



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA
DETECCIÓN RÁPIDA DE FALLA AL TRATAMIENTO EN TUBERCULOSIS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MAYELI MEJIA BALLINA

ASESORES:

M. en C. Andrea Ángela Becerril Osnaya

QFB Iliana Alejandra Cortés Ortiz

M. en C. Maribel González Villa

M. en C. Hiram Olivera Díaz

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatoria

El presente trabajo lo dedico a mis familiares que gracias a sus consejos y palabras de aliento me motivaron a dar continuidad a mis estudios. A mis padres y hermanos por su constante apoyo, confianza y amor. A mi padre por brindarme los recursos necesarios durante mi preparación académica y por permanecer a mi lado apoyándome y aconsejándome en todo momento. A mi madre por hacer de mi una mejor persona a través de sus consejos, enseñanzas y amor. A mi hermana por estar siempre presente brindándome aliento.

Agradecimientos

A Dios por que a través de su infinita bondad y amor me permitió gozar de salud para avanzar y llegar a este momento tan especial y esperado en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mis padres a quienes debo todo en la vida, les agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindaron para culminar mi carrera profesional.

A mi madre Benita, por el apoyo incondicional en todo momento, por sus consejos, sus valores y la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien y sobre todo por su infinito amor. Gracias mamá por educarme e inculcar en mí el precioso don de la responsabilidad, te amo mamá.

A mi padre Santos, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me infundió siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis hermanos, a mi hermana Jacqueline por ser un ejemplo a seguir como profesionista, madre y mujer de gran corazón que me motiva a seguir caminando aún en los momentos difíciles; a mis hermanos Alberto y Saúl por su continuo apoyo y amor.

A mis amigos, Claudia García, Ana Flores, Leonardo Mora y Tania López por el apoyo y consejos en su momento. Los quiero mucho chicos.

A mis asesores y profesores, gracias por el tiempo, por el apoyo y la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional, en especial a la Dra. Maribel González Villa y a la QFB Iliana Alejandra Cortés Ortiz por la guía en el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo, a la M. en C. Andrea Ángela Becerril Osnaya, a la Química Benita Pilar Torres Mazadiego y a la Química America Mandujano Martínez por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas.

A todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡Gracias!

Índice general

1.	Índice de figuras	7
2.	Índice de tablas	8
3.	Abreviaturas	9
4.	Resumen	11
5.	Introducción	13
5.1.	Antecedentes históricos de tuberculosis	13
5.2.	Definición: Tuberculosis	14
5.3.	Características del agente etiológico <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
5.4.	Epidemiología	15
5.4.1.	Tuberculosis en el mundo	15
5.4.2.	Tuberculosis en América Latina	17
5.4.3.	Tuberculosis en México	17
5.5.	Transmisión de la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
5.6.	Signos y síntomas de TB pulmonar	19
5.7.	Diagnóstico: Identificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
5.7.1.	Microscopía y cultivo	20
5.7.2.	Pruebas bioquímicas	22
5.7.3.	Pruebas moleculares	23
5.8.	Ácido ribonucleico (RNA)	24
5.8.1.	RNA ribosómico (rRNA)	25
5.8.2.	RNA de transferencia (tRNA)	25
5.8.3.	RNA mensajero (mRNA)	25
5.9.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
5.9.1.	PCR en tiempo real (qPCR)	28
5.9.2.	RT-PCR y qRT-PCR	30
5.10.	Complejo antigénico 85 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31
5.11.	Tratamiento antituberculoso	32
6.	Justificación	34
7.	Hipótesis	34
8.	Objetivos	35
9.	Materiales y equipo	36
9.1.	Material biológico	36

9.2.	Reactivos y soluciones	36
9.3.	Equipo	37
9.4.	Insumos	38
10.	Procedimiento experimental	40
10.1.	Extracción de RNA total Trizol-LS (PE1)	40
10.2.	Extracción de RNA total con QIAamp por columnas (PE2)	41
10.3.	Extracción de RNA total Trizol-LS fenol ácido 1 (PE3)	42
10.4.	Extracción de RNA total Trizol-LS fenol ácido 2 (PE4)	43
10.5.	Extracción de RNA total Trizol-LS fenol ácido 3 (PE5)	44
10.6.	Extracción de RNA total Trizol-LS fenol ácido 4 (PE6)	45
10.7.	Determinación de la integridad del RNA total extraído de <i>M. tuberculosis</i>	47
10.8.	Amplificación y detección de la secuencia 16S rRNA de <i>M. tuberculosis</i>	47
10.9.	Amplificación por qRT-PCR del mRNA del Ag85B de <i>M. tuberculosis</i>	48
10.10.	Inhibición de la qRT-PCR con RNasa	50
10.11.	Detección de DNA contaminante por PCR punto final	50
11.	Resultados	52
11.1.	Detección de la integridad del RNA total	52
11.2.	Detección del gen 16S rRNA	52
11.3.	Amplificación del Ag85B a partir de mRNA por qRT-PCR	53
11.4.	Determinación de la ausencia de DNA en extractos de RNA total	55
11.5.	Detección del mRNA de <i>M. tuberculosis</i> por qRT-PCR en muestras clínicas	55
12.	Discusión	57
13.	Conclusiones	61
14.	Referencias bibliográficas	62

1. Índice de figuras

Figura 1. Microfotografía del bacilo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
Figura 2. Incidencia de tuberculosis en el mundo	16
Figura 3. Nucleótido de ácido ribonucleico	24
Figura 4. Etapas durante la amplificación exponencial de un fragmento de DNA por PCR	27
Figura 5. Representación esquemática de PCR en tiempo real	29
Figura 6. Fases que conforman en gráfico de amplificación por PCR en tiempo real	29
Figura 7. Síntesis de cDNA	31
Figura 8. Diagrama de trabajo	39
Figura 9. Electroferograma Nusive al 1% de la integridad del RNA total	52
Figura 10. Electroferograma del amplicón correspondiente al gen 16S rRNA	53
Figura 11. Curva de amplificación para el gen Ag85B mediante qRT-PCR	54
Figura 12. Electroferograma para la detección de la secuencia IS6110 como indicador de DNA contaminante	55
Figura 13. Curva de amplificación para el gen Ag85B mediante qRT-PCR	56
Figura 14. Curvas de amplificación para las muestras clínicas mediante qRT-PCR	56

2. Índice de tablas

Tabla 1. Pruebas bioquímicas diferenciales de micobacterias responsables de TB en el hombre	23
Tabla 2. Ubicación y funciones de las principales fracciones de RNA	25
Tabla 3. Composición de los ribosomas en células eucariotas y procariotas	25
Tabla 4. Fármacos de primera y segunda línea para tratar la TB	33
Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación del gen 16S rRNA por RT-PCR	47
Tabla 6. Condiciones de amplificación para la detección del gen 16S rRNA	48
Tabla 7. Mezcla de reacción para detectar el mRNA del Ag85B por qRT-PCR	49
Tabla 8. Mezcla de reacción para la detección de RP	49
Tabla 9. Condiciones de amplificación para la detección del mRNA Ag85B	50
Tabla 10. Condiciones de incubación para la activación de RNasa	50
Tabla 11. Mezcla de reacción para la detección de DNA contaminante por PCR	51
Tabla 12. Condiciones de amplificación para la detección de DNA contaminante	51
Tabla 13. Tamaño del fragmento generado por los iniciadores para el Ag85B	54

3. Abreviaturas

Ag85B: Antígeno 85B

a.C.: antes de Cristo

BCG: Bacilo Calmette Guerin

Ct: ciclo de amplificación

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

DEPC: Dietil Pirocarbonato

DOT: *Directly Observed Treatment*

InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

INH: isoniazida

L-J: Lowenstein–Jensen

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MTBC: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización panamericana de la salud

PAS: ácido para-aminosalicílico

PBS: Regulador de fosfatos

PE1: Protocolo de extracción 1

PE2: Protocolo de extracción 2

PE3: Protocolo de extracción 3

PE4: Protocolo de extracción 4

PE5: Protocolo de extracción 5

PE6: Protocolo de extracción 6

PZA: pirazinamida

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción
inversa

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

RIF: rifampicina

rRNA: ácido ribonucleico ribosomal

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida

TAES: Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado

tRNA: ácido ribonucleico de transferencia

TB: tuberculosis

TBE: Regulador Tris-Boratos-ácido etilendiaminotetraacético

TE: Regulador Tris-ácido etilendiaminotetraacético

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

4. Resumen

Hasta hoy la tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas más importantes que asolan la humanidad. La OMS reporta que en 2010 hubo en el mundo 8,8 millones de casos nuevos de TB activa y 1,1 millones de fallecimientos por la infección en personas seronegativas para VIH y otras 350 000 muertes por TB asociada con VIH. En los últimos años la aparición y diseminación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) resistentes a múltiples fármacos dificulta su control. Aunque esto es especialmente grave en países de escasos recursos económicos, los flujos migratorios masivos actuales están afectando a los países denominados de primer mundo. Por ello, la demora en el diagnóstico de la enfermedad y la resistencia a múltiples fármacos representa uno de los mayores obstáculos para su control a escala mundial, (1, URL¹).

