarmante el número de casos de tuberculosis presentándose con mayor frecuencia en las personas infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La pandemia ocasionada por el VIH ha sido uno de los factores de riesgo que han repercutido de manera importante en el resurgimiento de la enfermedad ya que se ha estimado que más de 3 millones de pacientes son infectados por el bacilo tuberculoso y por el VIH.

La infección por el VIH incrementa las probabilidades para que una infección latente y asintomática ocasionada por el bacilo tuberculoso progrese hasta una forma activa de la enfermedad, esto, como consecuencia de un sistema inmune dañado e incapaz de proporcionar la inmunidad celular adecuada. Generalmente, en este tipo de pacientes las formas extrapulmonares de la enfermedad son las más frecuentes, lo cual, constituye un problema ya que son mucho más difíciles de diagnosticar. En la tuberculosis extrapulmonar frecuentemente se ven involucrados sitios relativamente inaccesibles y aún la presencia de pocas bacterias puede ocasionar un gran daño, lo que hace que el diagnóstico sea más difícil de establecer por los métodos bacteriológicos tradicionales como son el cultivo y la tinción (12-19).

Otros de los factores que también han contribuido a este problema es la aparición de cepas multirresistentes a drogas antituberculosas y además el incremento de las enfermedades causadas por otras micobacterias diferentes de *M. tuberculosis* a las cuales se les ha denominado MOTT (*Mycobacteria other than tuberculosis*) (9). Estos factores han traído como consecuencia el fracaso parcial de los programas encaminados al control de la enfermedad, ya que son factores que no habían sido considerados (13, 15, 18).

El resurgimiento de la tuberculosis ha ocasionado que los organismos e instituciones relacionados con el área de la salud impulsen los estudios de investigación para el diagnóstico, la prevención, el tratamiento y el control de la enfermedad.

Tuberculosis en México.

De acuerdo a los reportes de la Secretaría de Salud en 1993 la morbilidad registrada por tuberculosis en todas sus formas clínicas fue de 17.1 casos por cada 100,000 habitantes con una tendencia de incremento en tasa de acuerdo a la edad desde 8.3 para menores de un año y hasta 52.5 en mayores de 64 años. Con respecto a la mortalidad en 1993 el 81.6% fueron causadas por la tuberculosis pulmonar, 1.3% por la tuberculosis meníngea y el 17% por otras formas (1).

Patogenia de la tuberculosis.

La bacteria ingresa al organismo humano principalmente por vía aérea mediante la inhalación de material infectante que previamente ha sido eliminado al medio ambiente por pacientes con tuberculosis pulmonar activa a través de la tos o el estornudo (1, 2, 4-7).

Las gotitas permanecen suspendidas en el aire y el riesgo de adquirir la enfermedad depende de la inhalación de las gotas que contienen a la bacteria. Las gotas grandes se depositan en las vías aéreas altas como son la tráquea y los bronquios y son removidas de estas regiones por el mecanismo mucociliar de limpieza, mientras que las gotas pequeñas de aproximadamente 1-5 μm que contienen tres o menos bacterias se depositan en los alvéolos (4). Los macrófagos alveolares que constituyen la primera y principal línea de defensa en el pulmón, fagocitan la bacteria y la infección primaria puede tener dos cursos: uno de ellos es que el sistema inmune sea capaz de controlarla y no se desarrolle la enfermedad, mientras que el otro, es cuando el sistema inmune es incapaz de controlar la infección y la enfermedad progresa hasta su forma activa. En este caso, en pocos días el microorganismo se multiplica ilimitadamente en el interior del macrófago evadiendo los mecanismos bactericidas intracelulares hasta que la célula muere y las nuevas bacterias son ingeridas por otros macrófagos y este proceso se vuelve a repetir y en el sitio se forma la lesión primaria (1, 2, 4).

Posteriormente, la bacteria es diseminada hematógicamente a varios órganos incluyendo las secciones apicales de los pulmones, la corteza de los riñones, los cuerpos vertebrales y el sistema nervioso central. Una característica de estas regiones es la alta concentración de oxígeno local que presumiblemente ayuda a la sobrevivencia del microorganismo (4). En un lapso de 2 a 10 semanas los antígenos micobacterianos se liberan e inducen una respuesta inmune humoral que no tiene realmente una función importante; también se genera la respuesta inmune celular que es dependiente de los linfocitos T, los cuales, sintetizan linfocinas cuya función es la de activar a los macrófagos infectados para que tengan la capacidad de destruir a las bacterias que contienen en su interior mediante sus mecanismos bactericidas y de esta manera detener el progreso de la enfermedad. La hiperactividad conduce a la secreción de diversos mediadores de la inflamación y enzimas lisosomales, moléculas que junto con las liberadas por los macrófagos destruidos y por la

acción de los linfocitos T citotóxicos son los responsables de la necrosis caseosa local y el resultado final de la respuesta inmune es la eliminación de *M. tuberculosis* en casi todos los focos de infección.

La primoinfección confiere cierto grado de inmunidad, sin embargo, es relativa ya que no elimina totalmente a la bacteria. Esto explica que la tuberculosis en el adulto con frecuencia sea originada por las bacterias que ingresaron anteriormente y que quedaron en forma latente en los nódulos y que se reactivan cuando el sujeto entra a un estado de inmunodeficiencia (Reinfección endógena). Este proceso se da principalmente en los países desarrollados donde existe una baja incidencia de la enfermedad; sin embargo, en estos países existe un pequeño porcentaje que resulta de una infección reciente y se da principalmente entre los grupos étnicos e inmigrantes (12). En cambio, en los países en vías de desarrollo que tienen una alta incidencia de la enfermedad la reinfección es originada frecuentemente por la llegada de nuevas bacterias provenientes de una fuente externa (Reinfección exógena).

Formas clínicas de la enfermedad.

Tuberculosis pulmonar.

La forma que se presenta con mayor frecuencia es a nivel pulmonar y se caracteriza por la presencia de tubérculos y necrosis caseosa. De acuerdo a la información recabada por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud en 1993 en nuestro país la incidencia de la tuberculosis pulmonar fue de 82.5%, la tuberculosis meníngea de 1.2% y 16.3% para otras formas (9). La forma pulmonar en la mayoría de los casos provoca un cuadro crónico caracterizado por la tos, la expectoración, la fiebre, la pérdida de peso y ataque al estado general. Sin embargo, *M. tuberculosis* es capaz de afectar a cualquier órgano y sistema en forma progresiva y crónica por lo que el cuadro clínico se encuentra muy relacionado con el órgano o sistema afectado. Considerando la patogenia de la infección, la bacteria puede diseminarse de los pulmones, que constituye la principal vía de entrada, hacia otros sitios como son los ganglios linfáticos, los riñones, los cuerpos

vertebrales y el sistema nervioso central por vía hematógica para posteriormente crear focos de infección que darán origen a las formas extrapulmonares de la enfermedad (1, 2).

Tuberculosis meníngea.

La tuberculosis meníngea (TBM) puede ocurrir a cualquier edad de la vida, pero se presenta con mayor frecuencia en menores de 10 años (20). Su desarrollo sigue a una diseminación hematógica de *M. tuberculosis* al sistema nervioso central ocurrida durante la etapa de infección inicial o más tarde como resultado de la caseificación del sitio primario u otros sitios.

Los estudios patológicos llevados a cabo por Rich y McCordick en 1933 demostraron que esta forma de la enfermedad podía ser ocasionada aún en ausencia de la tuberculosis miliar ya que hasta entonces se creía que la diseminación hematógica era la responsable (21).

Como resultado de estas investigaciones actualmente se piensa que la TBM es consecuencia de la ruptura o el desarrollo de uno o más tubérculos, lesiones subpiales, denominadas Focos de Rich que se desarrollan posteriormente a la diseminación temprana hacia el sistema nervioso central. Los estímulos específicos para la ruptura o desarrollo de estas lesiones se desconoce, sin embargo, se cree que existen mecanismos inmunológicos involucrados en éstos procesos. Cuando las lesiones se rompen en el espacio subaracnoideo o en el sistema ventricular ocasionan la meningitis, mientras que el desarrollo de las lesiones pueden ser meníngeos, parameníngeos o a lo largo de parénquima en alguna porción del neuraxis. Los signos y síntomas dependen en gran medida del sitio de las lesiones y de su grado de extensión.

Diagnóstico de la tuberculosis.

El diagnóstico clínico de la tuberculosis puede sospecharse por signos y síntomas del paciente como son la tos, la fiebre y la pérdida de peso; sin embargo, existen problemas cuando no se tiene un cuadro clínico sugestivo de la enfermedad.

Para establecer el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar la radiografía de tórax ha sido considerada de gran utilidad, sin embargo, su utilidad es limitada ya que existen imágenes

radiológicas muy similares a las producidas por infección con *M. tuberculosis* que son ocasionadas por otros microorganismos infectantes e incluso por enfermedades pulmonares de tipo no infeccioso (22). Estos problemas han determinado que para establecer un diagnóstico acertado es necesario respaldarse en pruebas bacteriológicas de laboratorio como son el aislamiento e identificación de la bacteria.

En el laboratorio de bacteriología se cuenta con dos métodos tradicionales para establecer el diagnóstico el cultivo y la baciloscopía; que a pesar de ser muy útiles tienen ciertas limitaciones.

El cultivo constituye el "estándar de oro" y proporciona una especificidad del 100% además de permitirnos realizar pruebas bioquímicas de caracterización y pruebas de susceptibilidad a los aislados. Sin embargo, la principal desventaja que tiene son los largos periodos de tiempo que se requieren para obtener los resultados (3 a 6 semanas) debido al lento crecimiento de la micobacteria. Cuando existen pocas micobacterias en el sitio de infección los cultivos múltiples pueden ser necesarios para tener un resultado positivo y esto retrasa aún más el diagnóstico. Debe procurarse que una vez que la muestra ha sido descontaminada se cultive tan pronto como sea posible ya que la viabilidad de la micobacteria disminuye con el tiempo, especialmente en las muestras en que el agente descontaminante (NaOH) no ha sido completamente neutralizado. Los resultados han mostrado una sensibilidad alta para la tuberculosis pulmonar, sin embargo, disminuye para las formas extrapulmonares (22).

La baciloscopía o examen microscópico directo es un método tradicional rápido que se ha utilizado para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y la tuberculosis extrapulmonar así como para el control del tratamiento (9). Este método consiste en la identificación del bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR) mediante el uso de dos tipos de tinciones para micobacterias: 1) el método de Ziehl-Nielsen o Kinyoun en donde la micobacteria puede ser teñida con fucsina básica; éste método se utiliza con mayor frecuencia debido a su accesibilidad y bajo costo; o bien, 2) mediante la tinción de Truant en la que se utiliza una mezcla de fluorocromos auramina-rodamina y donde se requiere de un microscopio de fluorescencia para hacer la lectura de las laminillas. El uso de los fluorocromos tiene la ventaja de permitir la evaluación de las muestras en menos tiempo en comparación con las

teñidas con el método de Ziehl-Nielsen. El límite de detección de la baciloscopia es de aproximadamente 5,000-10,000 bacterias por mililitro de muestra, pero la baciloscopia tiene la desventaja de no poder diferenciar a *M. tuberculosis* de las otras especies micobacterianas (23). La especificidad de la baciloscopia es muy alta, sin embargo, su sensibilidad es baja ya que en estudios prospectivos de tuberculosis pulmonar ha demostrado una sensibilidad del 75% con respecto al cultivo y la sensibilidad es menor del 50% en pacientes con las formas extrapulmonares tales como la tuberculosis meníngea, la tuberculosis pleural y la tuberculosis peritoneal (22).

Uno de los nuevos procedimientos implementados en algunos laboratorios de bacteriología es inocular en medio líquido selectivo ya que muchas especies de *Mycobacterium* crecen más rápidamente en los medios líquidos que en los sólidos. Se trata del sistema de cultivo radiométrico denominado Bactec, el cual, permite detectar el crecimiento de la micobacteria al utilizar un medio líquido selectivo que tiene como sustrato el ácido palmítico marcado con ^{14}C . Las micobacterias lo metabolizan y liberan $^{14}\text{CO}_2$, el cual, es cuantificado por el equipo Bactec. Esto hace posible detectar el crecimiento en un periodo de 7 a 14 días, aún cuando no haya el desarrollo visible de colonias para lo cual se requieren tres semanas en los medios sólidos (23).

Otra alternativa para el diagnóstico han sido las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) que nos permiten analizar la respuesta humoral de los pacientes con tuberculosis hacia determinados antígenos micobacterianos y han mostrado ser útiles en algunas situaciones clínicas, pero su sensibilidad y especificidad en términos generales son poco satisfactorias (22, 24, 25).

Existe otro método utilizado para identificar a *M. tuberculosis* que se basa en el análisis por cromatografía de los lípidos de la pared bacteriana por HPLC (High-performance liquid chromatography), GLC (gas-liquid chromatography) o cromatografía en capa fina. Para llevar a cabo este procedimiento se hace una extracción de los ácidos micólicos de las micobacterias y posteriormente son esterificados y separados por cromatografía. Cada especie de micobacteria sintetiza ácidos micólicos específicos, por lo que el patrón cromatográfico de ácidos micólicos es específico para cada especie. Este es un método rápido ya que requiere menos de cuatro horas para llevarlo a cabo; sin embargo, no es

aplicable al análisis directo de muestras clínicas ya que se requieren cultivos puros (23, 26).

Dentro de las técnicas de biología molecular la hibridación de ADN o ARN con sondas específicas han constituido una alternativa ya que en el mercado existen sondas que hibridan específicamente con algunas especies de micobacterias como son *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. gordonae*. La prueba se lleva a cabo en unas cuantas horas y muestra una sensibilidad y especificidad cercanas al 100% para estas especies; sin embargo, tiene la desventaja de requerir de cultivos puros, ya que la sensibilidad es baja cuando se analizan directamente las muestras clínicas. Cabe mencionar que el límite de detección por esta técnica es mayor a 100,000 bacterias (23, 26).

En las últimas décadas se han dado grandes avances en el desarrollo de técnicas más sensibles y específicas que las ya existentes cuyo principal objetivo es el de detectar al agente infectante de manera rápida y eficiente.

Una de las técnicas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa también conocida como la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que ha abierto nuevas posibilidades para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y no infecciosas. Con respecto a otros métodos ha demostrado tener una mayor sensibilidad en la detección del agente infectante y en investigación ha sido aplicada en la identificación de un gran número de microorganismos con fines de diagnóstico, pero hasta ahora ha sido limitada su aplicación clínica (27).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En abril de 1983 Kary B. Mullis conducía su automóvil en las montañas de California, y durante este viaje ideó una nueva metodología que no tuviera como limitación el número de copias de los genes. Actualmente este proceso es conocido como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

Esta técnica fue patentada en julio de 1987 y Kary B. Mullis se hizo acreedor al premio nobel de química en 1993. El PCR ha tenido grandes repercusiones, ya que en los últimos

años se han publicado y se siguen publicando un gran número de trabajos utilizando esta metodología aplicada en diferentes campos de la investigación.

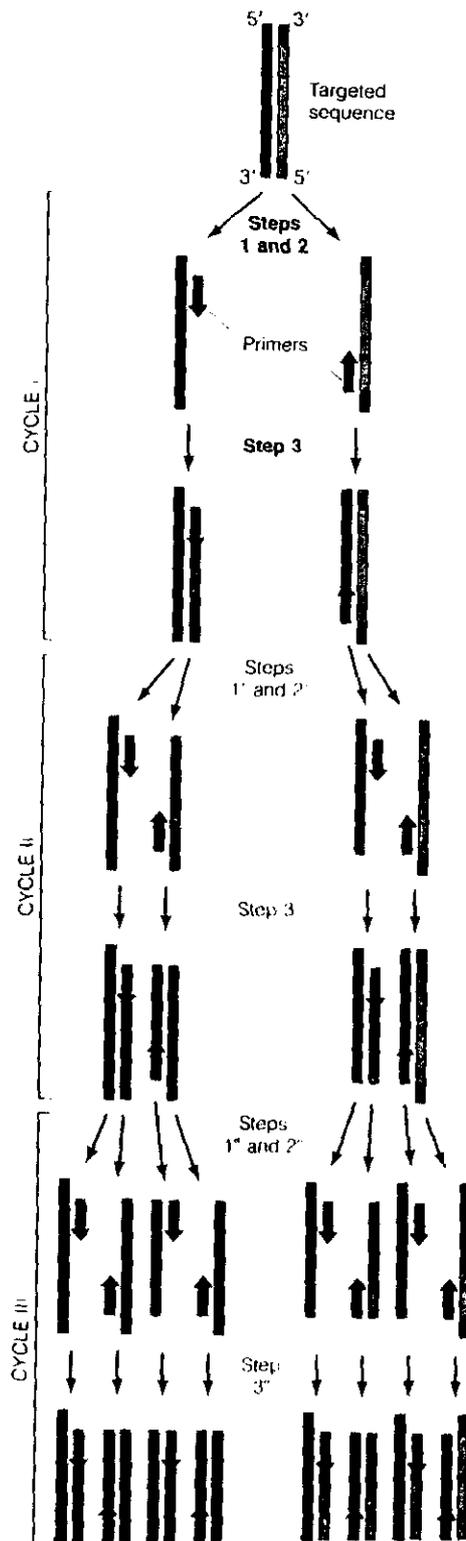
La técnica de PCR permite llevar a cabo la síntesis *in vitro* de un fragmento específico de ADN en unas cuantas horas. Para este procedimiento se requiere de la presencia del molde de ADN, la mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatados, los dos oligonucleótidos que delimitan el tamaño del fragmento que va a ser amplificado y la enzima Taq polimerasa que va a llevar a cabo la síntesis.