Los métodos convencionales para el diagnóstico de *M. tuberculosis* son el cultivo y la baciloscopia. La baciloscopia resulta rápida, sin embargo el cultivo de este microorganismo de lento crecimiento requiere por lo menos de 4 semanas para reportar una prueba positiva, con lo cual resulta inconveniente seguir el tratamiento ya que los cultivos y las secreciones resultan negativos después de 2 o 3 meses de tratamiento aunado a ello se ha demostrado la presencia del DNA de *M. tuberculosis* en esputo aun después de 12 meses del tratamiento (2).

Las pruebas moleculares resultan rápidas, sensibles, confiables y específicas en la detección génica y epidemiológica es así como la amplificación de DNA por PCR ha sido ampliamente aceptada en la detección de la infección por *M. tuberculosis* y genotipificación, sin embargo tiene como limitante la incapacidad de distinguir entre organismos viables y no viables, (5). Por ello, se ha propuesto en el presente trabajo la detección de mRNA (RNA mensajero) micobacteriano ya que este tiene un tiempo de vida media muy corto y es más lábil que el rRNA (RNA ribosomal) y el DNA, por lo cual, su presencia evidencia organismos viables, (6). La amplificación y detección del mRNA del antígeno 85B (Ag85B) se llevó a cabo siguiendo la síntesis de cDNA por qRT-PCR en tiempo real amplificando una región de 130 pb, (3, 4).

En el departamento de Biología Molecular, del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), se llevó a cabo la estandarización de la técnica de qRT-PCR para el diagnóstico y seguimiento al tratamiento de tuberculosis empleando la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* y 25 muestras respiratorias (Expectoraciones y lavados bronquiales) de pacientes con sospecha clínica de TB pulmonar. El templado íntegro de

RNA total para aplicar la qRT-PCR se obtuvo después de probar diferentes técnicas de extracción sobre la cepa H37Rv, lo que permitió proseguir el estudio sobre las muestras clínicas. El aislamiento y detección del mRNA muestra una gran capacidad diagnóstica como indicador de viabilidad de *Mycobacterium tuberculosis* después de lograr su detección con valores de Ct (ciclo de amplificación) entre 29-38 para la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* y al menos 1 muestra clínica.

5. Introducción

5.1. Antecedentes históricos de tuberculosis

La tuberculosis acompaña al hombre desde la más remota antigüedad, siendo nombrada a lo largo de la historia como tisis (phtisis) por los griegos, consunción por los ingleses y peste blanca por Oliver Wendell Holmes. Hasta que en 1839 fue nombrada tuberculosis por Shoenlein de Zurich; vocablo hasta hoy día empleado que deriva del latín “tuber”: tuberculum que significa pequeña protuberancia o tumor pequeño y “osis” que denota enfermedad, (9, URL²).

El término “tisis” aparece primero en la literatura griega. Alrededor del año 460 a.C. Hipócrates la identificó como la enfermedad más diseminada de todos los tiempos, y notó que era casi siempre fatal. En la era hipocrática se le dio mucha importancia y aunque aún no era muy clara su diseminación ya se empezaba a especular sobre su posible transmisión vía aérea, (10).

Entre los registros más antiguos de la enfermedad se reportan lesiones del mal de Pott, (tuberculosis extrapulmonar que afecta la columna), en un esqueleto que data de 5000 años a.C. localizado en 1907 cerca de Heidelberg; el hallazgo de la momia de un niño en 1973 en Perú en torno a 700 años a.C. donde por la técnica de Ziehl Neelsen se demostró la presencia de múltiples bacilos ácido alcohol resistentes y la evidencia por PCR de TB pulmonar en momias de más de 1000 años de antigüedad en 1990 por arqueólogos peruanos y norteamericanos al sur del Perú, (11).

De manera que aún con los conocimientos disponibles, los intentos por decrecer la prevalencia de tuberculosis en el mundo resultan insuficientes ante su resurgimiento a fines del siglo pasado en la mayoría de los países en desarrollo y desarrollados, a causa de la pandemia del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) el aumento de poblaciones vulnerables, migraciones derivadas de guerras y hambrunas, y al descuido en que cayeron los programas de control en la mayoría de los países. En un principio se pensó que el advenimiento de una quimioterapia eficaz acabaría el problema casi espontáneamente, desgraciadamente las expectativas no se cumplieron. Más aún, el mal uso de medicamentos, ha potenciado el fantasma de una nueva epidemia, la tuberculosis multifarmacorresistente, (12).

5.2. Definición: Tuberculosis

La tuberculosis se define como una enfermedad social infecto-contagiosa bacteriana de distribución mundial con presentación clínica variable de larga evolución, transmisible y curable producida por *M. tuberculosis*, bacteria capaz de causar necrosis tisular sobre diferentes órganos con predilección pulmonar, (URL³).

5.3. Características del agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis puede deberse a cualquiera de los seis microorganismos que integran el MTBC (*M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida la cepa BCG), *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi*). Sin embargo, la enfermedad es comúnmente producida por la especie *M. tuberculosis* o bacilo de Koch, cuyo descubrimiento se dio el 24 de marzo ("Día Mundial de la Tuberculosis") de 1882 por Heinrich Hermann Robert Koch (1843-1910), (12).

Tras el descubrimiento del agente causal de la tuberculosis se inicia la identificación de micobacterias, dando paso a su clasificación en 1896 por Lehmann y Neumann dentro del género *Mycobacterium* que hoy día incluye a *Mycobacterium leprae*, MTBC y micobacterias atípicas. La especie *M. tuberculosis* se incluye taxonómicamente dentro del género *Mycobacterium*, familia Mycobacteriaceae, orden Actinomycetales a la que pertenecen ya más de 150 micobacterias saprófitas y patógenas, (URL⁴, 13).

M. tuberculosis es una bacteria en forma de bacilo, estructuralmente determinada como Gram positiva débil, considerado un parásito intracelular, transmitido por vía respiratoria con capacidad de diseminarse vía hematógena, ácido-alcohol resistente, aerobio estricto, inmóvil, con una longitud de 1 a 4 micras y de 0.3 a 0.6 micras de diámetro, capaz de crecer en grupos paralelos llamados factor cordal, figura 1, (14).

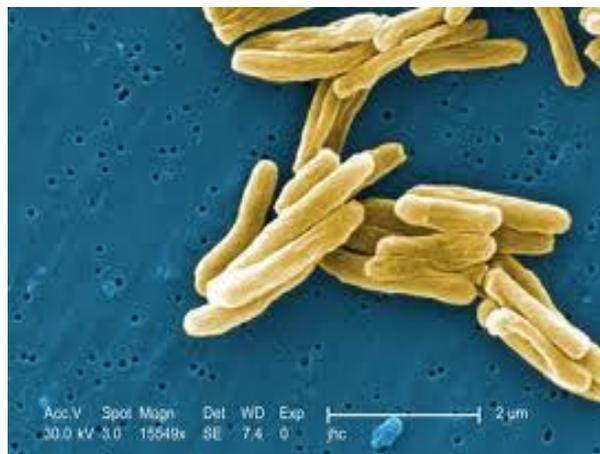


Figura 1. Microfotografía del bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de referencia (URL¹⁰)

Su compleja pared celular con ácido N-glicolilmurámico y su alto contenido en lípidos complejos le hace poco vulnerable a la mayoría de los agentes químicos. Esta pared lipídica también es responsable de sus características biológicas, como la dificultad para ser destruido por macrófagos, su resistencia frente a bajas temperaturas, la desecación y su lento crecimiento debido a la superficie celular hidrófoba que induce la formación de grumos, por lo que los nutrientes ingresan con dificultad al bacilo. Sin embargo, resulta muy sensible al calor, la luz solar y a la luz ultravioleta. Por lo que se recomienda que los enfermos tuberculosos se localicen en habitaciones bien ventiladas y soleadas. El crecimiento de *M. tuberculosis* depende de la presencia de oxígeno y el pH circundante. Las condiciones ideales de multiplicación las encuentra a un pH de 7.3-7.4 y a una presión de oxígeno de entre 100 y 140 mmHg. Por lo que aún en sus mejores condiciones se multiplica en un tiempo de 14 a 24 hrs según el ambiente que le rodee, observándose colonias a las 3-8 semanas después en cultivo. Esta particularidad es el origen de una clínica muy poco específica, de lenta instauración y con tendencia a la cronicidad, lo que conlleva generalmente a consultas y diagnósticos tardíos, (URL⁴). Cuando *M. tuberculosis* se encuentra en una situación ambiental desfavorable, como en disminución de la tensión de oxígeno y pH bajo, o acciones de fármacos antituberculosos, entra en un estado latente, pudiendo demorar en multiplicarse desde varios días hasta varios años y persistir en ese estado en las lesiones, con un metabolismo mínimo, por tiempo indefinido. Esta latencia es uno de los principales condicionantes de la prevalencia de la endemia, porque determina un gran reservorio de infectados sanos, sobre los que es muy difícil intervenir, (15).

5.4. Epidemiología

5.4.1. Tuberculosis en el mundo

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró en abril de 1993 que la tuberculosis había adquirido carácter de urgencia mundial, principalmente debida a la falta de atención sobre la enfermedad por parte de los gobiernos, con programas de control mal administrados, además del crecimiento demográfico y vínculo entre la tuberculosis y el SIDA, (17). De acuerdo a los datos de la OMS, cerca de la tercera parte de la población mundial está infectada con el bacilo *M. tuberculosis*, (Figura 2). Aunque, el riesgo de desarrollar la enfermedad activa varía entre el 5-10% en los países desarrollados y entre el 10-20% o más en los países en desarrollo. Sin embargo, en condiciones especiales puede incrementarse de forma considerable. Actualmente se

estima que es del orden del 50% para los coinfectados con el bacilo de Koch y el virus del SIDA al no estar protegidos por modernos tratamientos antirretrovirales.

Se estima que 3 de cada 10 personas están infectadas con el bacilo de la tuberculosis de las cuales una padecerá tuberculosis activa, la cual si no es tratada, será capaz de infectar en promedio de 10 a 15 personas por año, (20).

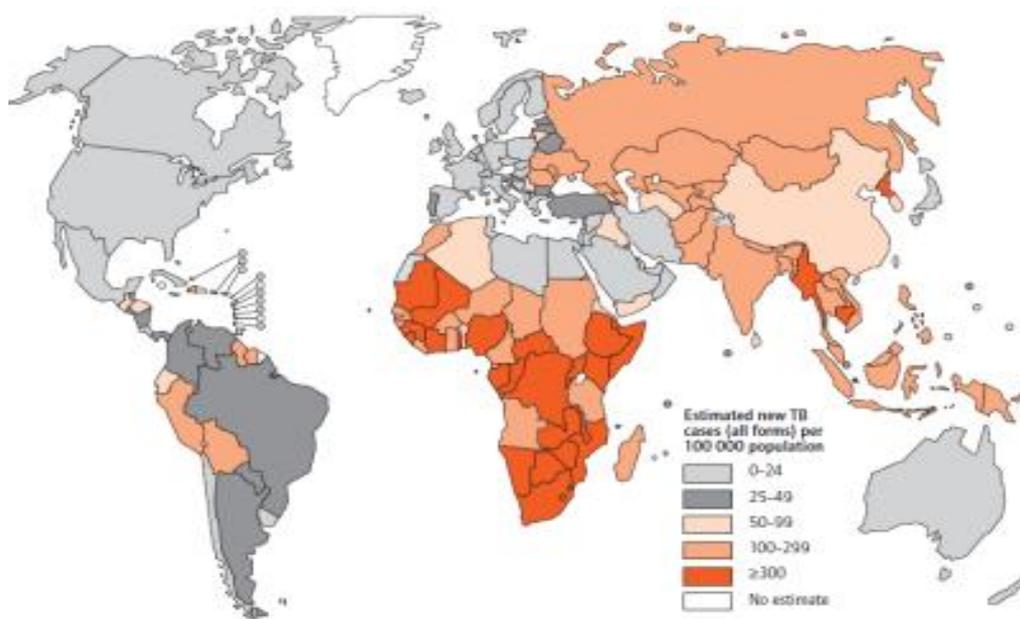


Figura 2. Incidencia de tuberculosis en el mundo. Tomado de referencia (URL⁸).

Se proyecta que en los próximos 10 años la tuberculosis matará a 30 millones de personas, afectará a 90 millones de individuos y cientos de millones se sumarán a los casi 2 mil millones de personas ya afectadas. Tan importante ha sido el incremento de casos nuevos en los últimos años, que dicha enfermedad no sólo ataca a las naciones más pobres, sino también a países ricos que cuentan con un mejor control de salud, donde la enfermedad se está concentrando en poblaciones vulnerables como inmigrantes y personas con exclusión social, (17).

En términos globales se reportan aproximadamente cada año alrededor de 8 a 12 millones de casos nuevos y de 3 a 5 millones de muertes atribuidas a dicha enfermedad representando cerca de 7% de todas las defunciones en el mundo. Se valora que la prevalencia global es superior a 70 por cada 100 mil habitantes aunque es mucho mayor en ciertas zonas geográficas y grupos de riesgo, como en algunos países africanos donde llega a ser mayor a 300 por 100 mil habitantes. En cuanto a incidencia, a pesar de que los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reflejan globalmente una

disminución en los índices de casos nuevos de tuberculosis, algunos países dado su crecimiento poblacional mantienen elevadas sus cifras absolutas, tal es el caso de África que ocupa el primer lugar al albergar a 13% de la población mundial con tuberculosis y a 13 de los 15 países con mayor incidencia, en segundo lugar esta Asia y finalmente América Latina en tercer lugar al albergar de 250 a 300 mil nuevos casos, (18).

5.4.2. Tuberculosis en América Latina

De los 8 a 12 millones de casos nuevos que se presentan en el mundo, cerca de 564 mil ocurren en América Latina y de los 3 a 5 millones de muertes atribuidas a dicha enfermedad, alrededor de 250 mil ocurren en esta región. Donde Brasil, Perú y México son los países que tienen las mayores incidencias. Se estima que los casos nuevos en la región americana fluctúan entre 1,000 a 99,999 por año con una incidencia de 37 y una prevalencia de 44 casos por 100 mil habitantes por año, respectivamente, (19).

5.4.3. Tuberculosis en México

En la población mexicana el comportamiento de la tuberculosis en los últimos 4 años ha obedecido a un aumento del número de casos reportados. De acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, para el año 2006 se reportaron 16,404 casos; para el año 2007 17,329 casos; para el año 2008, 18,210 casos, en el año 2009, 18,011 casos y para el 2010, 18,848 casos. Donde los estados de Baja California, Chiapas, Nuevo León y Veracruz, presentan las tasas de incidencia más altas, (18).

Según un reporte editado por el Comité Nacional de Lucha contra la Tuberculosis y enfermedades del aparato respiratorio, mueren 5 mil mexicanos al año por esta enfermedad y se infectan otros 1,000 diariamente. En el 2010 se reportaron 18, 848 casos nuevos de tuberculosis en todas sus formas, de los cuales 15,384 eran casos nuevos de tuberculosis pulmonar. En cuanto al número de defunciones en 2009 se reportaron 2,164 y para el 2010 éstas aumentaron a 2,222 de las cuales 1,872 casos fueron debidos a tuberculosis pulmonar (84%), (20, URL⁸).

5.5. Transmisión de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa y transmisible de distribución universal. El mecanismo de transmisión más importante responsable de casi la totalidad de los contagios, es la vía aérea. El hombre enfermo, al hablar, cantar, reír, estornudar y, sobre todo al toser, elimina microgotas en forma de aerosoles, cargadas de micobacterias. Por lo tanto, cuando una persona inhala aire contaminado con micobacterias, estas llegan a

los pulmones y comienza la infección; sin embargo, no toda persona infectada desarrolla la enfermedad ya que la micobacteria puede permanecer en un estado de latencia por años sin causar el padecimiento, lo que se denomina infección latente por TB incapaz de ser transmitida a otras personas. No obstante, algunos individuos con infección latente pueden desarrollar la enfermedad, por lo que es importante indicar el tratamiento adecuado para eliminar las micobacterias, incluso durante una infección latente.