Como se muestra en el siguiente esquema la amplificación se lleva a cabo en ciclos constituidos por tres diferentes temperaturas. La amplificación se inicia con la desnaturalización por temperatura (94-95°C) del ADN de doble cadena en presencia de un exceso de los dos oligonucleótidos, los cuatro dNTPs y la Taq polimerasa. En este paso, las dos cadenas de ADN se separan dando lugar a cadenas sencillas de ADN.

En el segundo paso, la temperatura de la mezcla de reacción es disminuida para permitir que los oligonucleótidos iniciadores se unan por complementaridad a las cadenas sencillas de ADN en su extremo 5' y funcionen como iniciadores de la síntesis. Típicamente estos oligonucleótidos tienen secuencias diferentes entre sí y son complementarios a las secuencias de las cadenas opuestas del molde de ADN; además limitan el tamaño del fragmento que va a ser amplificado. La temperatura de unión depende de la longitud y secuencia de los oligonucleótidos. Finalmente, el tercer paso consiste en la síntesis de las nuevas cadenas de ADN llevada a cabo por la Taq polimerasa a 72°C.

El ciclo de desnaturalización, unión y síntesis del ADN es repetido varias veces y los productos generados en un ciclo de amplificación sirven como moldes de ADN para las siguientes amplificaciones. De esta manera, en cada ciclo se duplica la cantidad de ADN amplificado y el principal producto de la reacción exponencial es un fragmento de ADN de doble cadena, que en el extremo 5' tiene incorporados a los oligonucleótidos y su longitud está definida por la distancia entre ambos iniciadores.

Los productos amplificados son analizados en electroforesis utilizando un gel de agarosa o de poliacrilamida, posteriormente el gel es teñido con una solución de bromuro de etidio y las bandas de amplificación se observan bajo luz ultravioleta.



Amplificación de un fragmento de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Cabe mencionar que fragmentos más largos de ADN son generados durante la reacción, ya que los productos que se generan en los primeros ciclos son moléculas de ADN de tamaño heterogéneo, donde la longitud excede la distancia entre los sitios de unión de los iniciadores. En el segundo ciclo, las moléculas de ADN de tamaño bien definido se acumularán en forma exponencial en los siguientes ciclos y serán los principales productos de la reacción. Aunque los fragmentos largos continúan siendo producidos del molde original en cada ciclo, estos se acumulan solamente en proporción lineal y no contribuyen de manera significativa a la cantidad de la secuencia amplificada.

El protocolo original de la técnica de amplificación utilizaba la enzima DNA polimerasa I de *E. coli* denominada también fragmento de Klenow para catalizar la síntesis del ADN. El inconveniente del uso de esta enzima es que se inactiva a la temperatura de desnaturalización del ADN, de manera que en cada ciclo de síntesis se requería la adición de enzima fresca. Estas reacciones funcionaron adecuadamente con la amplificación de los fragmentos pequeños de ADN (menores de 200 pb) y no así para los fragmentos grandes. Generalmente, el desarrollo fue pobre y los productos fueron heterogéneos en tamaño. Estos problemas fueron resueltos con la introducción de una DNA polimerasa termoestable purificada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. Esta enzima puede soportar incubaciones prolongadas a 95°C y no es inactivada por la temperatura, por lo tanto, no necesita ser reemplazada en cada ciclo.

Ventajas de PCR sobre otras técnicas.

Para el diagnóstico de la tuberculosis la técnica de PCR ha mostrado ventajas sobre las técnicas ya existentes, tales como el cultivo, la tinción, el desarrollo en medio líquido selectivo Bactec y la hibridación.

Sobre todas ellas tiene la ventaja de detectar el material genético de 1 a 100 bacterias en muestras clínicas, mientras que la tinción requiere de la presencia de 5,000-10,000 bacterias/ml de muestra, la hibridación de 100,000 bacterias provenientes estrictamente de cultivos puros y el cultivo requiere de una gran carga bacteriana con buena viabilidad.

El PCR puede determinar la presencia del material genético aún de las bacterias muertas, mientras que el cultivo, la tinción, el Bactec y la hibridación requieren que las bacterias se encuentren vivas.

El resultado por tinción e hibridación se obtienen en unas cuantas horas, por PCR se tiene en un lapso de 1-2 días, por Bactec en 7-14 días y por cultivo en un periodo de 3-6 semanas. Sin embargo, la tinción no nos permite diferenciar a *M. tuberculosis* de las otras especies, mientras que la hibridación requiere de cultivos puros, ya que cuando se analizan directamente las muestras la sensibilidad disminuye.

La sensibilidad y especificidad del PCR es de 90-100% en muestras clínicas, la hibridación ha mostrado una sensibilidad y especificidad cercana al 100% en cultivos puros, mientras que la tinción y el cultivo muestran una alta sensibilidad (75%) en la TB pulmonar.

Aplicación de PCR en la tuberculosis.

Con respecto a la tuberculosis, hasta a la fecha hay una serie de trabajos publicados en los que se ha amplificado por PCR diferentes fragmentos de diferentes genes de *M. tuberculosis*.

Uno de los genes utilizados para la amplificación del ADN es el que codifica para la proteína de 65-kDa, la cual, está presente en todas las micobacterias y ha sido ampliamente estudiada como un antígeno de *M. leprae*. Este antígeno ha sido designado como el antígeno de 65-K o como la proteína de pared celular a (CWP-a) y su secuencia nucleotídica ha sido deducida en base a la secuencia de aminoácidos (28). Se trata de una proteína de choque térmico que comparte algunas características con el antígeno común de *P. aeruginosa* y con la proteína GroEL de *E. coli* (29, 30).

En 1989 Hance y cols. llevaron a cabo la amplificación de un fragmento de 383 pb del gen de la proteína de 65-kDa en *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. paratuberculosis* y *M. fortuitum*, sin embargo, solamente con el uso de sondas especie-específica marcadas con ³²P lograron hacer la diferenciación de las diferentes especies de micobacterias. Ellos mezclaron células mononucleares de sangre periférica con cantidades conocidas de *M. tuberculosis* y haciendo diluciones seriadas de la suspensión demostraron que la

amplificación del ADN permitía detectar menos de 100 micobacterias, demostrando así que la técnica podía ser utilizada con fines de diagnóstico (31).

Brisson-Noel y cols. amplificaron el mismo fragmento y llevaron a cabo la hibridación en 35 muestras (esputo, aspirado gástrico, aspirado de absceso y biopsia de nódulo linfoide) de 34 pacientes con sospecha de tuberculosis. *M. tuberculosis* fue detectado en 15 muestras, donde en 2 de ellas el cultivo y la tinción fueron negativos. 20 muestras fueron negativas por PCR al igual que por cultivo y tinción. Al comparar los resultados de PCR con el cultivo y la tinción mostraron que la técnica de PCR tiene mejor sensibilidad que los métodos tradicionales (32).

Pao y cols. amplificaron un fragmento de 165 pb del mismo gen, el cual, les permitió diferenciar a *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG de las otras especies de micobacterias. Al analizar muestras de esputo y líquido pleural la sensibilidad que obtuvieron fue de 100% y una especificidad de 62.6% con respecto al cultivo (33), mientras que Popper y cols. analizaron muestras de tejido incluido en parafina de pacientes con tuberculosis y en todas las muestras la amplificación fue positiva teniendo mejor sensibilidad que la tinción (34).

Sjobring y cols. amplificaron un fragmento de 419 pb del gen que codifica a la proteína de 38kDa también conocida como el antígeno proteico b (Pab) (35) que se caracteriza por ser específica del complejo *M. tuberculosis* (30). La amplificación la llevaron a cabo utilizando 30 moldes de ADN de diferentes especies de micobacterias, 4 de neiserias, 2 de estafilococos, 2 de estreptococos, ADN de leucocitos humanos y demostraron que la amplificación es específica con el ADN de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG. Sus resultados indicaron que pueden detectar el ADN de menos de 10 bacterias. Analizaron algunas muestras de esputo, lavado bronquial y lavado gástrico obteniendo buenos resultados (36).

Por otra parte, Yuen y cols. amplificaron un fragmento de 239 pb de este mismo gen, analizando inicialmente la especificidad de la amplificación utilizando 31 cepas de *M. tuberculosis*, 15 especies de micobacterias atípicas y algunas bacterias del tracto respiratorio. La amplificación se llevó a cabo solamente con el ADN de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*. Posteriormente, analizaron 519 muestras de esputo de 85 pacientes; 51 pacientes con lesiones radiológicas sugestivas de tuberculosis y 34 con enfermedad

obstructiva crónica de vías aéreas. Para los 51 pacientes el diagnóstico de tuberculosis pulmonar fue confirmado por cultivo y por PCR solamente en 41 de ellos; 5 pacientes tratados antes de la admisión fueron positivos solamente por PCR, mientras que todos los pacientes del grupo control fueron negativos por PCR. Además, en este estudio observaron que el PCR siguió siendo positivo después de 4 semanas con tratamiento anti-tuberculoso en 29 pacientes, de los cuales, 16 ya tenían cultivo negativo (37).

Otra de las proteínas cuyo gen ha sido utilizado para amplificar es la proteína MPB64 que constituye una de las principales proteínas de secreción con peso molecular de 23kDa aislada de *M. bovis* BCG y específica del complejo *M. tuberculosis*, cuyo gen codificante se encuentra solamente una copia dentro del cromosoma de la micobacteria (30, 38, 39).

En un trabajo previo Shankar y cols. amplificaron un fragmento de 240 pb utilizando varios moldes de ADN y la amplificación del fragmento se llevó a cabo específicamente con las micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. Además analizaron 23 muestras por PCR (esputo, LCR y orina) obteniendo buenos resultados comparados con el cultivo y la tinción (40).

Posteriormente, amplificaron este fragmento en muestras de líquido cefalorraquídeo para evaluar la utilidad de PCR en el diagnóstico de la tuberculosis meningea (TBM). Sus resultados mostraron que el PCR tiene mejor sensibilidad que el cultivo y la técnica de ELISA, ya que detecta el 75% de los casos de muy probable TBM, el 57% de los probables casos de TBM y el 43% de los posibles casos. Mientras que la técnica de ELISA detecta el 55% de los casos de muy probable TBM y el 28% para los probables y posibles casos de TBM; mientras que el cultivo solamente detecta el 20% de los casos de muy probable TBM (41).

Por otra parte, Manjunath y cols. analizaron diferentes tipos de muestras (esputo, líquidos pleurales, líquidos pericárdicos, orina, biopsias de endometrio, nódulos linfoides) y la técnica de PCR mostró tener mejor sensibilidad que el cultivo y la tinción (42).

En 1988 Eisenach y cols. identificaron de 10 a 16 secuencias repetitivas en el cromosoma de *M. tuberculosis* (43) y posteriormente Thierry y cols. determinaron la secuencia de nucleótidos de la Secuencia de Inserción 6110 (IS6110) (*Insertion Sequence 6110*) (44).

Esta secuencia de inserción (IS6110) es específica del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*) y se caracteriza por ser un elemento genético móvil que generalmente se encuentra de 10 a 20 copias en el cromosoma de *M. tuberculosis* y de 1 a 5 copias en *M. bovis*. La especificidad y la naturaleza repetitiva de IS6110 la han hecho ideal para llevar a cabo la amplificación por PCR con fines diagnósticos ya que permite incrementar la sensibilidad. Posee una longitud de 1361 pb con tres sitios de restricción para las endonucleasas Pvu II, Sal I y Bam HI (10).

En 1990 Eisenach y cols. amplificaron un fragmento de 123 pb de IS6110 y demostraron la especificidad de la amplificación al utilizar moldes de ADN de diferentes micobacterias en donde la amplificación únicamente se llevó a cabo con el ADN de las micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, además el límite de detección por PCR fue de 1 fg de ADN que corresponde a una copia del cromosoma de *M. tuberculosis* (aproximadamente 3000 Kb) (45).

Posteriormente amplificaron el mismo fragmento en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis pulmonar y la amplificación proporcionó buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico (46).

La amplificación se ha llevado a cabo en muestras de líquido pericárdico para el diagnóstico de pericarditis tuberculosa (47) y en sangre de pacientes con tuberculosis pulmonar donde se obtuvo una sensibilidad y especificidad de 100% (48).

Considerando las características de los elementos genéticos discutidos anteriormente como son el gen que codifica para la proteína MBP64 y la secuencia IS6110, hemos llevado a cabo un estudio retrospectivo para evaluar la utilidad de cada uno de ellos para respaldar el diagnóstico de algunas formas de la tuberculosis.

En el presente trabajo hemos amplificado el fragmento de ADN de 240pb localizado en la región (460-700) del gen que codifica para la proteína MPB64 y el fragmento de ADN de 123pb localizado en la región (759-881) de IS6110.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La tuberculosis es una enfermedad que constituye un problema de salud pública a nivel mundial ya que se ha estimado que una tercera parte de la población mundial ha sido infectada por *M. tuberculosis* y se encuentra en riesgo de desarrollar la enfermedad.

Existen factores que han contribuido de manera importante al resurgimiento de la enfermedad como son la pandemia por el VIH y la aparición de cepas multirresistentes a drogas antituberculosas lo que ha provocado el fracaso de los programas de control, cuyo principal objetivo es detener la transmisión entre la población mediante un diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado de los pacientes con tuberculosis pulmonar.

El diagnóstico de la enfermedad es establecido mediante técnicas tradicionales como es el cultivo y la tinción, sin embargo, proporcionan baja sensibilidad y especificidad. Esto ha encaminado a la búsqueda de nuevas metodologías que proporcionen mejores resultados, además de requerir menor tiempo para establecer el diagnóstico. Considerando la importancia de establecer un diagnóstico rápido y oportuno de la tuberculosis es para los grupos de investigación un gran reto el desarrollar métodos de diagnóstico rápidos y altamente sensibles y específicos

Una nueva alternativa la constituye la Reacción en Cadena de Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*) (PCR) ya que permite detectar un bajo número de micobacterias (1 a 10) mediante la amplificación de una secuencia específica del material genético de *M. tuberculosis*.

3. OBJETIVOS.

1. Amplificar por PCR un fragmento de ADN de 240 pb localizado en la región 460-700 del gen que codifica a la proteína MPB64 específica del complejo *M. tuberculosis*.
2. Amplificar por PCR un fragmento de ADN de 123 pb localizado en la región 759-881 de la Secuencia de Inserción IS6110 específica del complejo *M. tuberculosis*.
3. Llevar a cabo el análisis de especificidad de amplificación para ambos fragmentos (240 pb y 123 pb) utilizando diferentes moldes de ADN, así como también analizar la sensibilidad de PCR para determinar la mínima cantidad de ADN de *M. tuberculosis* que es posible detectar.
4. Evaluar la utilidad de PCR para respaldar el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, pleural y meníngea.

4. MATERIALES Y METODOS.

4.1. Muestras clínicas.

En el presente trabajo se hizo la evaluación de la técnica de PCR mediante el análisis de dos tipos de muestras clínicas.

- 1) Tejido incluido en parafina.
- 2) Líquido cefalorraquídeo.

4.1.1. Tejido incluido en parafina.

Se obtuvieron 40 muestras del laboratorio de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias comprendidas en el periodo de 1987-1989, las cuales, fueron clasificadas en cuatro grupos en base a datos de laboratorio y hallazgos clínicos.

Grupo I. Tuberculosis pulmonar. En este grupo se incluyeron 8 biopsias de pulmón con granulomas y con cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

Grupo II. Probable tuberculosis pulmonar. En este grupo se incluyeron 17 biopsias de pulmón con granulomas, BAAR negativo, no se realizó el cultivo; sin embargo, los hallazgos clínicos y radiológicos apoyaron el diagnóstico de la tuberculosis.

Grupo III. Tuberculosis pleural. En este grupo se incluyeron 5 biopsias pleurales con granulomas y con cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

Grupo IV. Control. Este grupo comprende 10 biopsias de pulmón y otros tejidos con granulomas producidos por micobacterias atípicas o por otros microorganismos como Histoplasma, Coccidioides, Brucella, Paracoccidioides.

4.1.2. Líquido cefalorraquídeo.

Las 70 muestras de líquido cefalorraquídeo fueron proporcionadas por el Dr. Julio Sotelo Jefe del Departamento de Inmunoneurología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Estas le fueron tomadas a los pacientes y se almacenaron a -20°C hasta ser procesadas para PCR. Se clasificaron en tres grupos de acuerdo a los datos de laboratorio y hallazgos clínicos.

Grupo I. Tuberculosis meníngea. Constituido por 8 muestras de líquido cefalorraquídeo con cultivo positivo a *M. tuberculosis* y / o BAAR positivo.

Grupo II. Probable tuberculosis meníngea. Constituido por 13 muestras de líquido cefalorraquídeo con cultivo a *M. tuberculosis* y BAAR negativos; ningún otro patógeno fue aislado por cultivo, sin embargo, el cuadro clínico y la respuesta al tratamiento con antifímicos apoyaron el diagnóstico.