Para que el agente infeccioso sea transmisible por vía aérea, éste debe permanecer suspendido en el aire. Donde las partículas de mayor tamaño (mayor de 10 μm) que contienen más bacilos debido a su peso sedimentan y en caso de ser inhaladas se eliminan por el sistema mucociliar y la tos, en cambio las microgotas aerosolizadas (gotitas de Pflüger) de menor tamaño (5-10 μm), alcanzan las vías aéreas más proximales pero son atrapadas por las barreras de defensa del árbol traqueobronquial y luego fagocitadas por los macrófagos, siendo así, la principal fuente de transmisión de *M. tuberculosis* los núcleos de microgotas cargadas de bacilos que derivan de las gotas Pflüger denominadas partículas Wells, capaces de permanecer suspendidas en el aire por tiempo prolongado al sufrir un decremento en su tamaño a causa de la evaporación de la mayor parte de su contenido en agua, las cuales se transforman en partículas realmente infecciosas de 1-5 μm con la capacidad de alcanzar y depositarse en los alvéolos. Por lo tanto, debido a su pobre contenido en micobacterias (1 a 5 bacilos/microgota), en los contagios masivos, intrafamiliares, necesitarían ser inhaladas, simultánea o sucesivamente un mínimo de 10 a 200 microgotas para que tenga lugar la infección, tomando en cuenta la formación de 3000 gotitas infecciosas en un estornudo, (URL⁴).

El potencial de infectividad de un enfermo depende de los siguientes factores:

- Grado de extensión de la enfermedad. Los más contagiosos son los enfermos con baciloscopias positivas y los portadores de tuberculosis pulmonares cavitarias.
- Severidad y frecuencia de la tos, ya que son más contagiosos los pacientes que presentan una tos exacerbada capaces de generar mayor cantidad de microgotas.
- Quimioterapia antituberculosa, donde son cincuenta veces menos infectantes los casos en tratamiento. Se suele aceptar que el enfermo deja de contagiar a las dos semanas de iniciada la quimioterapia, sin embargo en pacientes hospitalizados,

sólo se debe levantar su aislamiento cuando se haya negativizado la baciloscopia.

- Características y duración de la exposición. Depende de factores, como la concentración de bacilos en la atmósfera con mayor riesgo en habitaciones pequeñas y cerradas, de la ventilación en la habitación, y de la cercanía y tiempo de contacto con el enfermo, existiendo mayor riesgo en contactos íntimos y prolongados, (URL⁴, URL⁶).

Factores de riesgo para adquirir la infección:

- Estar en contacto con un caso cercano de tuberculosis: Este es el factor más común de contagio de la enfermedad, donde cerca de un 42% de las personas infectadas documentan el contacto con un caso.
- Contacto institucional y ocupacional: Alrededor de un 10% de los casos notificados presentan historia de institucionalización, ya sean prisiones, albergues o instituciones mentales y cerca de un 6% de los casos en países desarrollados documentan el contacto institucional, (URL¹⁶).

5.6. Signos y síntomas de TB pulmonar

La tuberculosis latente como bien ya se mencionó no es contagiosa y carece de sintomatología clínica. Por otra parte la TB es una enfermedad cuyas manifestaciones clínicas no permiten diferenciarla de otras entidades nosológicas. La mayoría de los casos son de inicio insidioso, poco alarmante y bastante variable, dependiendo de la virulencia del agente causal, el órgano afectado y el estado inmunitario del huésped (URL⁶). Por lo cual los síntomas pueden dividirse en 2 grupos:

- Sistémicos:
 - debilidad o fatiga
 - pérdida de peso
 - falta de apetito
 - fiebre
 - diaforesis nocturnas
 - escalofríos
- Específicos de órgano: Varían según la localización de la enfermedad, donde la tuberculosis pulmonar presenta, (URL⁷, 44):
 - tos seca intensa con posterior expectoración durante 3 o más semanas
 - Dolor en pecho
 - Hemoptisis
 - Disnea/sibilancia

5.7. Diagnóstico: Identificación de *Mycobacterium tuberculosis*

El diagnóstico de la infección causada por *M. tuberculosis* sigue el mismo procedimiento que el de otras bacterias: examen directo, cultivo e identificación, además del estudio de sensibilidad a los fármacos antituberculosos cuando está indicado. De modo que el diagnóstico de certeza de la TB sólo puede conseguirse con técnicas microbiológicas, que lamentablemente no son sensibles al 100%, por lo que en alrededor de un 10-15% de los casos estas técnicas serán negativas, a pesar de que corresponderán a TB. Muchas veces resulta difícil establecer el diagnóstico, a tal punto que varios autores la catalogan como “la gran simuladora”, presentándose muchas veces cuadros clínico atípicos e inusuales, que desconciertan al médico en cuanto a la orientación diagnóstica. En esos casos, el diagnóstico se basará en la clínica, la epidemiología y las técnicas de imagen, sin embargo no aportan siempre datos patognomónicos que permitan su diagnóstico, (21).

De modo, que para establecer el diagnóstico de laboratorio se han utilizado dos enfoques con diversos tipos de abordaje metodológico:

- Enfoque directo: Detección directa del microorganismo
 - a. La detección de la micobacteria por microscopía o cultivo.
 - b. Detección e identificación de antígenos micobacterianos.
 - c. Técnicas de biología molecular: RT-PCR y PCR
- Enfoque indirecto: Detección indirecta del microorganismo al medir la inmunidad del huésped contra el agente patógeno por:
 - a. Inmunidad humoral, a través de la detección de anticuerpos contra la bacteria.
 - b. Inmunidad celular, a través de pruebas cutáneas, (22, 23).

Cabe destacar que todas las técnicas microbiológicas son muy específicas, pero su sensibilidad esta estrechamente ligada a la calidad y el procesamiento de la muestra recogida.

5.7.1. Microscopía y cultivo

Los signos y síntomas resultan indicadores importantes de la enfermedad, sin embargo no son concluyentes para dar un diagnóstico definitivo, por lo cual son necesarias pruebas microbiológicas para el diagnóstico microbiológico convencional de la TB como la baciloscopia, el cultivo, la identificación de especie y antibiograma o pruebas de susceptibilidad.

- Microscopía

A pesar de los múltiples avances efectuados en los últimos años en el diagnóstico de la TB, la detección e identificación morfológica del bacilo ácido alcohol resistente por baciloscopia mediante la técnica de Ziehl-Neelsen continúa siendo la base del diagnóstico y seguimiento de la TB por su sencillez, rapidez, reproducibilidad en todos los ámbitos y bajo coste, y porque detecta los casos contagiosos de la comunidad, lo que constituye la base del diagnóstico y seguimiento de la TB; donde las opciones de tinción para las muestra son el colorante carbolfucsina (métodos de Ziehl-Neelsen o de Kinyoun) con el cual el bacilo presenta una coloración rojo brillante sobre un fondo azul; o con colorantes de auramina-rodamina fluorescentes (método del fluorocromo de Truant), donde la afinidad del bacilo por los fluorocromos le confieren una coloración amarilla o naranja brillante sobre un fondo verdoso oscuro.

La tinción de los bacilos va ligada a los ácidos micólicos de la pared micobacteriana, y éstos están presentes en el resto de las micobacterias y no se pierden cuando el bacilo muere. Por lo tanto, una baciloscopia positiva puede corresponderse con *M. tuberculosis* vivo o muerto (lo que puede dificultar su interpretación en el seguimiento de los enfermos en tratamiento), o con otra micobacteria. Su principal inconveniente es su moderada sensibilidad, que está condicionada por la localización y el grado de afectación de la enfermedad, la calidad de la muestra y el tiempo que dedica el observador para determinar que una baciloscopia es negativa. La sensibilidad puede incrementarse mediante la concentración de la muestra. Sin embargo, su especificidad es muy elevada, superior al 95%, tan sólo limitada por los falsos positivos que pueden aportar otras micobacterias ambientales o por otras causas técnicas muy infrecuentes. Por consiguiente, una baciloscopia negativa no descarta la TB, pero una baciloscopia positiva prácticamente la confirma en más del 95% de los casos y es indicativo de iniciar tratamiento, (44).

- Cultivo

El cultivo, otra técnica básica en el diagnóstico de la TB es el único método que puede asegurar con certeza la existencia de la enfermedad si se acompaña de identificación, y el único que es completamente válido para evaluar el seguimiento del paciente y garantizar su curación. Además, el cultivo es necesario para realizar otras 2 técnicas microbiológicas convencionales: la identificación y el antibiograma. Tiene mayor sensibilidad que la baciloscopia, sin embargo, el inconveniente es la larga espera

necesaria para obtener el resultado (superior a 2-4 semanas, incluso con los métodos más rápidos) y el complejo procesamiento de la muestra lo cual limita tremendamente su utilidad para la decisión clínica. Debido a ello frecuentemente el cultivo sólo confirma diagnósticos, no los realiza como base de la decisión clínica; en cualquier caso, debe realizarse siempre. Básicamente, hay 2 posibilidades de realizar los cultivos: en medio sólido y en medio líquido. El más utilizado y más barato es el medio sólido, sobre todo los preparados a base de huevo (Löwenstein-Jensen: L-J). Sin embargo, debido a las ventajas de una menor demora en obtener los resultados (2-4 frente a 3-8 semanas), la mayor sensibilidad y la posibilidad de automatización, poco a poco se han ido generalizando los medios líquidos, cuyo inconveniente es que tienen mayores tasas de contaminación (el 8-10 frente al 3-5%). En cualquier caso, su demora sigue siendo excesiva para la toma de decisiones clínicas. Aunque el cultivo se ha considerado siempre como la técnica de referencia del diagnóstico de la TB, hay que tener presente que algunos casos con baciloscopia positiva pueden tener un cultivo negativo por pérdida de viabilidad de los bacilos o por el proceso de descontaminación de la muestra. Por otra parte, pueden producirse contaminaciones del laboratorio que den lugar a falsos positivos. Todo ello, sin embargo, no invalida el papel principal del cultivo en el diagnóstico y seguimiento de la TB, (44).

La identificación preliminar de *M. tuberculosis* se realiza mediante la caracterización de las colonias luego de su recuperación por cultivo. La identificación del aislamiento depende de la velocidad de desarrollo, morfología, textura y pigmentación de las colonias. Para lo cual resulta conveniente optimizar su recuperación mediante la combinación de al menos un medio sólido y uno líquido para su cultivo. En medio sólido L-J las colonias de *M. tuberculosis* crecen a una temperatura de 37°C dando lugar a colonias rugosas, secas de aspecto cerebroide, excrecentes, opacas, polimorfas de dimensiones variables de color marfil, a diferencia de las colonias en medio líquido donde forman una película de coloración blanca o amarilla de aspecto liso en la superficie del medio, (16).

5.7.2. Pruebas bioquímicas

La identificación de especie confirma el diagnóstico de TB al permitir diferenciar el complejo *M. tuberculosis* del resto de micobacterias incapaces de producir TB en individuos sanos. Para ello la identificación de *M. tuberculosis* puede efectuarse por

técnicas bioquímicas que permiten diferenciarla de entre otras especies frecuentes que causan TB en el hombre (Tabla 1), proporcionando resultados hasta en 3 semanas, (16).

Tabla 1. Pruebas bioquímicas diferenciales de micobacterias responsables de TB en el hombre

Microorganismo	Temperatura Óptima (°C)	Morfología de las colonias	Niacina	TCH	Reducción de nitratos	Catalasa a 68°C	Hidrólisis de Tween 80	Ureasa	Pirazinamidas
<i>M. tuberculosis</i>	37	Rugosa	+	+	+	-	-	+	+
<i>M. bovis</i>	37	Rugosa/delgada	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. africanum</i>	37	Rugosa	-	V	-	-	-	+	+

TCH: Hidrazida de ácido tiofeno-2-carboxílico. Tomada y modificada de referencia (16)

La identificación de las micobacterias mediante métodos convencionales (velocidad y temperatura óptima de crecimiento, fotocromogenicidad, morfología colonial y pruebas bioquímicas) ha sido el estándar en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. Sin embargo, esta identificación fenotípica tiene notables limitaciones, ya que numerosas especies no pueden diferenciarse y el crecimiento lento de estos microorganismos hace que los resultados se demoren 2-4 semanas tras el aislamiento inicial, además de resultar a menudo ambiguos y difíciles de reproducir. Por ello, uno de los mayores retos de los laboratorios de micobacteriología consiste en lograr una identificación rápida y precisa de todas las especies micobacterianas, por lo cual, estudios de hoy día se enfocan en alternativas como las técnicas moleculares, (44, 45).

5.7.3. Pruebas moleculares

La complejidad de algunas técnicas bioquímicas y la demora en obtener los resultados han hecho que en la actualidad, en los países avanzados, se recomiende la identificación de micobacterias mediante técnicas moleculares, a partir de medios líquidos o sólidos lo cual permite establecer diagnósticos más rápidos (2-4 horas) y fiables; considerando para ello que las micobacterias cuentan con regiones bien conservadas del ADN específicas de género, que flanquean regiones hipervariables específicas de especie. Por ello el grupo de técnicas de mayor interés y desarrollo que se aplican hoy día que permiten tales diferenciaciones resultan ser: PCR-RFLP, secuenciación de DNA, qPCR, PCR y RT-PCR, implementadas a menudo para lograr la diferenciación entre micobacterias del complejo de *M. tuberculosis* de otras micobacterias no tuberculosas, (45). Dentro del complejo *M. tuberculosis*, la diferenciación de las diversas variantes puede realizarse mediante pruebas bioquímicas clásicas como la reducción de nitratos y la sensibilidad a pirazinamida o mediante PCR-RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) a la secuencia IS6110 que resulta ser el método de referencia

para identificar cepas individuales de *M. tuberculosis*, donde la secuencia de inserción IS6110 se encuentra altamente conservada en el DNA de las micobacterias pertenecientes al complejo, presentando numerosas copias en el cromosoma del bacilo (10-20), en localizaciones muy variables. Por otro lado la simple PCR dirigida a la secuencia IS6110 resulta una técnica de referencia en el diagnóstico de la TB al diferenciar a los miembros del complejo de *M. tuberculosis* de otras micobacterias no tuberculosas, refiriendo una mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de TB en el humano.

Cada método de aproximación taxonómica tiene su utilidad y ninguno por si solo puede dar un resultado seguro al 100%. Las características fenotípicas clásicas son útiles inicialmente para decidir la cronología de los medios de identificación a utilizar, pero no resultan definitivos, (44).

5.8. Ácido ribonucleico (RNA)

El ácido ribonucleico es un ácido nucleico presente en toda célula como una macromolécula no ramificada de cadena simple, excepto en algunos virus. Su síntesis deriva de un molde de DNA (Ácido desoxirribonucleico) mediante el proceso de transcripción por lo cual su secuencia nucleotídica es complementaria a la secuencia de desoxirribonucleótidos del DNA. Se compone por una serie de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster en dirección 3'-5', cuya estructura base es un nucleótido que se compone de un azúcar ribosa (pentosa), un grupo fosfato y una de cuatro posibles bases nitrogenadas, adenina (A), uracilo (U), citosina (C) o guanina (G), figura 3, (24).

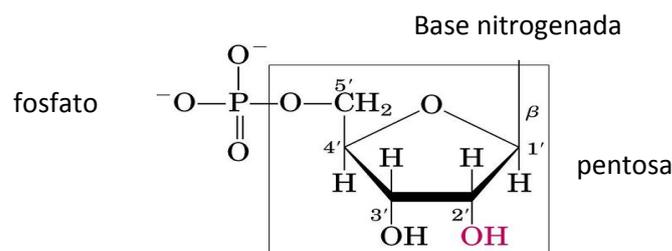


Figura 3. Nucleótido de ácido ribonucleico. Tomado de referencia (URL¹¹)

Existen tres clases principales de moléculas de RNA celular presentes en eucariotas y procariontes durante la expresión de la información genética. Los diferentes RNAs difieren entre ellos por su tamaño según el número de nucleótidos que contiene, función y estabilidad, tabla 2, (25).

Tabla 2. Ubicación y funciones de las principales fracciones de RNA

Clase de RNA	Porcentaje respecto al RNA		Tipo celular	Localización y función
	total (%)			
RNA ribosómico (rRNA)	80		Procarionte y eucarionte	Citoplasma: Componente estructural y funcional del ribosoma.
RNA de transferencia (tRNA)	15		Procarionte y eucarionte	Núcleo y citoplasma: Ayuda a incorporar los aminoácidos a la cadena polipeptídica.
RNA mensajero (mRNA)	5		Procarionte y eucarionte	Citoplasma: Es portador del código genético para las proteínas.

Tomado de referencia (26).

5.8.1. RNA ribosómico (rRNA)

El rRNA es la molécula de mayor tamaño entre los RNAs, según lo revela su coeficiente de sedimentación. Constituye aproximadamente el 80% del RNA total en una célula siendo un componente estructural importante de los ribosomas, cuya función se desarrolla durante la síntesis de proteínas durante el proceso de traducción. Las diferentes formas de rRNA presentes en procariontes y en eucariotes se diferencian inequívocamente por su tamaño, tabla 3, (26).