Grupo III. Control. En este grupo se incluyeron 49 muestras de pacientes con enfermedades neurológicas diferentes a tuberculosis meníngea. Se incluyeron muestras de pacientes con enfermedades neurológicas infecciosas como: neurocisticercosis, encefalitis viral, coccidioidomicosis, meningitis bacteriana, criptococosis. Y enfermedades no infecciosas como: esclerosis múltiple, enfermedad cerebrovascular isquémica, tumor cerebral, parálisis facial, radiculopatía, enfermedad de Alzheimer, neuritis retrobulbar, Síndrome de Parkinson, Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, adenoma pituitario, esclerosis amiotrófica cerebral, neurofibromatosis, atrofia óptica lateral, mielopatía, Síndrome de Wallenberg, Síndrome depresivo mayor, cefalea tensional y epilepsia.

4.2. Otro material biológico.

4.2.1. Oligonucleótidos o iniciadores.

Los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo para llevar a cabo la amplificación del fragmento de ADN de 240 pb del gen de la proteína MPB64 y el fragmento de ADN de 123 pb de la secuencia IS6110 fueron sintetizados en el Laboratorio de Síntesis de Oligonucleótidos de la Universidad de Columbia Británica en Vancouver, Canadá.

Las secuencias utilizadas son las que se describen a continuación 5' -TCC GCT GCC AGT CGT CTT CC-3' y 5' - GTC CTC GCG AGT CTA GGC CA-3' para el fragmento de 240 pb (Shankar P., Lancet: 1990); 5' -CCT GCG ACG GTA GGC GTC GG-3' y 5'- CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3' para el fragmento de 123 pb (Eisenach K., J Infect Dis : 1990)

4.2.2. Bacterias.

El ADN de *M. tuberculosis* (ATCC # 103C) fue gentilmente proporcionado por el Dr. Manuel Altamirano-Dimas, Jefe del Departamento de Microbiología del Heather Pavillion Hospital en Vancouver, Canadá. En este proyecto se utilizó para estandarizar las condiciones de amplificación del ADN, así como también para ser utilizado como control positivo de amplificación para cada uno de los experimentos.

M. tuberculosis H37Rv es la cepa virulenta con que cuenta el Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y se creció en el medio Lowenstein-Jensen.

M. tuberculosis H37Ra es una cepa con la que ahora cuenta el Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, y se crece en medio de cultivo 7H9. Originalmente fue proporcionada por la Universidad de Case Western Reserve, Clevelan, Ohio.

M. bovis, *M. avium*, *M. avium-intracellulare*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum* y *M. kansasii* crecidas en medio Lowenstein-Jensen fueron proporcionadas por el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

El ADN de *M. bovis* aislado de un paciente con tuberculosis fue proporcionado por el Departamento de Parasitología y Microbiología de la Facultad de Medicina, UNAM.

M. bovis BCG crecido en medio Lowestein-Jensen fue proporcionado por Departamento de Micobacterias del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE).

N. asteroides y *N. brasiliensis* también fueron donadas por el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

El ADN de *E.coli* cepa BH101 fue extraído en el Departamento de Inmunogenética del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica de la Secretaría de Salud.

4.2.3. Linfocitos.

El ADN de linfocitos de sangre periférica se obtuvo siguiendo la metodología proporcionada por el Departamento de Inmunogenética del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE) de la Secretaría de Salud.

4.3. Procedimientos de extracción de ADN.

4.3.1. Micobacterias. Inicialmente las micobacterias se crecieron en medio Lowenstein-Jensen y utilizando un hisopo estéril se transfirió una pequeña cantidad de masa bacteriana a un tubo eppendorf de 1.2 ml resuspendiéndola en 320 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8.0). Se agregaron 50 µl de lisozima al 3.3% y las muestras fueron incubadas durante 1 hr a 37°C; posteriormente se les agregaron 30 µl de SDS al 20% incubándola 1 hr a 65°C. Finalizado este paso se agregaron 100 µl de perclorato de sodio 5M mezclando y dejando a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se les agregó 500 µl de la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El tubo de la reacción fue sometido a agitación durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min y la fase acuosa se transfirió a otro tubo y el ADN se precipitó con 50 µl de acetato de sodio (3 M, pH=5.2) y 700 µl de etanol absoluto frío. Para favorecer la precipitación del ADN las muestras se incubaron a -20°C (15-30 min). Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min y posteriormente el ADN se lavó con 700 µl de etanol frío al 75% y se dejó secar por evaporación. Finalmente se resuspendió en agua destilada estéril y se conservó a -20°C hasta ser utilizado para la amplificación por PCR.

4.3.2. *E. coli* BH101. La bacteria se sembró en el medio líquido LB y se incubó toda la noche a 37°C con agitación, se distribuyó el medio en tubos de 13 ml y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. El paquete bacteriano se resuspendió en 10 ml de solución salina-citratos y se distribuyó en 20 tubos de 1.2 ml agregando 500 µl en cada uno y se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min. Se eliminó el sobrenadante y el paquete bacteriano se resuspendió en 250 µl de solución de lisis 2X (glucosa 100 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 50 mM, pH= 8.0) conteniendo lisozima a una concentración final de 8 mg/ml y 10 µl de NaCl a una concentración final de 0.15 M, se mezcló y se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó un volumen equivalente de fenol saturado (Gibco) y se mezcló para posteriormente centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. La fase acuosa se recuperó en otro tubo y el ADN se precipitó con NaCl e isopropanol; con la ayuda de una pipeta se recuperó el ADN y se lavó con etanol frío al 70%. Se dejó secar y se resuspendió en TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8.0) y se guardó a -20°C.

4.3.3. Linfocitos humanos de sangre periférica. Se tomaron 25 ml de sangre periférica con 3 ml de EDTA al 5%(pH= 7.3) como anticoagulante y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4°C. Con una pipeta Pasteur se tomó la capa de leucocitos localizada sobre los eritrocitos recuperándolos en otro tubo y se les agregó 20 ml de solución para lisis de eritrocitos (MgCl₂ 5 mM, NaCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH= 7.6), se mezcló y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el paquete de leucocitos fue tratado con 1 ml de solución de lisis para glóbulos blancos conteniendo proteinasa K a una concentración de 200 µg/ml y se incubó toda la noche a 55°C. Se procedió a extraer el ADN dos veces con 1ml de fenol saturado (Gibco) centrifugando a 3000 rpm durante 10 min a 4°C, posteriormente se hizo otra extracción con 1 ml de la mezcla fenol-cloroforno-alcohol isoamílico (25: 24: 1). Se recuperó la fase acuosa y se le agregó NaCl a una concentración final de 100 mM y 1 ml de isopropanol frío, se mezcló y se dejó durante 10 min a -20°C. El ADN se recuperó con una pipeta Pasteur y se lavó con etanol frío al 75%, se dejó secar y finalmente se resuspendió en agua destilada estéril y se mantuvo a -20°C hasta ser utilizado en PCR.

4.3.4. Tejido incluido en parafina. Se hicieron cortes de 10 μm de espesor de las muestras de tejido incluido en parafina y se colocaron dentro de un tubo eppendorf de 1.2 ml y se procedió a eliminar la parafina.

a) Desparafinación. Se agregaron 700 μl de xilol (Merck) y la muestra se dejó incubando en baño de agua a 55°C por 15 min; al finalizar este paso la muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 3 min y el sobrenadante fue eliminado (este paso se repitió nuevamente). Posteriormente el tejido se lavó dos veces con 700 μl de etanol absoluto y se dejó secar por evaporación.

b) Extracción. El tejido desparafinado se resuspendió en 320 μl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8.0) y se le agregaron 50 μl de lisozima al 3.3 % y se incubó durante 1 hr a 37°C. Posteriormente, se le agregaron 30 μl de SDS al 20 % y se incubó 1 hr a 65°C. Se le agregaron 100 μl de la solución de lisis conteniendo Proteinasa K a una concentración de 2 mg/ml y se dejó toda la noche a 56°C. Al día siguiente la muestra fue tratada con 100 μl de perclorato de sodio 5M dejando 10 min a temperatura ambiente y se hizo una extracción con 600 μl de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) centrifugando a 14000 rpm durante 15 min. La fase acuosa se recuperó y transfirió a otro tubo y el ADN fue precipitado con 60 μl de acetato de sodio (3 M, pH=5.2) y 700 μl de etanol absoluto frío. Para favorecer la precipitación del ADN la muestra se mantuvo a -20°C por 15-30 min y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 15 min. El etanol fue eliminado cuidadosamente y se agregaron 700 μl de etanol frío al 75% para lavar el precipitado. El ADN se dejó secar y se resuspendió en agua destilada estéril conservándolo a -20°C hasta ser utilizado para la amplificación por PCR.

4.3.5. Líquido cefalorraquídeo. Las muestras de líquido cefalorraquídeo fueron centrifugadas durante 5 min a 14000 rpm y el precipitado se utilizó para llevar a cabo la extracción de ADN siguiendo el procedimiento aplicado a las muestras de tejido descrito en 4.3.4. (inciso b) .

4.4. Concentración óptima de MgCl₂ en la amplificación del ADN.

Para iniciar la amplificación del fragmento de ADN de 240 pb del gen que codifica a la proteína MPB64, el primer paso fue establecer la concentración óptima de MgCl₂ en la mezcla de reacción. Para determinarla preparamos siete soluciones de reacción 10X con las siguientes concentraciones de MgCl₂: 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM y sin MgCl₂. La amplificación del fragmento se llevó a cabo manteniendo constantes los siguientes parámetros: 100 pg de ADN de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* (ATCC # 103C), 100 ng de cada uno de los iniciadores, 5 µl de solución de amplificación 10X y 1.0 unidad de Taq polimerasa (Gibco). El volumen final de cada reacción fue de 50 µl.

4.5. Concentración óptima de los iniciadores.

Una vez determinada la concentración de MgCl₂ procedimos a establecer la concentración óptima de los iniciadores y para esto, llevamos a cabo la amplificación del fragmento de 240 pb manteniendo constantes: 100 pg de ADN de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* (ATCC # 103C), 5 µl de solución de reacción 10X y 1.0 unidad de Taq polimerasa. Los iniciadores fueron agregados a las siguientes concentraciones: 20 ng, 40 ng, 60 ng, 80 ng, 100 ng, 150 ng y 200 ng. Mientras que para la amplificación del fragmento de 123 pb se utilizaron: 20 ng, 40 ng, 60 ng, 80 ng y 100 ng.

4.6. Especificidad de la amplificación.

Para analizar la especificidad de amplificación para los fragmentos de 240 pb y 123 pb se llevó a cabo un experimento en el que se utilizaron diferentes moldes de ADN. En este se incluyó el ADN de 8 micobacterias (*M. tuberculosis* ATCC #103C, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis*, *M. avium*, *M. avium-Intracellulare*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*), 2 nocardias (*N. asteroides*, *N. brasiliensis*) y *E. coli* BH101. Además se incluyó el ADN de linfocitos humanos de sangre periférica teniendo como objetivo constituir un control, ya que se debe asegurar que la amplificación no se lleve a cabo con el ADN del huésped. Para la amplificación del fragmento de 240 pb se utilizaron 100 pg de cada uno de los ADNs, mientras que para el fragmento de 123 pb se utilizaron 20 pg.

4.7. Sensibilidad de la amplificación.

Para analizar la sensibilidad de amplificación se utilizó como molde diferentes cantidades del ADN de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* (ATCC # 103C). Para el análisis de la sensibilidad de amplificación del fragmento de 240 pb se utilizaron 100, 80, 60, 40, 20, 10, 0.5 y 0.1 pg, mientras que para el fragmento de 123 pb se utilizaron 1.0, 0.5, 0.1 y 0.01 pg. Cabe mencionar que inicialmente se utilizaron las mismas cantidades de ADN para amplificar ambos fragmentos; sin embargo, para el fragmento de 123 pb se hicieron más diluciones ya que no se advertía correlación entre la intensidad de la amplificación y la concentración. Al hacer las diluciones observamos que puede amplificar bajas cantidades de ADN.

4.8. Preparación de las muestras para la amplificación de ADN por PCR.

En un tubo de 0.6 ml se agregaron los siguientes reactivos para amplificar el fragmento de 240 pb.

<u>Componentes</u>	<u>Volumen</u>	<u>Concentración final</u>
1) Agua destilada estéril	16 μ l	—
2) Solución de reacción 10 X (MgCl ₂ 25 mM)	5 μ l	1X (MgCl ₂ 2.5 mM)
3) Mezcla de dNTPs 1.25 mM	8 μ l	0.2 mM cada uno
4) Iniciador B1 (20 ng/ μ l)	5 μ l	2 ng
5) Iniciador B2 (20 ng/ μ l)	5 μ l	2 ng
6) ADN de las muestras	10 μ l	—
7) Taq polimerasa (1unidad/ μ l)	1 μ l	0.02 unidades

Volumen final de la reacción = 50 μ l

Para la amplificación del fragmento de 123 pb se agregaron 20 μ l de agua y 3 μ l de cada uno de los iniciadores (B3 y B4) a una concentración de 20 ng/ μ l.

Cabe mencionar que antes de agregar la enzima, la mezcla de reacción conteniendo el ADN fue cubierta con una gota de aceite mineral (Sigma) y se incubó a 95°C durante 5 min. Finalmente se amplificó el ADN en un DNA Thermal Cycler 480 Perkin Elmer Cetus.

Control negativo. En cada uno de los experimentos se incluyó un control negativo de la amplificación que tiene todos los componentes de la reacción excepto el ADN de *M. tuberculosis* cuyo volumen se sustituyó con agua. Con este control podemos evaluar las contaminaciones.

Control positivo. También se incluyó un control positivo que contiene una cantidad conocida de ADN de *M. tuberculosis* de la cepa de referencia ATCC # 103C.

4.9. Amplificación del fragmento de 240 pb de MPB64.

Para amplificar el fragmento de 240 pb del gen que codifica para la proteína MPB64 específica del complejo *M. tuberculosis* se utilizaron iniciadores con una longitud de 20 nucleótidos y con las siguientes secuencias (40):

5'- TCC GCT GCC AGT CGT CTT CC -3'

5'- GTC CTC GCG AGT CTA GGC CA -3'

(Shankar P., Lancet: 1990)

Condiciones estandarizadas. En la mezcla de reacción se utilizó 2.5 mM de MgCl₂, 100 ng de cada uno de los iniciadores y 1.0 unidad de Taq polimerasa por reacción. En cada experimento se incluyó un control positivo constituido por 100 pg de ADN de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* (ATCC # 103C). La amplificación se llevó a cabo durante 37 ciclos; cada uno de ellos con: 2 min a 95°C; 2 min a 50°C y 2 min a 72°C. En el último ciclo la síntesis fue prolongada por 8 min.

4.10. Amplificación del fragmento de 123 pb de IS6110.

Para el fragmento de ADN de 123 pb de la Secuencia de Inserción IS6110 específica del complejo *M. tuberculosis* se utilizaron las siguientes secuencias de iniciadores con una longitud de 20 nucleótidos (45):

5'- CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG -3'

5'- CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG -3'

(Eisenach K., J Inf Dis:1990)

Condiciones estandarizadas. Se utilizó 2.5 mM de MgCl₂; 60 ng de cada uno de los iniciadores y 1.0 unidad de Taq polimerasa por reacción. En cada experimento se incluyó un control positivo constituido por 1 pg de ADN de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* (ATCC # 103C). La amplificación se llevó a cabo durante 47 ciclos; cada uno de ellos con: 2 min a 72°C; 2 min a 68°C y 2 min a 72°C con extensión de 2 seg por ciclo. En el último ciclo la síntesis fue prolongada por 8 min.

Cabe mencionar que para establecer las condiciones óptimas de trabajo previamente se hicieron experimentos de titulación para cada uno de los sistemas de amplificación.

4.11. Análisis electroforético de ADN.

4.11.1. ADN Cromosomal. EL ADN de las bacterias y de los linfocitos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (Biorad) al 0.8% en solución amortiguadora TBE (Tris 89 mM, Acido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH=8.3). Se mezclaron 5 µl de la muestra de ADN con 3 µl de la solución de corrida y se aplicaron en cada uno de los carriles del gel; se incluyeron marcadores de alto peso molecular con un rango de 9-48 Kb (Gibco) y la electroforesis se llevó a cabo durante 1.5 hr a 70 volts. Posteriormente, el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/ml durante 5-10 min y las bandas fueron visualizadas bajo luz UV en un transiluminador (Hoefer) y se tomó una fotografía del gel.

4.11.2. Productos Amplificados por PCR. Los productos de ADN amplificados por PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (Biorad) al 2% en TBE. Se tomaron 20 µl del producto de PCR y se mezclaron con 5 µl de solución de corrida y se realizó la electroforesis durante 1.5 hr a 70 volts. En cada electroforesis se incluyó el marcador de peso molecular 123 pb DNA Ladder (Gibco) con un rango de 123 a 4,182 pb en incrementos de 123 pb. El gel fue teñido con la solución de bromuro de etidio durante 5-10 min y las bandas fueron visualizadas bajo luz UV y se tomó la fotografía.

4.12. Marcaje del fragmento de 123 pb con digoxigenina por PCR.

Para los experimentos de hibridación se utilizó una sonda sintetizada y marcada en nuestro laboratorio con los reactivos de Boehringer. La sonda fue sintetizada por PCR bajo las mismas condiciones de amplificación del fragmento de 123 pb, radicando la diferencia en la mezcla de dNTP's utilizada. Para el procedimiento de marcaje se utilizó la mezcla de dNTP's comercial (Boehringer) que contiene: 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM Dig-11-dUTP. Las características de la mezcla permitieron obtener una sonda marcada con digoxigenina y la eficiencia del marcaje se evaluó de dos formas. Una de ellas fue por análisis en electroforesis del producto marcado en gel de agarosa al 2% y la otra haciendo diluciones seriadas del producto marcado y adicionando 1 µl de cada dilución sobre la membrana de nylon para posteriormente llevar a cabo la inmunodetección.