Tabla 3. Composición de los ribosomas en células eucariotas y procariontes

Tipo de célula	Tamaño del ribosoma	subunidad	Proteínas	Componentes del rRNA	Número de nucleótidos
Procarionte	70S	Pequeña: 30S	31	23S	2900
				5S	120
		Grande: 50S	21	16S	1500
Eucarionte	80S	Grande: 60S	49	28S	4700
				5.8S	160
		Pequeña: 40S	33	5S	120
				18S	1900

Tomado de referencia (26).

5.8.2. RNA de transferencia (tRNA)

El tRNA representa el 15% en una célula típica, es la clase más pequeña de las moléculas de RNA encargada de transportar los aminoácidos hasta los ribosomas durante la traducción. Su menor tamaño que oscila entre 75 y 90 nucleótidos facilita el que más de una molécula de tRNA interactúe simultáneamente con el ribosoma, (26).

5.8.3. RNA mensajero (mRNA)

Las moléculas de mRNA son el molde para la síntesis de proteínas, transportan la información genética desde el DNA del gen hasta el ribosoma, donde se produce la traducción. Los mRNA en procariontes son invariablemente policistrónicos y su longitud varía considerablemente, lo que refleja la variación del tamaño de la proteína codificada

por el mRNA y del gen que sirve de molde para la transcripción de esta molécula, (27). Representa aproximadamente el 5% del RNA total, cuyo porcentaje varía entre células. En organismos procariotas, los transcritos primarios de los genes que codifican para el mRNA se transcriben, traducen y degradan simultáneamente. Esto se debe a que el sitio de transcripción no está compartimentalizado dentro de un núcleo como sucede en los organismos eucariotas. En consecuencia, el mRNA de procariotas sufre poco procesamiento antes de llevar a cabo su función en la síntesis de proteínas lo que le confiere vulnerabilidad ante la degradación por ribonucleasas, ya que a diferencia del mRNA eucariota, el mRNA procariota no sufre de un procesamiento postranscripcional donde se adicionan estructuras de protección mediante poliadenilación en el extremo 3' y adición de estructuras cap (7-metilguanosina) en el extremo 5'. Es así que los mRNA en procariotas presentan una vida media corta que va de 30 segundos a 30 minutos, (16, 26).

5.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa resulta una alternativa para superar dificultades impuestas por pruebas de diagnóstico tardías y de poca sensibilidad para la detección de tuberculosis.

La PCR es una técnica, que permite la síntesis "in vitro" de secuencias específicas de DNA, donde cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas en sentido 5'-3' por una DNA polimerasa, (28).

Los componentes requeridos para llevar a cabo la técnica son:

- ❖ DNA blanco o molde
- ❖ Oligonucleótidos específicos (iniciadores)
- ❖ Mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs)
- ❖ Solución amortiguadora y cationes divalentes ($MgCl_2$)
- ❖ DNA polimerasa (Taq polimerasa)

La reacción de amplificación in vitro se basa en la repetición sucesiva de tres fases determinadas por temperaturas y tiempos específicos; por un periodo de 30-40 ciclos en promedio:

- ❖ Desnaturalización: En esta etapa se separan las 2 hebras complementarias del DNA blanco a una temperatura elevada (94-96°C por 30-60 segundos) para producir moléculas de DNA monocatenarias.

- ❖ La hibridación (Annealing): Durante esta etapa los iniciadores actúan como límite de la región de la molécula por amplificar al unirse a las regiones 3' complementarias que flanquean el fragmento de DNA blanco que se quiere amplificar (para ello la temperatura disminuye a valores entre 40-65°C por periodos comprendidos entre 20-40 segundos).
- ❖ Reacción de elongación o extensión: En esta etapa final a partir de los iniciadores la DNA polimerasa sintetiza una nueva hebra de DNA complementario en dirección 5'-3' a partir de la unión del extremo 3'-hidroxilo de los iniciadores apareados al DNA blanco de cadena sencilla con el grupo 5'-fosfato de los dNTPs libres, resultando nuevas cadenas complementarias (para ello se requiere una temperatura de 74-80°C por 30-60 segundos) (Figura 4).

Los productos de elongación se desnaturalizan de nuevo por calor y se repite el proceso, de manera que a cada ciclo el número de copias de DNA se desdobra, obteniéndose una síntesis exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA blanco sometido al proceso. Finalmente para conservar el producto amplificado es necesario mantenerlo a una temperatura de 4°C por periodo de 3 años, (URL¹⁵).

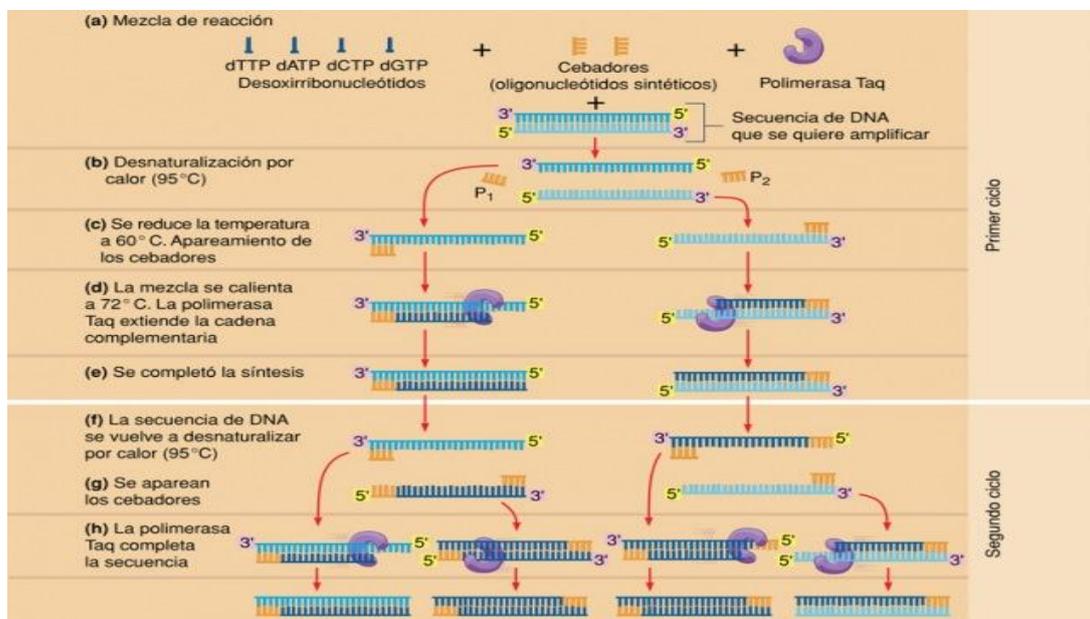


Figura 4. Etapas durante la amplificación exponencial de un fragmento de DNA por PCR. Tomado de referencia (URL¹²).

Todo el proceso de la PCR esta automatizado mediante un aparato llamado termociclador, el cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción, controlando la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción.

Para comprobar que la PCR ha generado el fragmento de DNA esperado, se emplean técnicas como la electroforesis, que permite separar los fragmentos de DNA generados de acuerdo a su tamaño. Por lo general se emplea la electroforesis en gel de agarosa para fragmentos grandes y acrilamida para fragmentos más pequeños así como electroforesis capilar, (29).

5.9.1. PCR en tiempo real (qPCR)

La PCR cuantitativa, qPCR (del inglés *quantitative polymerase chain reaction*) o PCR en tiempo real, es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual se amplifica y simultáneamente se cuantifica de forma absoluta el producto de amplificación. La mezcla de reacción de una PCR convencional, se complementa con una secuencia específica marcada con un fluoróforo (sonda). Es así, como el termociclador que alberga sensores para medir fluorescencia, permite calcular la emisión de fluorescencia del fluoróforo excitado a una longitud de onda apropiada como un indicador de la generación de productos específicos, (Figura 5). Dicha medición, se visualiza en un gráfico de amplificación por computadora luego de cada ciclo, en el cual se expresa una curva de amplificación que consta de 3 fases; donde la fase inicial muestra la producción de fluorescencia por debajo del nivel de detección del termociclador, la segunda fase muestra un incremento de la fluorescencia de manera exponencial y una tercera fase (plato) finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia, (figura 6), (URL¹⁵, 30).