4.13. Transferencia neutra.

Una vez llevada a cabo la electroforesis de los productos amplificados, el gel fue tratado durante 45 min con una solución de NaCl 1.5 M-NaOH 0.5 M para desnaturalizar el ADN y posteriormente neutralizarlo por 30 min con una solución de NaCl 1.5 M- Tris 1 M, pH=7.4. La transferencia de ADN a la membrana de nylon (Boehringer) se llevó a cabo durante al menos 6 hrs en condiciones neutras con solución SSC 10X (NaCl 3 M, Citrato de sodio 0.3 M, pH=7.0) utilizando el sistema de transferencia por capilaridad (51). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con solución SSC 6X durante 5 min y se dejó secar a temperatura ambiente; posteriormente se expuso a la luz UV durante 3 min para favorecer la unión del ADN a la membrana de nylon.

4.14. Hibridación.

La membrana de nylon fue prehibridizada en una bolsa de plástico con la solución de hibridación (5X SSC, 0.1% N-laurilsarcosine, 0.02% SDS, 1% reactivo para bloquear) durante 2 hrs a 68°C; finalizado este paso la solución se eliminó y se agregó la solución de hibridación conteniendo el fragmento de 123 pb marcado con digoxigenina previamente

desnaturalizado (5 min a 100°C seguido por 1 min en hielo) a una dilución 1:200. La bolsa fue sellada perfectamente y sometida a incubación toda la noche a 68°C; al día siguiente la solución se recuperó en un tubo y la membrana se sometió a los siguientes lavados: 2 x 5 min a temperatura ambiente con 50 ml de: (2X SSC; 0.1% SDS) y 2 x 15 min a 68°C con 50 ml de: (0.1X SSC; 0.1% SDS). Finalmente se llevó a cabo la inmunodetección.

4.15. Inmunodetección.

La membrana de nylon se lavó 1 min con la solución 1 (ácido maleico 0.1M, NaCl 0.15M, pH=7.5) y posteriormente se incubó por 30 min con la solución para bloquear y una vez finalizado este paso la membrana fue lavada. Se preparó una dilución 1:5000 del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina y la membrana fue incubada con 20 ml de la dilución durante 30 min a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente, para eliminar el exceso del anticuerpo la membrana se lavó 2 x 15 min con 100 ml de solución 1. La membrana se equilibró con 20 ml de solución 2 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH=9.5) durante 3 min y finalmente fue incubada con 10 ml de sustrato preparado con: 45 µl de azul de tetrazolio; 35 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y 10 ml de solución 2. La reacción se llevó a cabo en la oscuridad y se dejó el tiempo suficiente para el desarrollo de color. Finalmente la reacción fue detenida con 50 ml de la solución 3 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8.0).

4.16. Sensibilidad y especificidad.

Ambos parámetros son características de las pruebas de diagnóstico y fueron calculados utilizando las siguientes fórmulas.

$$\% \text{Sensibilidad} = \frac{\text{Número de sujetos enfermos con resultado positivo}}{\text{Número total de sujetos enfermos}} \times 100$$

$$\% \text{Especificidad} = \frac{\text{Número de sujetos no enfermos con resultado negativo}}{\text{Número total de sujetos sin la enfermedad}} \times 100$$

4.17. Análisis estadístico.

Para evaluar la significancia estadística se utilizó el Cálculo de la P exacta de Fisher, y se compararon los grupos de pacientes con tuberculosis con respecto al grupo control.

5. RESULTADOS.

Análisis electroforético de los ADNs cromosómicos

El presente trabajo se inició con la extracción de ADN de cultivos puros de siete micobacterias (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis*, *M. avium*, *M. avium-intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii* y *M. gordonae*); dos nocardias (*N. asteroides* y *N. brasiliensis*); *E. coli* BH101 y de linfocitos humanos de sangre periférica; los cuales, fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En la figura 1 se muestra que el ADN cromosómico se encuentra presente y la diferente intensidad es debido a que se analizaron concentraciones variables de cada uno. Estos ADN posteriormente fueron utilizados como moldes para valorar la especificidad de amplificación para ambos fragmentos.

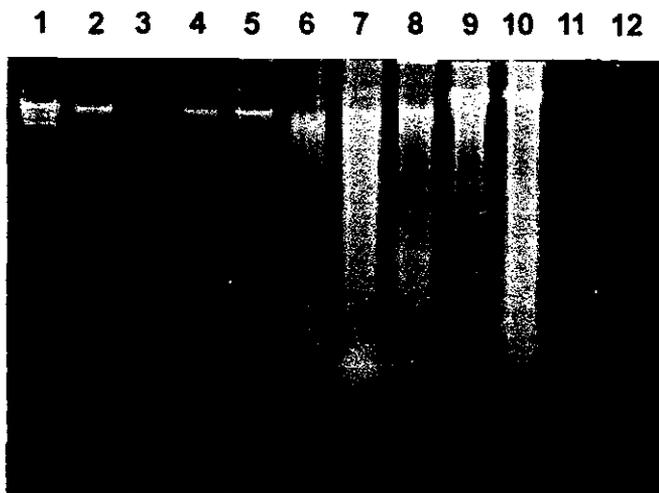


Figura 1

Análisis electroforético de los ADNs cromosómicos en gel de agarosa al 0.8%.

Líneas: 1.- MPM (9- 48Kb); 2.- *M. scrofulaceum*; 3.- *M. gordonae*; 4.- *M. avium*; 5.- *M. avium-intracellulare*; 6.- *M. kansasii*; 7.- *M. bovis*; 8.- *M. tuberculosis* H37Rv ; 9.- *E. coli* BH101; 10.- Linfocitos humanos; 11.- *N. asteroides*; 12.- *N. brasiliensis*.

Amplificación del fragmento de 240 pb de MPB64.

Se hicieron los experimentos de titulación para estandarizar las condiciones de amplificación como fueron: la concentración de $MgCl_2$, la concentración de los oligonucleótidos, el número de ciclos para la amplificación y la concentración de la Taq polimerasa por cada reacción. Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó como molde el ADN de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* ATCC # 103C y se procedió a evaluar la sensibilidad y especificidad de la amplificación.

Concentración óptima de $MgCl_2$

Para amplificar el fragmento de 240 pb se utilizó la solución de reacción 10X con diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y en la figura 2 se muestra que la amplificación se llevó a cabo solamente en presencia de $MgCl_2$ en un rango de 15 a 50 mM, no existiendo diferencia en la amplificación con respecto a la concentración de $MgCl_2$. De este hecho, se decidió trabajar con la concentración de 25 mM.

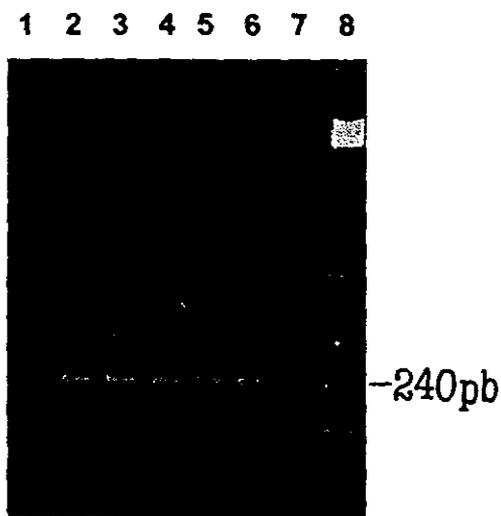


Figura 2

Concentración óptima de $MgCl_2$

La amplificación del fragmento de 240 pb se llevó a cabo utilizando 100 pg del ADN de *M. tuberculosis* (ATCC # 103C) ; manteniendo constantes los oligonucleótidos, la mezcla de dNTPs , la Taq polimerasa y variando la concentración de $MgCl_2$. Líneas: 1.- Sin $MgCl_2$, 2.- 15 mM, 3.- 20 mM, 4.- 25 mM, 5.- 30 mM, 6.- 40 mM, 7.- 50 mM, 8.- MPM (123- 4,182 pb).

Concentración óptima de los iniciadores.

La concentración óptima de los iniciadores se determinó analizando un rango de 20 a 200 ng de cada uno. En la figura 3 se muestra que la amplificación se llevó con todas las concentraciones experimentadas, pero la mejor amplificación se da cuando se utilizan 100 ng de cada uno por reacción.

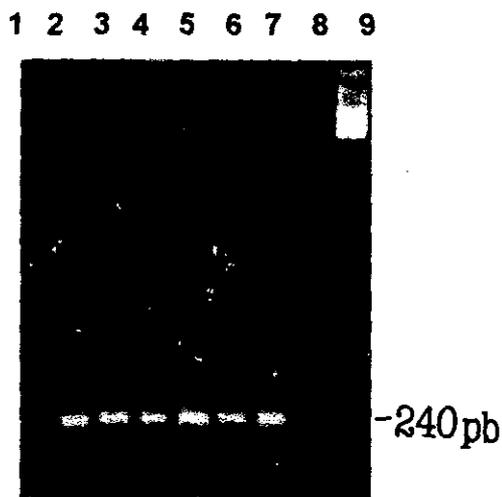


Figura 3

Concentración óptima de los iniciadores.

Se utilizó al ADN de *M. tuberculosis* (ATCC # 103C) y concentraciones constantes de dNTPs, MgCl₂ y Taq polimerasa. Se variaron las concentraciones de los iniciadores. Líneas: 1.- 20 ng, 2.- 40 ng, 3.- 60 ng, 4.- 80 ng, 5.- 100 ng, 6.- 150 ng, 7.- 200 ng, 8.- Control negativo de PCR y 9.- MPM (123 - 4,182 pb)

Sensibilidad de amplificación para el fragmento de 240 pb.

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos al llevar a cabo el análisis de sensibilidad de la amplificación del fragmento de 240 pb utilizando diferentes cantidades de ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* ATCC #103C y la amplificación del fragmento fue capaz de detectar hasta 0.5 pg de ADN de *M. tuberculosis*.

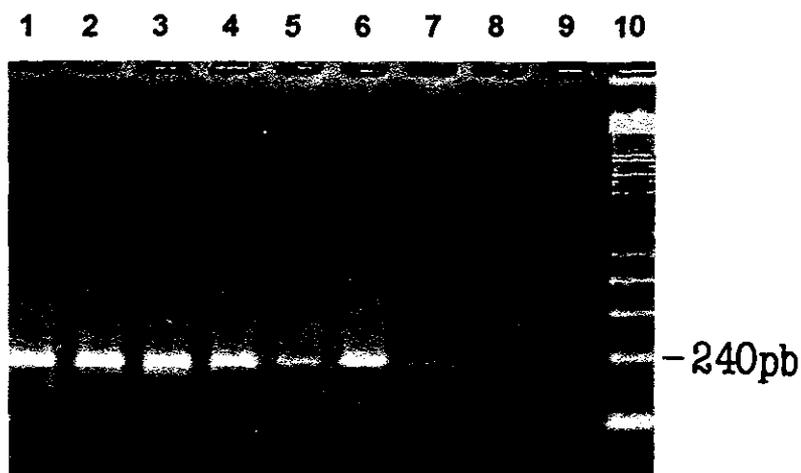


Figura 4

Sensibilidad de amplificación por PCR para el fragmento de 240 pb.

Se utilizaron diferentes cantidades de ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* ATCC # 103-C. Líneas: 1.- 100 pg; 2.- 80 pg; 3.- 60 pg; 4.- 40 pg; 5.- 20 pg; 6.- 10 pg; 7.- 0.5 pg; 8.- 0.1 pg; 9.- Control negativo de PCR; 10.- MPM (123 - 4,182 pb)

Especificidad de amplificación para el fragmento de 240pb.

Se procedió a analizar la especificidad de amplificación para este fragmento utilizando 100pg de 10 diferentes moldes de ADN (8 micobacterias, *E.coli* BH101 y el ADN de linfocitos humanos de sangre periférica) y en la figura 5 se observa que la amplificación se llevó a cabo específicamente con el ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y con *M. tuberculosis* ATCC #103-C, pero no así con *M. bovis*.

Para confirmar los resultados de la amplificación con el ADN de *M. bovis*, realizamos una nueva extracción de ADN de la misma cepa de *M. bovis*, además, conseguimos dos cepas de *M. bovis* de otros laboratorios y los sometimos a la amplificación incluyendo en este experimento el ADN de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra y *M. tuberculosis* ATCC #103C. En la figura 5A se puede observar que la amplificación se llevó a cabo con todos los ADN, sin embargo, con la cepa de referencia la amplificación se da en menor grado.

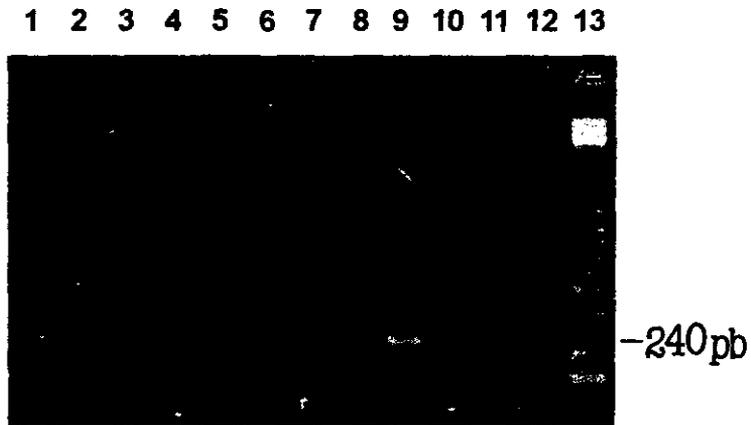


Figura 5

Especificidad de amplificación por PCR para el fragmento de 240pb.

100 pg de cada uno de los moldes de ADN fueron sometidos a la amplificación. Líneas: 1 y 12.- Controles negativos de PCR; 2.- *M. scrofulaceum*; 3.- *M. gordonae*; 4.- *M. avium*; 5.- *M. avium-intracellulare*; 6.- *M. kansasii*; 7.- *M. bovis*; 8.- *M. tuberculosis* H37Rv; 9.- *M. tuberculosis* ATCC #103C; 10.- *E. coli* BH101; 11.- Linfocitos humanos; 13.- MPM (123 - 4,182 pb)

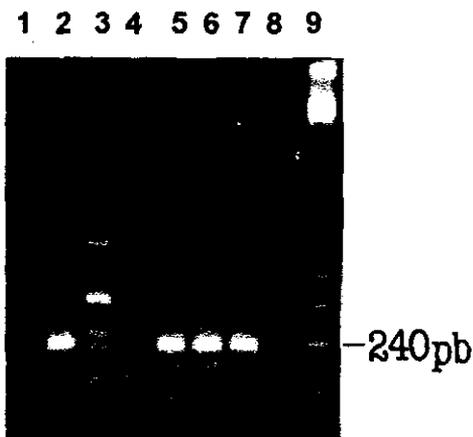


Figura 5 A

Amplificación del fragmento de 240 pb.

100 pg de cada uno de los moldes de ADN fueron sometidos a la amplificación. Líneas: 1 y 8.- Controles negativos de PCR; 2.- *M. bovis* (Fac. de Medicina); 3.- *M. bovis* BCG (INDRE); 4.- *M. bovis* (Cepa de referencia); 5.- *M. tuberculosis* H37Rv; 6.- *M. tuberculosis* H37Ra ; 7.- *M. tuberculosis* ATCC #103C; 9.- MPM (123 - 4,182 pb)

Amplificación del fragmento de 240 pb en muestras de tejido incluido en parafina.

Una vez conocida la sensibilidad y especificidad que nos proporciona la amplificación del fragmento de 240 pb se procedió a analizar el ADN de muestras de tejido previamente extraído.

Se tomó 1µg de ADN total (10 µl) de cada una de las muestras y de forma ciega se sometieron a la amplificación; en algunos casos las muestras fueron analizadas dos veces para corroborar los resultados. Estos se muestran en las siguientes figuras 6 a 9 y se resumen en la tabla 1.