TaqMan® Applied Biosystems

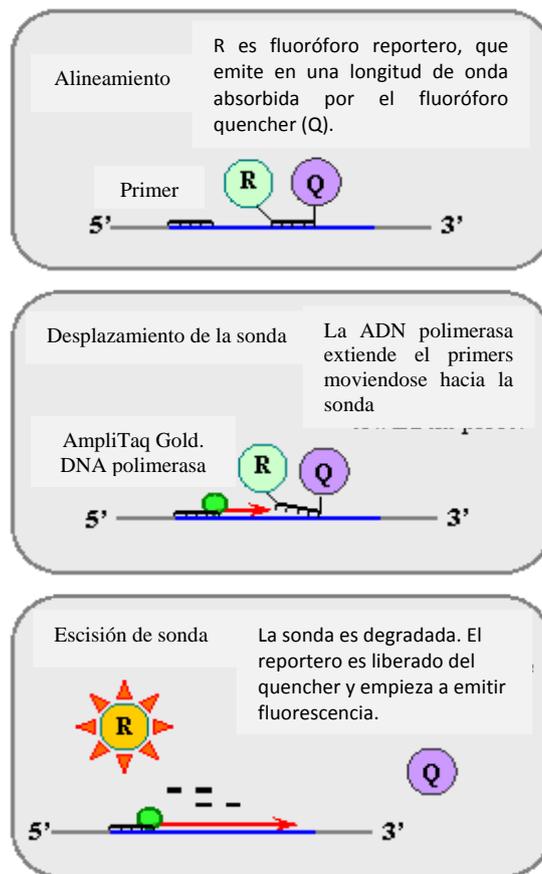


Figura 5. Representación esquemática de PCR en tiempo real. Tomado y modificado de referencia (URL¹³)

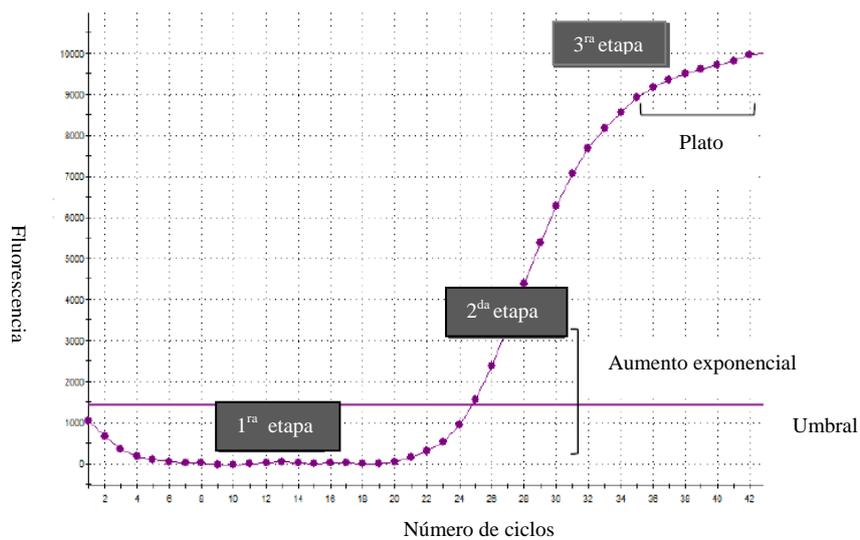


Figura 6. Fases que conforman en gráfico de amplificación por PCR en tiempo real. Tomado y modificado referencia (31).

5.9.2. RT-PCR y qRT-PCR

Las técnicas de hibridación molecular llamadas clásicas (Southern para DNA y Northern para RNA) no son suficientemente sensibles como para detectar cantidades extremadamente pequeñas de DNA o RNA. La amplificación por RT-PCR es una adaptación de la PCR que permite detectar y medir la acumulación de mRNA, monitoreando la síntesis del correspondiente DNA complementario (cDNA), (28).

Esta técnica se basa en la extracción del RNA de órganos, tejidos o células de estudio, aumentando el número de cadenas del ácido nucleico in vitro en cDNA monocatenario por la acción de una transcriptasa reversa. Las moléculas de cDNA obtenidas se utilizan como matriz en una reacción PCR usando como iniciadores, oligonucleótidos cuya secuencia es específica del RNA de interés. Los fragmentos sintetizados de DNA se visualizan por electroforesis en geles de agarosa.

Una modificación de la técnica descrita permite evaluar la cantidad relativa de RNA presente en una muestra dada, llamándose entonces PCR transcriptasa reversa cuantitativa (qRT-PCR). La técnica más elaborada y específica se basa en la utilización de una sonda fluorescente de secuencia complementaria a una región interna (entre los dos iniciadores usados para la RT-PCR) del RNA de objeto de estudio que permite detectar los productos de amplificación a medida que se van sintetizando. Esta sonda se conjuga covalentemente a un fluoróforo en su extremo 5'P y a un inhibidor de la fluorescencia en su extremo 3'-OH. Durante la fase de polimerización del cDNA la sonda se degrada (es desplazada, nucleótido a nucleótido, por la nueva molécula sintetizada de DNA), separándose el fluoróforo de su inhibidor produciéndose fluorescencia. Es así, que en la fase exponencial de la amplificación la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de cDNA sintetizado, figura 7, (28).

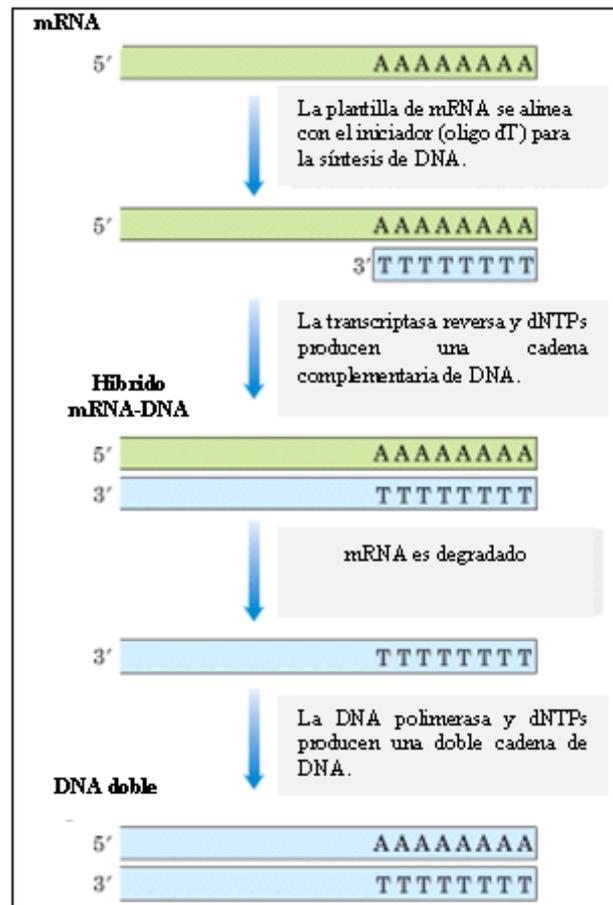


Figura 7. Síntesis de cDNA. Tomado y modificado de referencia (URL¹⁴).

5.10. Complejo antigénico 85 de *Mycobacterium tuberculosis*

Actualmente las técnicas que se emplean para el diagnóstico de la tuberculosis no son tan efectivas, es por ello que se realizan múltiples esfuerzos para poder caracterizar la función y composición de los antígenos de *M. tuberculosis* asociados con protección que conduzcan al desarrollo de métodos más efectivos y rápidos para el diagnóstico de la enfermedad en sus diversas etapas de evolución. Entre los antígenos secretados descritos como inductores de la secreción de mediadores asociados a protección contra la infección por *M. tuberculosis* está el Ag85B, (23).

El Ag85B, pertenece al complejo antigénico 85 de *M. tuberculosis*, conjunto de 3 enzimas (Ag85A, Ag85B y Ag85C con un peso de 32 KDa; 30 KDa y 38 KDa respectivamente) denominadas transferasas de ácido micólico expresadas y secretadas por el complejo *M. tuberculosis*. Las tres proteínas son ampliamente secretadas, sin embargo el Ag85B es la proteína que se secreta en mayor proporción, siendo el Ag85A el segundo en abundancia. Las tres enzimas se expresan en gran cantidad en macrófagos

infectados por *M. tuberculosis*, lo que le permite a la micobacteria mantener su integridad y crecimiento dentro de los fagosomas, después de ser ingeridas por los macrófagos.

Este complejo antigénico ayuda a mantener la alta hidrofobicidad e integridad de la pared celular de *M. tuberculosis*, mediante la transferencia de ácidos micólicos (sustancias hidrofóbicas) hacia la pared celular y estimulando la síntesis del factor cordal.