Figura 6

Líneas: 1 y 14.- Controles negativos de PCR, 2-9.- TB pulmonar, 10-12.- Enf. micobacterias atípicas y otros; 13.- Control positivo de PCR; 15.- MPM (123-4, 182 pb)

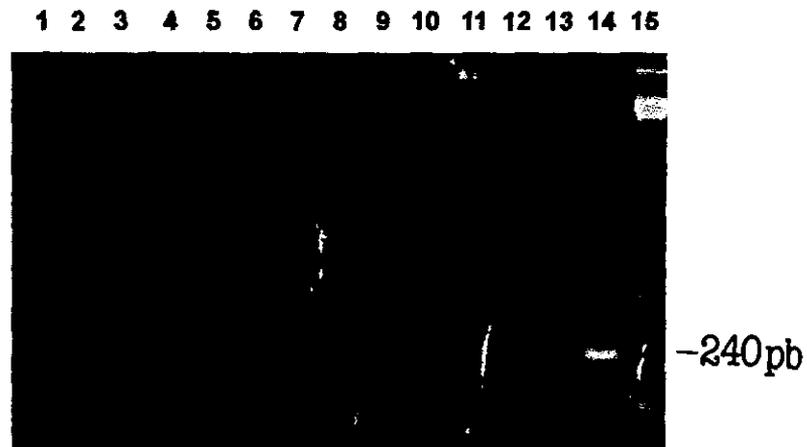


Figura 7

Líneas: 1.- Control negativo de PCR, 2-4.- TB pulmonar*; 5-13.- Probable TB pulmonar, 14.- Control positivo de PCR; 15.- MPM (123-4,182 pb)



Figura 8

Líneas: 1-8.- Probable TB pulmonar, 9-13- TB pleural; 14.- Control positivo de PCR; 15.- MPM (123-4,182 pb)

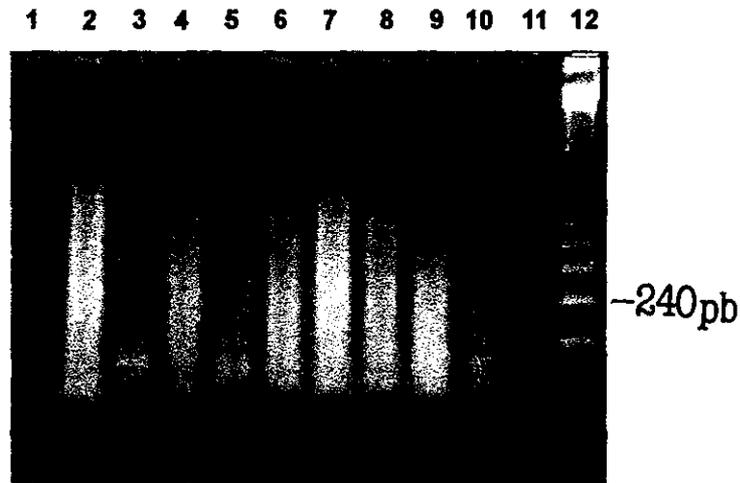


Figura 9

Líneas: 1-10.- Enf. micobacterias atípicas y otros; 11.- Control positivo de PCR; 12.- MPM (123-4,182 pb)

* Muestras nuevamente analizadas.

Los resultados de la tabla 1 muestran que la amplificación del fragmento de 240 pb permitió detectar solamente el 37.5% de los casos de tuberculosis pulmonar y para la probable tuberculosis pulmonar y la tuberculosis pleural no es de utilidad ya que no detecta estos casos, además no se tuvieron resultados falsos positivos en el grupo control.

Con respecto a la utilidad diagnóstica de la amplificación de este fragmento la sensibilidad que proporciona es de 10% con especificidad de 100%.

Se determinó el valor de la P exacta de Fisher y se hizo un análisis comparativo entre los grupos de pacientes con tuberculosis con respecto al grupo control y no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

TABLA 1

Amplificación del fragmento de 240 pb en adn de muestras de tejido incluido en parafina.

Grupo	(n)	PCR (+/-)	% Sensibilidad	p Fisher
TB pulmonar	8	3/5	37.5	*0.069
Probable TB pulmonar	17	0/17	0.0	*1.0
TB pleural	5	0/5	0.0	*1.0
Control Enf. micobacterias atípicas y otros	10	0/10	0.0	

*No hay diferencia estadísticamente significativa

Sensibilidad=10%

Especificidad=100%

Los resultados no cumplieron nuestras expectativas, ya que esperábamos tener una buena sensibilidad para el diagnóstico y la amplificación de este fragmento tan sólo proporcionó el 10% de sensibilidad y el 100% de especificidad. Por tal motivo, su utilidad para apoyar el diagnóstico de la enfermedad es cuestionable.

Amplificación del fragmento de 123 pb de IS6110.

Como alternativa se decidió iniciar la amplificación un fragmento de ADN de 123 pb que corresponde a la secuencia de inserción IS6110 específica del complejo *M. tuberculosis* que por encontrarse en más de una copia dentro del cromosoma de la micobacteria se ha reportado que muestra una mejor sensibilidad (10, 44, 46).

Al igual que para el fragmento de 240 pb se analizó la sensibilidad y especificidad de amplificación del fragmento de 123 pb bajo condiciones previamente estandarizadas.

Sensibilidad de amplificación para el fragmento de 123 pb.

Para determinar la sensibilidad de amplificación para el fragmento de 123 pb se utilizaron diferentes concentraciones de ADN de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* ATCC # 103C y en la figura 10 se observa que la amplificación de este fragmento fue capaz de detectar 0.01 pg de ADN.

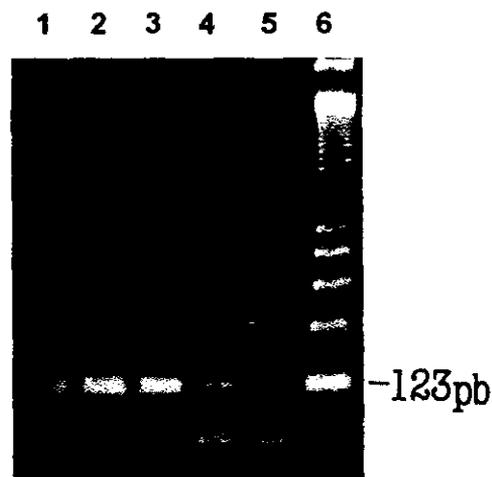


Figura 10

Sensibilidad de amplificación por PCR para el fragmento de 123 pb.

Se utilizaron diferentes cantidades de ADN de la cepa de *M. tuberculosis* ATCC #103C Líneas: 1.- 1.0 pg; 2.- 0.5 pg; 3.- 0.1 pg; 4.- 0.01 pg ; 5.- Control negativo de PCR; 6.- MPM (123- 4182pb)

Especificidad de amplificación para el fragmento de 123 pb.

La especificidad de amplificación fue determinada utilizando 20 pg de 12 ADN's como moldes (8 micobacterias, 2 nocardias, E.coli y linfocitos humanos de sangre periférica). En la figura 11 se muestra que la amplificación se llevó a cabo específicamente con el ADN de *M. bovis*, *M. tuberculosis* H37Rv y con *M. tuberculosis* ATCC # 103C.

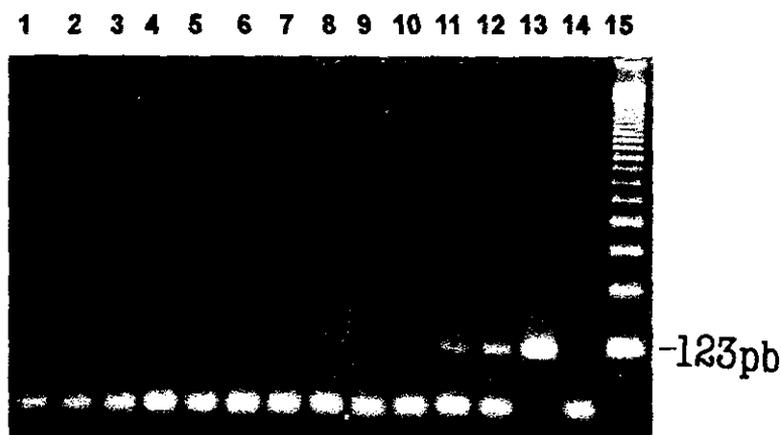


Figura 11

Especificidad de amplificación por PCR para el fragmento de 123 pb.

Se utilizaron 20 pg de cada uno de los moldes de ADN. Líneas: 1 y 14.- Controles negativos de PCR; 2.- Linfocitos humanos; 3.- *E. coli* BH101; 4.- *N. asteroides*; 5.- *N. brasiliensis*; 6.- *M. avium*; 7.- *M. avium-intracellulare*; 8.- *M. scrofulaceum*; 9.- *M. kansasii*; 10.- *M. gordonae*; 11.- *M. bovis*; 12.- *M. tuberculosis* H37Rv ; 13.- *M. tuberculosis* ATCC#103C; 15.- MPM (123 - 4,182 pb)

Amplificación del fragmento de 123 pb en muestras de tejido incluído en parafina.

El ADN de las muestras de tejido incluído en parafina analizado previamente en la amplificación del fragmento de 240 pb, ahora se analizó en la amplificación del fragmento de 123 pb y los resultados se muestran en las figuras 12 a 15 y se resumen en la tabla 2.



Figura 12

Líneas: 1- Control negativo de PCR; 2-9.- TB pulmonar; 10- Probable TB pulmonar; 11.- MPM (123-4,182 pb)

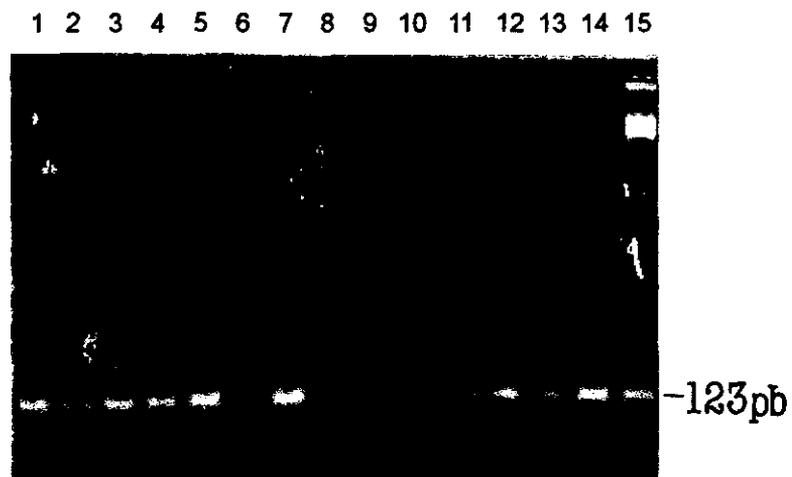


Figura 13

Líneas: 1-14- Probable TB pulmonar; 15.- MPM (123-4,182 pb)

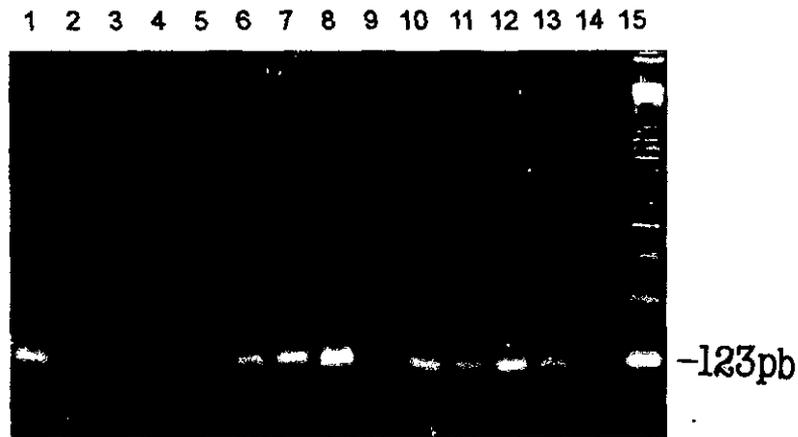


Figura 14

Líneas: 1-3- Probable TB pulmonar; 4.- TB pulmonar *; 5.- Micobacterias atípicas y otros; 6-12.- Probable TB pulmonar *; 13.- Control positivo de PCR; 14.- Control negativo de PCR; 15.- MPM (123-4,182 pb)

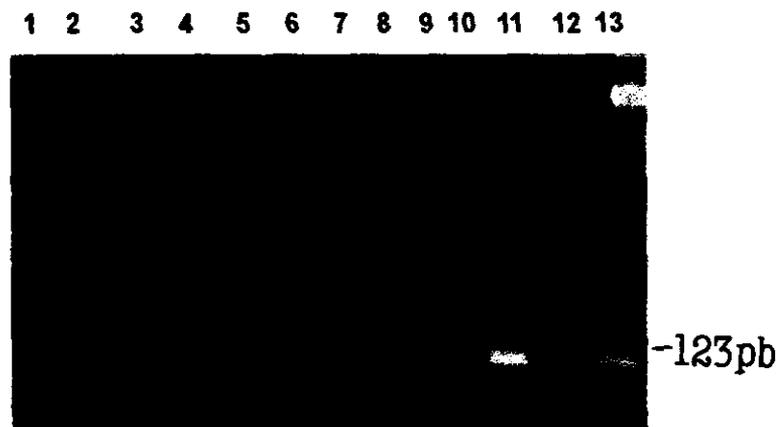


Figura 15

Líneas: 1-10.- Micobacterias atípicas y otros; 11.- Control positivo de PCR; 12.- Control negativo de PCR; 13.- MPM (123-4,182 pb)

* Muestras nuevamente analizadas.

TABLA 2

Amplificación del fragmento de 123 pb en ADN de muestras de tejido incluido en parafina.

Grupo	(n)	PCR (+/-)	% Sensibilidad	p Fisher
TB pulmonar	8	7/1	87.5	2.5×10^{-4}
Probable TB pulmonar	17	17/0	100.0	1.0×10^{-7}
TB pleural	5	3/2	60.0	0.022
Control Enf. micobacterias atípicas y otros	10	0/10	-	

Sensibilidad=90% Especificidad=100%

La amplificación de este fragmento permitió detectar el 87.5% de casos de la tuberculosis pulmonar, el 100% de la probable tuberculosis pulmonar y el 60% de la tuberculosis pleural, sin ningún resultado falso positivo en el grupo control, y proporcionó una sensibilidad para establecer el diagnóstico del 90% y el 100% de especificidad.

Al comparar la P exacta de Fisher encontramos que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de pacientes con tuberculosis con respecto al grupo control.

Estos resultados mostraron que para fines de diagnóstico la amplificación del fragmento de 123 pb tiene ventajas con respecto a la amplificación del fragmento de 240 pb al proporcionar mejor sensibilidad diagnóstica (Tabla 3).

Existe diferencia entre la amplificación de ambos fragmentos en el límite de detección, ya que mientras que la amplificación del fragmento de 240 pb detecta 0.5 pg de ADN el fragmento de 123 pb detecta 0.01 pg. Pero un aspecto muy importante es que la amplificación de ambos fragmentos muestra una alta especificidad ante el ADN de otras micobacterias y bacterias, así como también es importante remarcar que no amplifica con el ADN humano (Tabla 4).

TABLA 3

Análisis comparativo de la sensibilidad de amplificación de ambos fragmentos en muestras de tejido incluido en parafina.

Grupo	Fragmento de 240 pb	Fragmento de 123 pb
	% Sensibilidad	
TB pulmonar	37.5	87.5
Probable TB pulmonar	0.0	100.0
TB pleural	0.0	60.0
Control **		
Enf. micobacterias atípicas y otros	0.0	0.0

**100% de Especificidad

TABLA 4

Especificidad de amplificación de los fragmentos de 240 pb y 123 pb.

Origen	MPB64 240 pb	IS6110 123 pb
<i>M. tuberculosis</i> ATCC #103C	+	+
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	+	+
<i>M. bovis</i>	+	+
<i>M. bovis</i> BCG	+	ND
<i>M. scrofulaceum</i>	-	-
<i>M. goodii</i>	-	-
<i>M. avium</i>	-	-
<i>M. avium-intracellulare</i>	-	-
<i>M. kansasii</i>	-	-
<i>E. coli</i> BH101	-	-
<i>N. asteroides</i>	ND	-
<i>N. brasiliensis</i>	ND	-
Leucocitos humanos	-	-

ND=No determinado

Amplificación del fragmento de 123 pb en muestras de LCR.

Como segunda parte de trabajo se procedió al análisis de muestras de LCR amplificando solamente el fragmento de 123 pb, ya que los resultados anteriores mostraron que se obtiene una mejor sensibilidad diagnóstica.

Para el análisis se tomó 1 µg (10 µl) de ADN previamente extraído de las muestras de LCR y el fragmento de 123 pb se amplificó utilizando las condiciones ya estandarizadas. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 16 a 26 y se resumen en la tabla 5.

Al igual que para las muestras de tejido incluido en parafina las muestras fueron analizadas de manera ciega y algunas de ellas fueron analizadas nuevamente para determinar que tan reproducible es el análisis.

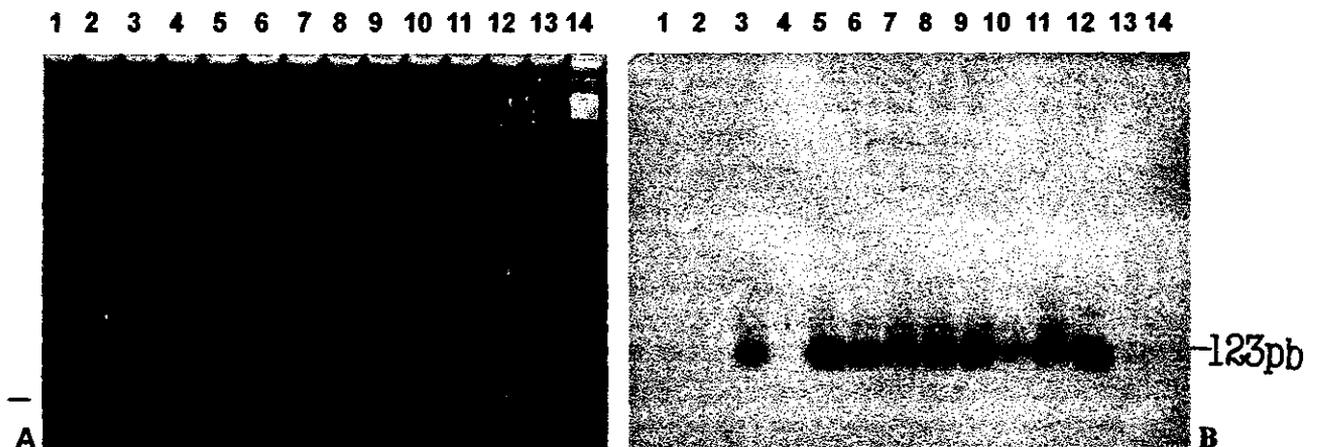


Figura 16

A) Electroforesis en gel de agarosa al 2 % y su B) Hibridación con el fragmento de 123 pb marcado con digoxigenina . Líneas: 1 y 13.- Controles negativos de PCR; 2-3.- Enf. diferentes a TBM; 4-11.- TBM; 12.- Control positivo de PCR; 14.- MPM (123-4,182 pb)

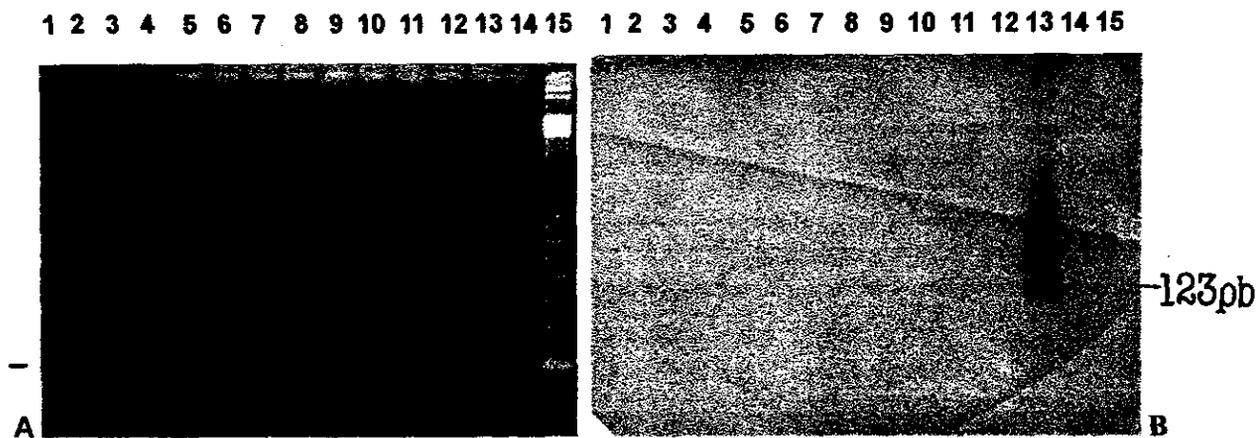


Figura 17

A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% y su B) Hibridación con el fragmento de 123 pb marcado con digoxigenina. Líneas: 1 y 14.- Controles negativos de PCR; 2-12.- Enf. diferentes a TBM; 13.- Control positivo de PCR; 15.- MPM (123-4,182 pb)

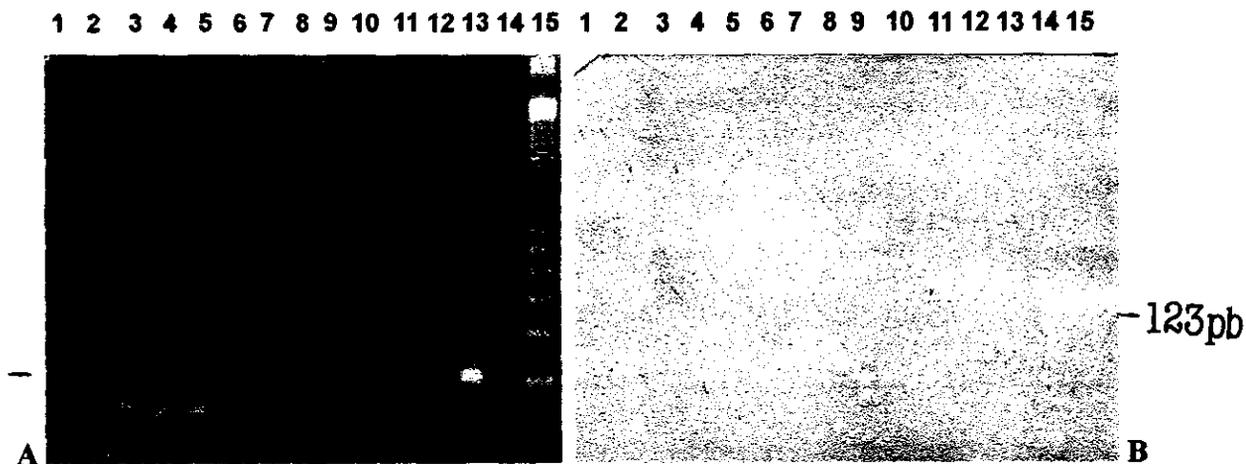


Figura 18

A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% y su B) Hibridación con el fragmento de 123 pb marcado con digoxigenina. Líneas: 1-12.- Enf. diferentes a TBM; 13.- Control positivo de PCR; 14.- Control negativo de PCR; 15.- MPM (123-4,182 pb)

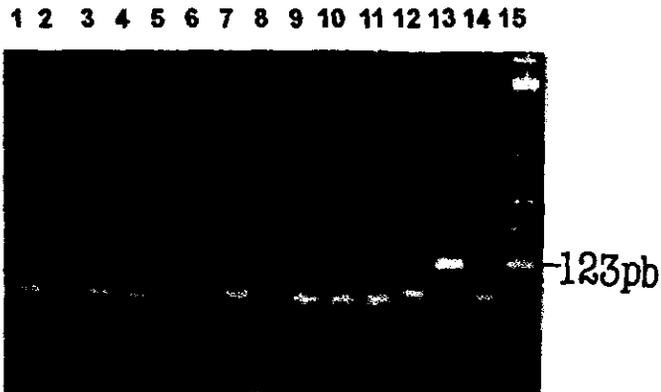


Figura 19

Líneas: 1 y 14.- Controles negativos de PCR; 2-6, 8-12.- Enf. diferentes a TBM; 7.- Probable TBM; 13.-Control positivo de PCR; 15.- MPM (123-4,182 pb)

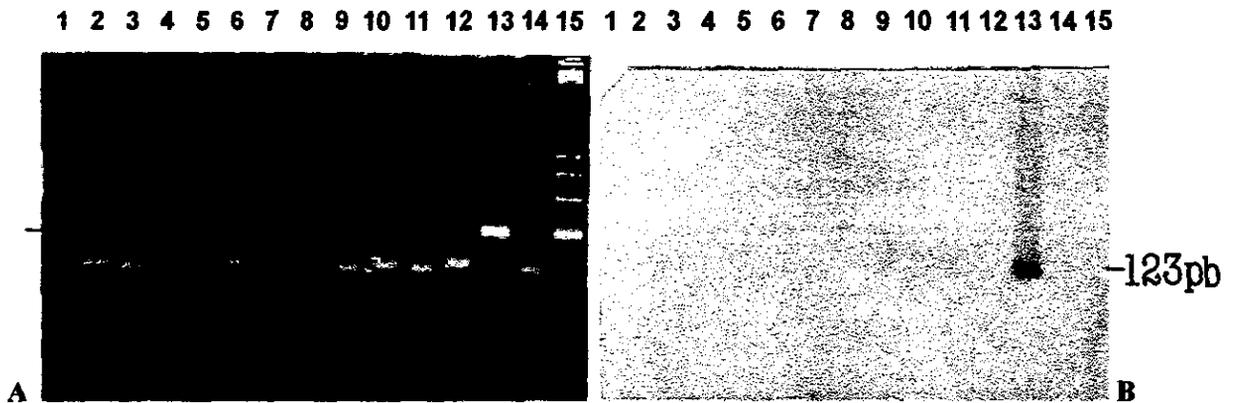


Figura 20

Figura 20. A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% y su B) Hibridación con el fragmento de 123 pb marcado con digoxigenina . Líneas: 1 y 14.- Controles negativos de PCR; 2-12.- Enf. diferentes a TBM; 13.-Control positivo de PCR; 15.- MPM (123-4,182 pb)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

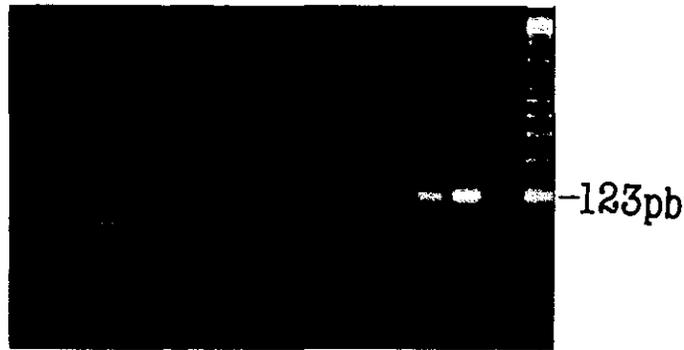


Figura 21

Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Líneas: 1 y 14.- Controles negativos de PCR; 2-10.- Enf. diferentes a TBM; 11.- Probable TBM; 12.- TBM; 13.-Control positivo de PCR; 15.- MPM (123-4,182 pb)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

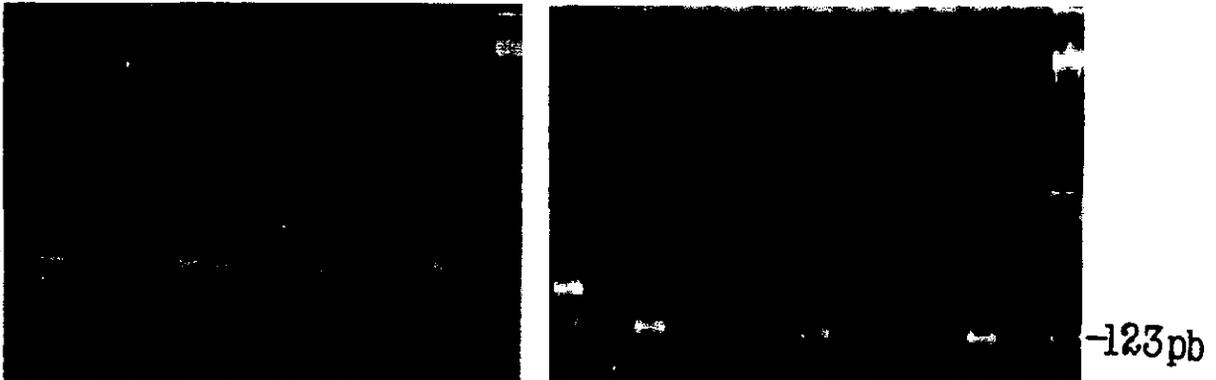


Figura 22

Figura 23

Figura 22. Líneas: 1 y 14.- Controles negativos de PCR; 2,4,6.- TBM; 3,7,9,10,12.- Probable TBM; 5,8 Meningitis por *C. immitis* ,11.- Enf. diferentes a TBM; 13.-Control positivo de PCR; 15.- MPM (123-4,182 pb)

Figura 23. Líneas: 1.-Neurocisticercosis, 2,4 Neoplasia intracraneana ,6,9,10.- Enf. diferentes a TBM; 3,8.- TBM; 5,7.- Probable TBM; 11.-Control positivo de PCR; ,12.- Control negativo de PCR; 13.- MPM (123-4,182 pb)

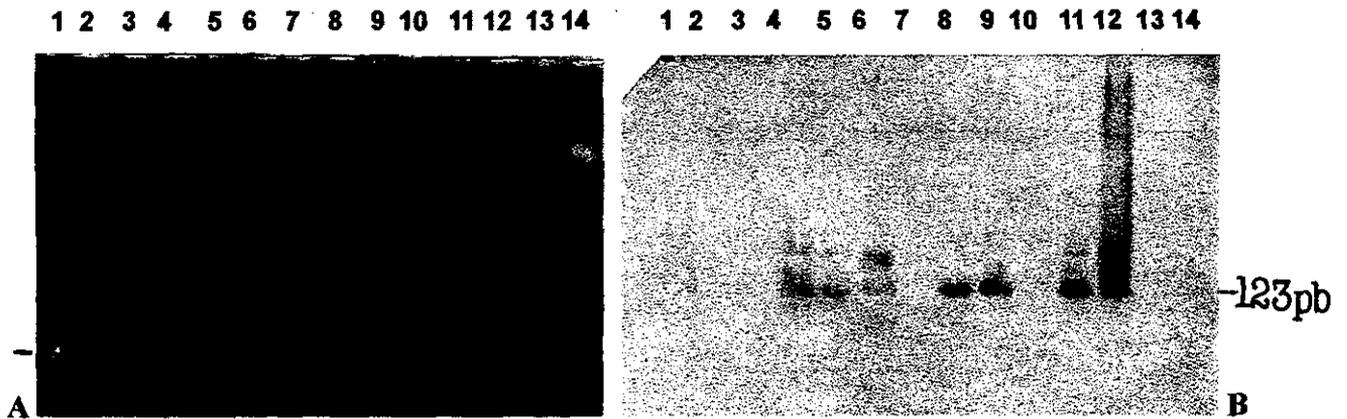


Figura 24

A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% y su B) Hibridación con el fragmento de 123 pb marcado con digoxigenina . Líneas: 1,4-6,8,9,11.- Probable TBM; 2,3,7,10.- Enf. diferentes a TBM; 12.- Control positivo de PCR; 13.- Control negativo de PCR; 14.- MPM (123-4,182 pb)

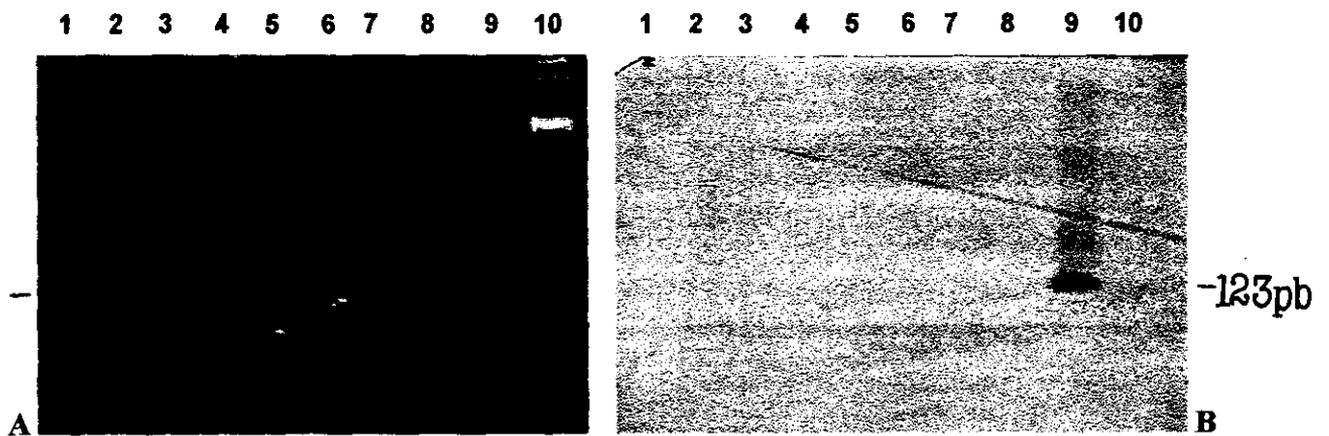


Figura 25

A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% y su B) Hibridación con el fragmento de 123 pb marcado con digoxigenina . Líneas: 1-8.- Enf. diferentes a TBM; 9.-Control positivo de PCR; 10.- MPM (123-4,182 pb)

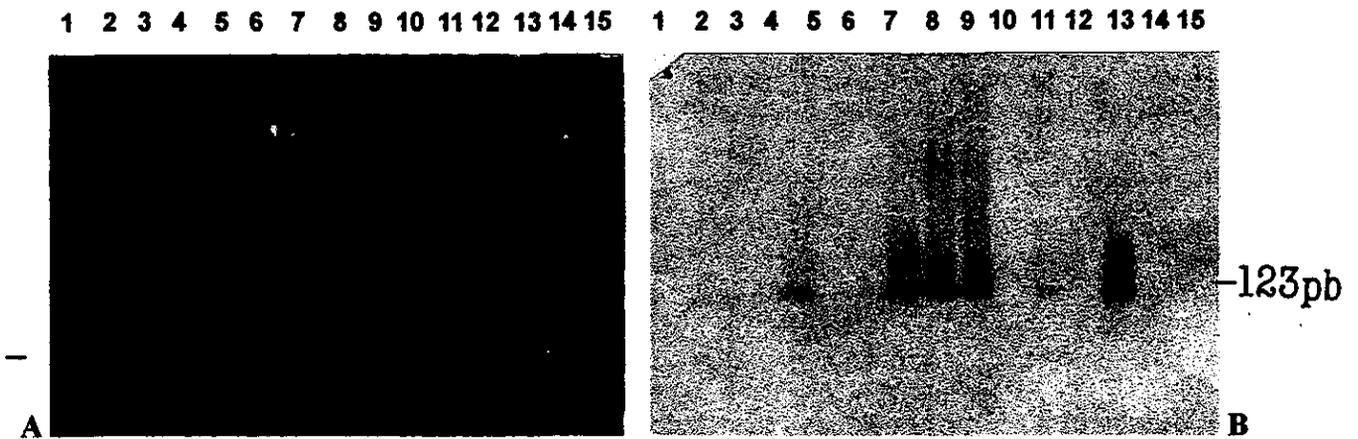


Figura 26

A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% y su B) Hibridación con el fragmento de 123 pb marcado con digoxigenina. Líneas: 1-3,5-6,10,12.- Enf. diferentes a TBM; 4,7-9.- Probable TBM; 11.- TBM; 13.-Control positivo de PCR; 14.- Control negativo de PCR; 15.- MPM (123-4,182 pb)

TABLA 5

Amplificación del fragmento de 123 pb en ADN extraído de muestras de líquido cefalorraquídeo.

Grupo	(n)	PCR(+/-)	% Sensibilidad	p Fisher
TB meníngea (TBM)	8	7/1	87.5	3.4×10^{-4}
Probable TBM	13	13/0	100.0	$<1 \times 10^{-8}$
Control Enf. diferentes a TBM	49	3/46	-	

Sensibilidad= 95.2% Especificidad= 93.8%

Cabe mencionar que tuvimos un falso negativo en el grupo de TBM confirmada y tres falsas positivas en el grupo control que corresponden a muestras de pacientes con los siguientes diagnósticos: neurocisticercosis, infección por *Coccidioides immitis* y neoplasia intracraneana.

Esta técnica proporcionó un 87.5% de sensibilidad para el diagnóstico de la TBM confirmada y un 100% para el diagnóstico de la probable TBM. En general la sensibilidad diagnóstica fue de 95.2% y la especificidad de 93.8%.

Con la finalidad de corroborar los resultados positivos y determinar si los casos negativos observados en el gel realmente lo son, los productos de PCR fueron transferidos a una membrana de nylon y se llevó a cabo la hibridación con una sonda (Fragmento de 123 pb)

marcada con digoxigenina la cual se evaluó previamente en electroforesis en gel de agarosa al 2 % y haciendo diluciones seriadas para posteriormente llevar a cabo la inmunodetección.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6 observándose un incremento de la sensibilidad del 87.5% al 100% en el grupo con la TBM confirmada, mientras que la especificidad se mantuvo constante.

TABLA 6

Hibridación del fragmento de 123 pb amplificado en muestras de líquido cefalorraquídeo.

Grupo	% Sensibilidad	
	PCR	Hibridación
TB meníngea (TBM)	87.5	100.0
Probable TBM	100.0	100.0
Control Enf. diferentes a TBM	6.0	6.0

Las muestras de LCR se analizaron por la técnica de ELISA e inmuno-dot para evaluar la presencia de anticuerpos dirigidos hacia las proteínas del PPD y lipoarabinomaman respectivamente. Teniendo los datos de cultivo y tinción comparamos la sensibilidad de PCR e hibridación con éstas técnicas (Tabla 7).

TABLA 7

Análisis comparativo de la sensibilidad de la técnica de ELISA, inmuno-dot y PCR en muestras de líquido cefalorraquídeo.

Grupo	% SENSIBILIDAD					
	Cultivo	Tinción	ELISA	Inmuno-dot	PCR	H
TBM	60	71	75	50	87.5	100
Probable TBM	0	0	61.5	61.5	100	100
Control Enf. diferentes a TBM	ND	ND	ND	35	6	6

ND=No determinado

H=Hibridación

6. DISCUSION.

Tradicionalmente el diagnóstico de la tuberculosis es establecido por hallazgos clínicos apoyados por datos de laboratorio como es el cultivo y la tinción (BAAR). Estos métodos han sido de gran utilidad durante mucho tiempo sin embargo presentan desventajas como es el tiempo requerido para el cultivo (6 a 8 semanas), mientras que la tinción no puede diferenciar a *M. tuberculosis* de las otras especies de micobacterias.

Considerando que en los últimos años la TB ha resurgido nuevamente como una verdadera epidemia al registrarse un incremento en el número de casos a nivel mundial por factores como la aparición del VIH y la evolución de cepas multirresistentes a drogas antituberculosas, es de gran importancia el tratar de implementar nuevos métodos para el diagnóstico de la enfermedad que sean más sensibles, rápidos y específicos con respecto a los ya existentes.

Uno de los propósitos es que al establecer el diagnóstico preciso y oportuno es posible iniciar el tratamiento de los pacientes de manera temprana y de esta manera erradicar los focos de infección. Otro de los propósitos es que los nuevos métodos permitan establecer el diagnóstico de las formas extrapulmonares de la enfermedad ya que son más difíciles de diagnosticar como es el caso de la TBM en donde el diagnóstico oportuno puede prevenir las secuelas neurológicas irreversibles que causa la enfermedad y la muerte de los pacientes. Además, esta forma de la enfermedad se caracteriza por la presencia de un número muy bajo de bacterias que no es posible detectar en muchos casos por los métodos tradicionales.

Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico como es el cultivo, la tinción (BAAR) y los métodos serológicos tienen la desventaja de proporcionar una baja sensibilidad para la TB pulmonar. Además, la sensibilidad es aún mas baja para las formas extrapulmonares (22).

La técnica de PCR a pocos años de haber sido desarrollada ha tenido un gran impacto en todas las áreas ya que ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades ocasionadas por diferentes agentes infecciosos.

Existen varios reportes en los que se ha aplicado la técnica de PCR en el diagnóstico de la tuberculosis y hemos retomado dos de las secuencias reportadas (40,45) para llevar a cabo el presente estudio.

Una de ellas es la proteína de secreción MPB64 y la otra es la Secuencia IS6110. La elección de la primera fue basada en reportes previos de Shankar P. y cols. (40) donde obtuvieron resultados prometedores al amplificar un fragmento de 240 pb en muestras clínicas y uno de los aspectos más importantes es que es expresada específicamente en las micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti* y *M. africanum*). De igual manera, la elección de IS6110 fue basándonos en estudios reportados por Eisenach K. y cols. (45) en el que amplificaron un fragmento de 123 pb de IS6110 que se caracteriza por ser una secuencia multicopia dentro del cromosoma de la micobacteria, ya que se ha descrito que se encuentran de 15 a 20 copias lo cual permite iniciar la amplificación con más de molde de ADN y por tanto tiene la posibilidad de ser mucho más sensible además de ser específica del complejo *M. tuberculosis*.

En el presente trabajo se analizó la especificidad de amplificación del fragmento de 240 pb del gen MPB64 y del fragmento de 123 pb de IS6110 utilizando varios moldes de ADN. Los resultados que se muestran en la tabla 4 concuerdan con los reportes de la literatura. Ambos fragmentos se amplificaron con el ADN de *M. tuberculosis* y *M. bovis* ya que son bacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (10, 11). Sin embargo, observamos que no se amplificó el fragmento de 240 pb con el ADN de la cepa de referencia de *M. bovis* como era de esperarse. Una posible respuesta es que el producto de PCR no fuese detectado con la tinción del gel con bromuro de etidio ya que su límite de detección es de 1 a 5 ng de ADN, sin embargo, esto no lo corroboramos con la hibridación con una sonda marcada.

Por este motivo, realizamos nuevamente la extracción de ADN de *M. bovis* de la misma cepa de referencia y además conseguimos otras dos cepas provenientes de diferentes laboratorios y amplificamos el fragmento de 240 pb. En los resultados de la figura 5A se puede observar que se llevó a cabo la amplificación con el ADN de *M. bovis* y *M. bovis*

BCG de los diferentes laboratorios, sin embargo, con la cepa de referencia la amplificación se da en menor grado. Esta cepa de referencia no se comporta como se esperaba y será interesante hacer posteriormente un análisis de su material genético para definir si presenta alguna alteración que pueda explicar estos resultados.

Con respecto a la especificidad de amplificación del fragmento de 123 pb nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Eisenach K. y cols. (45) en donde demostraron la alta especificidad de amplificación al utilizar ADN de diferentes micobacterias.

Durante el análisis de la especificidad, en ambas amplificaciones incluimos el ADN de los linfocitos humanos de sangre periférica ya que es muy importante establecer que no existe amplificación con el ADN humano y de esta manera descartar las reacciones falsas positivas.

Al analizar la sensibilidad que proporciona la amplificación de cada uno de los fragmentos los resultados mostraron que la amplificación del fragmento de 123 pb (Figura 10) fue mejor con respecto al fragmento de 240 pb (Figura 4) ya que permitió detectar hasta 10 fg de ADN de *M. tuberculosis*, mientras que la amplificación del fragmento de 240 pb detectó 500 fg.

Es importante considerar que la evaluación de la sensibilidad se analizó con ADN proveniente de un cultivo puro de *M. tuberculosis* (ATCC #103C) y aunque se obtuvo una alta sensibilidad esto realmente no refleja la sensibilidad en las muestras clínicas, ya que en éstas además de las bacterias tenemos una serie de componentes biológicos propios de este tipo de material. Una forma de eliminar las posibles interferencias por estos componentes fue llevar a cabo la extracción del ADN de las muestras para ayudar a eliminar los productos que pudieran interferir durante el proceso de la amplificación.

El método de extracción de ADN que se utilizó realmente no constituye un método rápido; sin embargo, permitió obtener un ADN de buena calidad para llevar a cabo la amplificación.

El método se basa en un tratamiento fuerte utilizando el detergente dodecil-sulfato de sodio, la enzima proteinasa K y temperatura elevada para romper la bacteria y liberar así el ADN. Este tratamiento fue necesario ya que *M. tuberculosis* se caracteriza por ser una

bacteria que se encuentra protegida por una pared muy gruesa con un alto contenido de lípidos. Se han descrito métodos rápidos de extracción tales como tratar la muestra con la proteinasa K y después tomar el sobrenadante para la amplificación, o bien, tratar la muestra con microperlas de vidrio y someterlas a sonicación para posteriormente amplificar una muestra del sobrenadante. Inicialmente intentamos estos métodos de extracción con el tejido incluido en parafina; sin embargo, no obtuvimos buenos resultados. Y en base a esto consideramos que es muy importante contar con un buen método de extracción, aunque no sea un método rápido.

Un aspecto importante que debe ser considerado es la presencia de inhibidores de PCR en el ADN extraído, ya que puede constituir un problema durante la amplificación y esto sería un gran obstáculo para utilizar esta técnica para el diagnóstico. Con el fin de descartar que los resultados negativos fueran producto de la inhibición de la reacción de PCR debido a la presencia de inhibidores, se les agregó ADN de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* a algunas muestras con resultados negativos a la amplificación y se amplificaron nuevamente. Los resultados mostraron que la amplificación del fragmento se llevó a cabo sin ningún problema y con esto se descartó la posibilidad de la presencia de inhibidores en el ADN extraído.

Al amplificar el fragmento de 240 pb en las muestras de tejido se obtuvo una sensibilidad del 37.5% para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar confirmada y la técnica falló totalmente con la probable tuberculosis pulmonar y en la tuberculosis pleural (Tabla 1). La técnica permitió detectar solamente el 12% de la forma pulmonar (incluyendo la TB pulmonar confirmada y la probable TB pulmonar) y en general, proporcionó una sensibilidad de 10% y una especificidad del 100%

Al amplificar el fragmento de 123 pb en las mismas muestras de tejido se obtuvo una sensibilidad del 87.5% para la tuberculosis pulmonar confirmada, el 100% para la probable tuberculosis pulmonar y el 60% para la tuberculosis pleural (Tabla 2). Permitted detectar el 96% de la forma pulmonar (TB pulmonar confirmada y probable TB pulmonar) y en general,

proporcionó una sensibilidad diagnóstica del 90% para detectar la tuberculosis pulmonar y la tuberculosis pleural y una especificidad del 100%.

Es interesante observar que al amplificar el fragmento de 123 pb (IS6110) se obtuvo un incremento en la sensibilidad al analizar las muestras de tejido que fue desde un 10% proporcionada por la amplificación del fragmento de 240 pb (MPB64) hasta un 90%. Además cabe hacer notar que en la amplificación de ambos fragmentos no se registran falsos positivos en el grupo control.

Los resultados obtenidos al analizar las muestras de tejido incluido en parafina mostraron que para fines de diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y la tuberculosis pleural la mejor elección es la amplificación del fragmento de 123 pb de IS6110 (Tabla 3).

Estos resultados de alguna manera son determinados por las características de cada uno de los genes utilizados en este trabajo. MPB64 y IS6110 que son genes específicos del complejo *M. tuberculosis* (10-12, 14, 30) y tienen características muy particulares. MPB64 se presenta dentro del cromosoma de *M. tuberculosis* en una sola copia; mientras que IS6110 es una secuencia multicopia encontrándose de 15 a 20 copias (10, 44). La naturaleza repetitiva de IS6110 en el cromosoma de *M. tuberculosis* contribuye de manera importante en proporcionar una alta sensibilidad y estabilidad del ensayo, ya que se tiene la ventaja de partir de más de un molde de ADN para la amplificación incrementando la capacidad para detectar pequeñas cantidades de ADN, esto se ve reflejado en el incremento de sensibilidad. Otra ventaja es que si algunas de las copias de IS6110 se llegaran a dañar durante el proceso de extracción no afecta de manera importante en el resultado ya que existen otros moldes en buenas condiciones que pueden ser amplificados. Para MPB64 es diferente ya que se dañaría la única copia que existe y por lo tanto la amplificación no se llevaría a cabo.

Estas características de alguna manera también se reflejaron en la cantidad de ADN utilizados para los controles positivos durante la amplificación. En el caso del fragmento de 240 pb utilizamos 100 pg de ADN y 1 pg para el fragmento de 123 pb.

La amplificación del fragmento de 123 pb tiene sus ventajas ya que es muy sensible, pero también la desventaja es que fácilmente se den las contaminaciones entre las muestras,

por lo que hay que ser más cuidadosos. Por esto, es importante incluir en cada amplificación el control negativo de PCR, el cual, tiene todos los componentes de reacción excepto el ADN que es sustituido por agua. Al ser analizado el producto de PCR mediante la electroforesis el control negativo no debe mostrar ninguna banda de amplificación y en caso contrario, esto es indicativo de contaminación y por lo tanto los resultados no son de utilidad.

Por otra parte, al amplificar el fragmento de 123 pb en muestras de líquido cefalorraquídeo se obtuvo una sensibilidad de 87.5% para la tuberculosis meníngea confirmada y el 100% para la probable tuberculosis meníngea con tres resultados falsos positivos en el grupo control (Tabla 5) proporcionando una sensibilidad para el diagnóstico del 95.2% y una especificidad de 93.8%.

En el análisis de estas muestras la amplificación se complementó con la hibridación y se observó un incremento de la sensibilidad en el grupo de la tuberculosis meníngea confirmada del 87.5% al 100% (Tabla 6), proporcionando en general una sensibilidad para el diagnóstico del 100% y una especificidad de 93.8%.

Durante la amplificación del fragmento de 123 pb en algunas muestras de líquido cefalorraquídeo se observaron bandas inespecíficas tanto en el gel como en la hibridación; no obstante, pudimos identificar sin ningún problema el fragmento de interés.

Cuando se comparó la sensibilidad del cultivo, la tinción, la técnica de ELISA e inmuno-dot con respecto a la técnica de PCR (Tabla 7), se mostró que para la tuberculosis meníngea confirmada la técnica de ELISA proporciona una sensibilidad del 75% mientras que el inmuno-dot el 50% y el PCR del 87.5%; para la probable tuberculosis meníngea tanto ELISA como inmuno-dot proporcionaron una sensibilidad del 61.5% y el PCR el 100%. En general, la técnica de PCR proporcionó una mejor sensibilidad que las otras técnicas y es importante hacer notar que el cultivo y la tinción mostraron baja sensibilidad.

La técnica de PCR es una técnica muy versátil para ser utilizada en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y no infecciosas y es bueno considerar las ventajas y

desventajas que ello implica. El PCR es una técnica que requiere de muchos cuidados para evitar la contaminación de los reactivos y las micropipetas y además de las que pueden darse durante la manipulación de las muestras. Para ello, es necesario destinar zonas específicas de trabajo dentro del laboratorio como es para la extracción de ADN, para la preparación de todos los reactivos, para llevar a cabo las amplificaciones, para la electroforesis de los productos amplificados y para la hibridación. También se requiere de tener micropipetas exclusivas para la extracción del ADN, para la preparación de los reactivos, para amplificar y para productos amplificados. Es necesario destinar material de vidrio exclusivo para ser utilizado en la preparación de las soluciones y se requiere de un gasto permanente de material de plástico como son las puntas para las micropipetas y los tubos ya que se trabaja solamente con material nuevo y esterilizado. Además el termociclador y los reactivos son costosos.

Sin embargo, consideramos que con la gran aplicación que ha tenido la técnica de PCR en todos las áreas de investigación; quizá en un futuro no muy lejano su costo disminuya.

Para el diagnóstico de la tuberculosis el PCR tiene ventajas sobre los métodos tradicionales de diagnóstico ya que es capaz de detectar un bajo número de bacterias (1-100), además, puede detectar a los microorganismos no viables mediante la amplificación de su material genético. Esta ventaja puede ser de gran utilidad para establecer el diagnóstico de las formas extrapulmonares de la enfermedad que son difíciles de establecer y para aquellas formas que se caracterizan por la presencia de un bajo número de bacterias como es el caso de la TBM.

El PCR puede ser de gran utilidad para el diagnóstico en material de biopsia ya que en algunas ocasiones al realizar un análisis histopatológico de lesiones granulomatosas que podrían ser de origen tuberculoso, se obtienen resultados negativos por la tinción con Ziehl-Nielsen y con la ayuda del PCR se podría establecer un diagnóstico rápido y preciso para iniciar el tratamiento antifímico apropiado.

De igual manera puede ser de gran utilidad para establecer el diagnóstico rápido y preciso de la TBM para iniciar un tratamiento oportuno y prevenir los daños neurológicos que ocasiona la infección.

La técnica de PCR proporcionó una alta sensibilidad y especificidad además de ser una técnica rápida ya que es posible tener el resultado en dos días cuando solamente se hace la electroforesis y se tiñe el gel con bromuro de etidio.

En este estudio se demostró que es posible establecer el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, la tuberculosis pleural y la tuberculosis meníngea amplificando por PCR el fragmento de 123 pb de la secuencia IS6110 en muestras de tejido incluido en parafina y en LCR respectivamente.

Finalmente, cabe mencionar que esta metodología puede ser de gran utilidad para establecer el diagnóstico de la tuberculosis, aunque, un resultado positivo al amplificar el fragmento de 123 pb no asegura totalmente que la infección pueda ser ocasionada exclusivamente por *M. tuberculosis* ya que *M. bovis* también pertenece al complejo *M. tuberculosis* y posee en su genoma la secuencia IS6110 aunque en menor número de copias.

Actualmente, la frecuencia de la tuberculosis humana causada por *M. bovis* es menor debido los programas de erradicación de la tuberculosis bovina, los cuales, tienen como objetivo principal el erradicar la tuberculosis en el ganado mediante la detección y el control de los focos de infección, evitar el contacto humano con animales infectados y con sus heces fecales y orina, la pasteurización de la leche y el manejo higiénico de sus derivados, así como también asegurar que el ganado destinado para consumo humano no se encuentre infectado y además evitar que se de la infección inversa (hombre-ganado). Sin embargo, no todos los países cuentan con este tipo de programas de saneamiento, por lo tanto, la prevalencia de la infección en el ganado varía en todo el mundo y también la frecuencia de la tuberculosis humana ocasionada por *M. bovis* (52,53).

7. CONCLUSIONES.

1. La amplificación del fragmento de 240 pb (MPB64) se llevó a cabo específicamente con el ADN de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG y la mínima cantidad que detectó fueron 0.5 pg; mientras que la amplificación del fragmento de 123 pb (IS6110) fue específica con el ADN de *M. tuberculosis* y *M. bovis* y permitió detectar hasta 0.01 pg (10 bacterias).
2. Al amplificar el fragmento de 240 pb de MPB64 en muestras de tejido incluido en parafina se obtuvo una sensibilidad del 10% para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar y la tuberculosis pleural y una especificidad del 100%, mientras que la amplificación del fragmento de 123 pb proporcionó una sensibilidad de 90% y especificidad del 100%.
3. La amplificación del fragmento de 123 pb (IS6110) en muestras de líquido cefalorraquídeo proporcionó una sensibilidad del 95.2% para el diagnóstico de tuberculosis meníngea y una especificidad del 93.8% y cuando se llevó a cabo la hibridación la sensibilidad se incrementó al 100%.
4. La técnica de PCR utilizada en este estudio para amplificar el fragmento de 123 pb (IS6110) constituye una buena alternativa para establecer el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, la tuberculosis pleural y la tuberculosis meníngea en muestras de tejido incluido en parafina y en líquido cefalorraquídeo.
5. Esta técnica proporciona una buena sensibilidad y especificidad y puede facilitar el diagnóstico rápido de estas formas de la tuberculosis.

8. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Pacheco R. C. Tuberculosis en adultos. En Enfermedades respiratorias agudas y crónicas, García G. M. L., Giono C. S., Pacheco C. R., Escobar G. A. y Valdespino G. J. L. (ed), INDRE, Secretaría de Salud, México, 1994, 211-249.
- 2.- Pacheco R. C., Vázquez R. V. y Badillo N. Vacuna del bacilo de Calmette y Guerin (BCG). En Vacunas, Ciencia y Salud, Escobar G. A., Valdespino G. J. L. y Sepúlveda A. J. (ed), INDRE, Secretaría de Salud, México, 1992, 187-198.
- 3.- Stites D., Stobo J., Fudenberg H. & Wells V. Inmunología básica y clínica, 5a.edición, Editorial El manual moderno, México, 1985, 632-635.
- 4.- Rich E. A. & Ellner J. J. Pathogenesis of tuberculosis. In Tuberculosis. Current and Treatment. Friedman L. N. (ed), CRC Press, U.S.A., 1994 , 27-51.
- 5.- Wolinsky E. *Mycobacteria*. In *Microbiology*, third edition, Davis B., Dulbecco R., Eisen H. & Ginsberg H. (ed), Harper & Row Publishers, U. S.A., 1980, 724-735.
- 6.- Jawetz E., Melnick J., Adelberg E. et al. Microbiología médica, 13a. edición, Editorial El manual moderno, México, 1990, 258-265.
- 7.- Romero C. R. Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas, Editorial Médica Panamericana, México, 1993, 323-328.
- 8.- Bersa G. & Chatterje D. Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. In Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control. Bloom B. R. (ed), American Society for Microbiology, U.S.A., 1994, 285-306.
- 9.- Balandrano C.S. Micobacterias. En Enfermedades respiratorias agudas y crónicas. García G. M. L., Giono C. S., Pacheco C. R., Escobar G. A., Valdespino G. J. L. (ed), INDRE, Secretaría de Salud, México, 1994, 517-526.
- 10.- Eisenach K. D., Cave M. D. & Craeford J. T. PCR Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications*. Persing D. H., Smith T. F., Tenover F. C. & White T. J. (ed), American Society for Microbiology, U.S.A., 1993, 191-196.
- 11.- Eisenach K. D., Crawford J. T. & Bates J. H. (1986) Genetic relatedness among strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Am. Respir. Dis.*; 133: 1065-1068.

- 12.- Kochi A. (1991) The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle*; 72: 1-6.
- 13.- Snider D., Raviglione M. & Kochi A. Global burden of tuberculosis. In *Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control*. Bloom B. R. (ed), American Society for Microbiology, U.S.A., 1994, 3-11.
- 14.- Raviglione C., Snider D. & Kochi A. (1995) Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *J.A.M.A.*; 273: 220-226.
- 15.- Zacarías F., Gonzalez R., Cuchi P., Yáñez A., Peruga A., Mazín R., Betts C. y Weissenbacher M. (1994) El SIDA y su interacción con la tuberculosis en América Latina y el Caribe. *Bol. Of. Sanit. Panam.*; 116: 250-261.
- 16.- Programa de tuberculosis, OMS. (1993) Boletín Mensual SIDA/ETS; 12: 2568-2573.
- 17.- García E. C. (1994) La prevención de la tuberculosis. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*; 7: 277-278.
- 18.- Olvera C. R. y García E. C. (1994) Tuberculosis e infección por VIH. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*; 7: 109-110.
- 19.- Enarson D. (1995) The international union against tuberculosis and lung disease model national tuberculosis programmes. *Tubercle Lung Dis.*; 76: 95-99.
- 20.- Nava F. M. y Santos P. J. I. Tuberculosis en niños. En *Enfermedades respiratorias agudas y crónicas*, García G. M. L., Giono C. S., Pacheco C. R., Escobar G. A. y Valdespino G. J. L. (ed), INDRE, Secretaría de Salud, México, 1994, 187-210.
- 21.- Berger J. R. (1994) Tuberculous meningitidis. *Curr. Op. Neurol.*; 7: 191-200.
- 22.- Sada D. E., Torres R. M. & Herrera B. T. (1988) Nuevos métodos de diagnóstico en tuberculosis. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*; 1: 121-125.
- 23.- Shinnick T. & Good R. (1995) Diagnostic Mycobacteriology Laboratory Practices. *Clin Inf. Dis.*; 21: 291-299.
- 24.- Sada E., Brennan P., Herrera T. & Torres M. (1990) Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*; 28: 2587-2590.

- 25.- Daniel T. & Debanne S. (1987) The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Rev. Respir. Dis.*; 135: 1137-1151.
- 26.- Heifets L. & Good R. Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In *Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control.* Bloom B. R. (ed), American Society for Microbiology, U.S.A., 1994, 95-100.
- 27.- Persing D. H., Smith T. F., Tenover F. C. & Whitw T. J. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications. American Society for Microbiology, U.S.A., 1993, 169-515.
- 28.- Shinnick T. (1987) The 65-Kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*; 169: 1080-1088.
- 29.- Shinnick T., Vodkin M. & Williams J. (1988) The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *Escherichia coli* GroEL protein. *Infect. Immun.*; 56: 446-451.
- 30.- Young D. B., Kaufmann S., Hermans P. & Thole J. (1992) Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Mol. Microbiol.*; 6: 133-145.
- 31.- Hance A., Grandchamp B., Lévy-Frébault V., Lecossier D., Rauzier J., Bocart D. & Gicquel B. (1989) Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.*; 3: 843-849.
- 32.- Brisson-Noel A., Lecossier D., Nassif X., Gicquel B., Lévy-Frébault V. & Hance A. (1989) Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet*; 4: 1069-1071.
- 33.- Pao Ch., Yen T., You J., Maa J., Fiss E. & Chang Ch. (1990) Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.*; 28: 1877-1880.
- 34.- Popper H., Winter E. & Hofler G. (1994) DNA of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. *Am. J. Clin. Pathol.*; 101: 738-741.

- 35.- Andersen A. & Hansen E. (1989) Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000 molecular weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*; 57:2481-2488.
- 36.- Sjobring U., Mecklenburg M., Andersen A. & Miorner H. (1990) Polymerase Chain Reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*; 28: 2200-2204.
- 37.- Yuen K., Chan K., Chan G., Ho B., Dai L., Chua P. & Ng M. (1993) Use of PCR in routine diagnosis of treated and untreated pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Pathol.*; 46: 318-322.
- 38.- Harboe M., Nagai S., Patarroyo M., Torres M., Ramirez C. & Cruz N. (1986) Properties of proteins MPB64, MPB70 and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.*; 52: 293-302.
- 39.- Yamaguchi R., Matsuo K., Yamazaki A., Abe Ch., Nagai S., terasaka K. & Yamada T. (1989) Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *M.bovis* BCG. *Infect. Immun.*; 57: 283-288.
- 40.- Shankar P., Manjunath N., Lakshmi R., Aditi B., Seth P. & Shrinivas. (1989) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by Polymerase Chain Reaction. *Lancet*; 335: 423.
- 41.- Shankar P., Manjunath N., Mohan K., Prasad K., Behari M., Shrinivas & Ahuja G. (1991) Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by Polymerase Chain Reaction. *Lancet*; 337: 5-7.
- 42.- Manjunath N., Shankar P., Rajan L., Bhargava A., Saluja S. & Shrinivas. (1991) Evaluation of a polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle*; 72: 21-27.
- 43.- Eisenach K. D., Crawford J. T. & Bates J. H. (1988) Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*; 26: 2240-2245.
- 44.- Thierry D., Cave M., Eisenach K., Crawford J., Bates J., Gicquel B. & Guedson J. (1990) IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic. Acids. Res.*; 18: 188.

- 45.- Eisenach K. D., Cave M. D., Bates J. & Crawford J. (1990) Polymerase Chain Reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.*; 161: 977-981.
- 46.- Eisenach K., Sifford M., Cave D., Bates J. & Crawford J. (1991) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a Polymerase Chain Reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.*; 144:1160-1163.
- 47.- Godfrey Faussett P., Wilkins E., Khoo S. & Stoker N. (1991) Tuberculous pericarditis confirmed by DNA amplification. *Lancet*; 337: 176-177.
- 48.- Schluger N., Condos R., Lewis S. & Rom W. (1994) Amplification of DNA of *Mycobacterium tuberculosis* from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Lancet* ; 344:232-233.
- 49.- Saiki R. Amplification of genomic DNA. In PCR Protocols. A guide to methods and applications. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. & White T. J. (ed), Academic Press, U.S.A., 1990, 13-20.
- 50.- Innis M. & Gelfand D. Optimization of PCRs. In PCR Protocols. A guide to methods and applications. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. & White T. J.(ed), Academic Press, U.S.A., 1990, 3-12.
- 51.- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T., Molecular Cloning, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989, 9.31-9.40.
- 52.- Moda G., Daborn J., Grange J. & Cosivi O. (1996) The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tub. Lung Dis.*: 77: 103-108.
- 53.- Cotter T.P., Sheehan S., Cryan B., O'Shaughnessy E., Cummins H. & Bredin C. (1996) Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in human in the south-west region of Ireland: is there a relationship with infection prevalence in cattle? *Tub. Lung. Dis.*: 77: 545-548.

9. APENDICE.

1 - Solución amortiguadora TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8.0)

Mezclar los siguientes volúmenes:

Tris 1 M, pH=8.0 1.0 ml

EDTA 0.5 M, pH=8.0 0.2 ml

Aforar a 100 ml con agua destilada y esterilizar en autoclave; posteriormente hacer alícuotas de 1 ml y guardarlas a -20°C.

2 - Solución amortiguadora TBE 10X pH=8.3 para electroforesis.

(Tris 890 mM, Boratos 890 mM, EDTA 20 mM)

EDTA (Sigma)..... 7.4 g

Trizma Base (Sigma)..... 108 g

Acido Bórico (Sigma)..... 55 g

Agua cbp..... 1000 ml

Ajustar el pH=8.3 antes de aforar. Filtrar la solución utilizando membrana de 0.45 µm de diámetro y conservarla a temperatura ambiente.

3 - Acetato de sodio 3 M, pH=5.2

Acetato de sodio (Sigma)..... 24.6 g

Agua cbp..... 100 ml

Ajustar el pH con ácido acético glacial antes de aforar. Esterilizar en autoclave y hacer alícuotas de 1 ml. Conservarlas a -20°C.

4 - Perclorato de sodio 5 M.

Perclorato de sodio (Sigma) 61.2 g

Agua cbp..... 100 ml

Esterilizar en autoclave y hacer alícuotas. Conservar a -20°C.

5 - Solución amortiguadora Tris 50 mM, pH=8.0

Mezclar:

Tris 1 M, pH=8.0..... 1.0 ml

Agua cbp.....20 ml

Esterilizar en autoclave y hacer alícuotas. Conservar a -20°C.

6 - Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1)

Para 50 ml:

Cloroformo (Baker).....48 ml

Alcohol isoamílico Baker)..... 2 ml

Guardarla en frasco ámbar a 4°C.

7 - Solución de corrida para electroforesis.

Para 10 ml :

Azul de bromofenol (Sigma).....0.025 g

Xylene cyanole (Biorad).....0.025 g

Glicerol (Merck).....3.0 ml

Agua cbp.....10 ml

Mezclar bien y filtrar utilizando membrana de 0.45 µm; hacer alícuotas y conservarlas a 4°C.

8 - Solución para diluir la Taq polimerasa.

Para 10 ml :

Tris-HCl 1 M, pH=7.6.....0.5 ml

NaCl 5 M.....0.2 ml

EDTA 0.5 M, pH=8.0.....2 ml

DTT (Sigma)1.5 mg

Glicerol (Sigma).....5 ml

Agua.....4.29 ml

Filtrar con membrana de 0.45 µm ; hacer alícuotas y conservarlas a -20°C.

9 - Mezcla de dNTP's para PCR (1.25 mM c/u)

Diluir 1:10 la solución stock (100 mM) de cada uno de los dNTP's en $MgCl_2$ 1 mM y mezclar las siguientes cantidades:

125 μ l dATP 10 mM (Farmacia)

125 μ l dCTP 10 mM (Farmacia)

125 μ l dTTP 10 mM (Farmacia)

125 μ l dGTP 10 mM (Farmacia)

500 μ l Agua

VT=1000 μ l

Se mezclan perfectamente y posteriormente se hacen alícuotas y se conservan a $-20^\circ C$.

10.- Solución para reacción 10X.

(KCl 500 mM, $MgCl_2$ 25 mM, gelatina 0.1%, Tris-HCl 100 mM, pH=8.3)

Para 100 ml mezclar:

KCl (Merck)3.72 g

$MgCl_2$ (Merck).....0.5 g

Gelatina (Sigma).....1.0 g

Tris-HCl (Sigma).....1.5 g

Ajustar el pH=8.3 y filtrar con membrana de 0.45 μ m ; hacer alícuotas y conservarlas a $-20^\circ C$, filtrar

11 - Solución SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato de sodio 0.3 M, pH=7)

NaCl (Baker).....175.3 g

Citrato de sodio (Baker).....88.2 g

Agua cbp.....1000 ml

Antes de aforar ajustar el pH=7.0 con NaOH y esterilizar con autoclave. Mantener a temperatura ambiente.

12 - Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 20%

SDS (Biorad).....20 g

Agua cbp.....100 ml

Esterilizar en autoclave y conservar a temperatura ambiente.

13 - N-Lauril sarcosine 10%

N-laurilsarcosine (Sigma).10 g

Agua cbp.....100 ml

Esterilizar por filtración y conservar a 4°C.

14 - Tris 1 M, pH=8.0

Tris (Sigma).....12.1 g

Agua cbp.....100 ml

Esterilizar en autoclave y conservar a 4°C.

15 - NaCl 5 M.

NaCl (Baker).....29.2 g

Agua cbp.....100 ml

Esterilizar en autoclave y conservar a 4°C.

16 - EDTA 0.5 M, pH=8.0

EDTA (Sigma).....18.6 g

Agua cbp.....100 ml

Ajustar el pH antes de aforar, esterilizar en autoclave y conservar a 4°C.