El complejo antigénico también es responsable de la alta afinidad de la bacteria por la fibronectina y la pared celular de la célula eucariota, debido a que los antígenos que lo conforman también son proteínas ligadoras de fibronectina permitiendo en el caso de las infecciones respiratorias la invasión del parénquima pulmonar por la micobacteria, (31).

5.11. Tratamiento antituberculoso

Desde el descubrimiento del agente causal de la TB por el Dr. Robert Koch, se han realizado esfuerzos en la búsqueda de un tratamiento eficaz que permita contrarrestarlo, adquiriendo grandes progresos en el conocimiento de su transmisión así como condiciones que favorecen la infección, (URL⁸).

El descubrimiento de la estreptomina en 1946 marcó la pauta para la búsqueda de nuevos medicamentos antituberculosos después de comprobar su ineficacia ante el desarrollo de cepas resistentes, es así como posteriormente a este antibiótico se sintetizaron varios más como el ácido para-aminosalicílico (PAS) que en conjunto con la estreptomina en 1950 solucionó temporalmente el problema de la resistencia del bacilo. Para 1951, el descubrimiento y eficacia de la isoniazida (INH) hizo posible considerar el uso de medicamentos antituberculosos en los programas de salud pública para el control de la TB, (URL⁵). Posteriormente en 1966, el aislamiento de la rifampicina (RIF) por Pietro Sensi, supuso una nueva revolución terapéutica al comprobarse en estudios experimentales una extraordinaria actividad contra todas las poblaciones bacilares que se complementaba con la actividad específica de la pirazinamida (PZA) contra la población bacilar intracelular. Estos hallazgos fueron la base de las llamadas pautas cortas de quimioterapia de tan solo 6 meses de duración recomendados aún en la actualidad para el tratamiento inicial de la TB, contribuyendo al desarrollo de programas adecuados de salud pública para la lucha antituberculosa como el TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) o en inglés DOT (*Directly*

Observed Treatment) que hoy día se aplica en todo el mundo, debido al impacto negativo del SIDA e incremento de resistencias y multirresistencias ante fármacos de primera línea (URL²).

La OMS a nivel global y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en Latinoamérica han venido realizando grandes esfuerzos para ayudar y dar una respuesta a esta enfermedad mediante el desarrollo de programas en los que el paciente se incorpora a un régimen de administración estricta de fármacos, TAES. Si bien estos programas han sido exitosos, no son suficientes ante el hecho claro de que la incidencia de la tuberculosis se da con mayor fuerza en países con economías emergentes, afectando predominantemente a grupos sociales con bajos recursos, minorías étnicas y grupos sociales con difícil o nulo acceso a los elementales servicios de salud, siendo aún más grave el aumento de personas con estas características, (URL⁸, 32).

Con el tratamiento adecuado, la tuberculosis se puede curar en la mayoría de la gente, sin embargo el éxito del tratamiento (TAES) depende de la cooperación estrecha entre paciente y médico ya que exige un largo periodo que puede ir de los 6 a los 18 meses combinando para ello varios fármacos. El control estricto del tratamiento evita que las personas contagiadas de tuberculosis vuelvan a enfermar, contagiar la enfermedad a otros e incluso favorecer el alto grado de mutagenicidad y resistencia de los bacilos ante los fármacos estándar. De lo contrario proveedores de atención médica se ven en la necesidad de implementar el uso de nuevos medicamentos de manera prolongada, considerando que estos se dividen en agentes de primera y de segunda línea, tabla 4.

Tabla 4. Fármacos de primera y segunda línea para tratar la TB

Descripción	Fármaco	Abreviatura
Orales de primera línea	Isoniazida	H
	Rifampicina	R
	Etambutol	E
	Pirazinamida	Z
	Estreptomina	S
Bacteriostáticos orales de segunda línea	Etionamida	Eto
	Protionamida	Pto
	Cicloserina	Cs
	Teridizona	Trd
	Ácido para-aminosalicílico	PAS

Tomado de referencia (URL⁸).

Atendiendo el comportamiento micobacteriano, se establece que el adecuado tratamiento debe constar de 3 fases: Las dos primeras son de actividad bactericida, la primera para bacilos de reproducción rápida y la segunda para aquellos de reproducción lenta. Finalmente la tercera fase de esterilización busca la eliminación definitiva de la micobacteria.

6. Justificación

En México cada año se presentan cerca de 17 mil nuevos casos de TB y se reporta que en los últimos 20 años no ha bajado el número de éstos por lo que la tendencia sigue siendo estable, (URL¹¹). Considerando que es una enfermedad muy antigua para la cual existe diagnóstico y tratamiento, la prevalencia de la enfermedad indica que hay aspectos en su control que necesitan ser atendidos urgentemente. Una variable que complica el control de la tuberculosis es lo prolongado del tratamiento y la dificultad para detectar de manera temprana los casos que no están respondiendo de la manera esperada, por lo que no se cuenta con pruebas de laboratorio rápidas y específicas que permitan evaluar la eficacia del tratamiento. En algunos casos se ha garantizado y comprobado la efectividad del tratamiento una vez concluido; sin embargo, se reportan casos de reactivación después de 1 o más años posteriores a la terapia, con la presencia constante de DNA lo que dificulta la diferencia entre organismos viables y no viables. Así es como estudios relacionados con la tuberculosis optan por la detección del mRNA del Ag85B como el mejor candidato y por lo cual se sugiere en el presente trabajo el desarrollo de una qRT-PCR dirigida al mRNA dada la secreción del antígeno en grandes cantidades por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), así como la vida media corta y lo endeble del mRNA comparado con el rRNA y el DNA, favoreciendo con ello la detección de organismos viables y haciendo posible evaluar la latencia de la infección en individuos que terminaron con éxito el tratamiento monitoreando la reactivación del bacilo tuberculoso, (6, 7,8).

7. Hipótesis

Sí la presencia de mRNA del Ag85B de *M. tuberculosis* es indicativo de la forma viable de la micobacteria, entonces su extracción y detección en muestras clínicas provenientes de pacientes bacilíferos permitirá monitorear el tratamiento. Asimismo, podría fungir como probable indicador de una cepa viable no cultivable en el caso de una posible reactivación de tuberculosis o falla en el tratamiento por lo que podría tratarse en este último caso de una farmacorresistencia o multifarmacorresistencia hacia los antibióticos del tratamiento.

8. Objetivos

Objetivo general:

- Estandarizar y establecer la técnica de qRT-PCR para la detección del mRNA del antígeno 85B de *Mycobacterium tuberculosis* como un marcador de viabilidad bacteriana e identificación de posibles cepas resistentes al tratamiento a partir de muestras clínicas.

Objetivos particulares:

- Establecer las condiciones adecuadas de termociclado para la amplificación y detección del mRNA del antígeno 85B de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas mediante qRT-PCR.
- Establecer la técnica de extracción apropiada para el aislamiento del mRNA del antígeno 85B de *Mycobacterium tuberculosis* en base a las características de las muestras clínicas por analizar, determinando mediante electroforesis en gel la presencia de RNA total como guía.

9. Materiales y equipo

9.1. Material biológico

- Cepa H37Rv en medio Sauton
- Cepa H37Rv en medio Middlebrook (Ambas cepas proporcionada por el laboratorio de micobacterias del departamento de Bacteriología del InDRE)
- Muestras respiratorias que incluyen: Expectoraciones y Lavados bronquiales de no más de 6 horas después de su toma, recolectadas de 25 pacientes con cuadro clínico de una probable tuberculosis, provenientes del Hospital General de México.
- tRNA dilución 1:20
- Lisozima (100mg/mL)
- Sigma RNasa 10 mg/mL

9.2. Reactivos y soluciones

- Solución salina fisiológica
- Tritón 0.5%
- Regulador Tris-EDTA (TE): (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH = 8)
- Tween 80
- Trizol-LS
- Fenol ácido (pH= 6 , 5.4 y 4.5)
- Cloroformo
- Etanol 75% grado biología molecular
- Etanol absoluto grado biología molecular
- Dietil Pirocarbonato (DEPC)
- Alcohol isoamílico
- Isopropanol
- Acetato de sodio 50 mM
- Sarcocina 0.5%
- Desinfectante Surfanios
- Iniciador sentido MTB: 5´-TCAGGGGATGGGGCCTAG-3´
- Iniciador antisentido MTB: 5´-GCTTGGGGATCTGCTGCGTA-3´
- Sonda MTB: 5´- TCGAGTGACCCGGCATGGGAGCGT-3´(FAM)
- Iniciador sentido RNasa P : AGATTTGGACCTGCGAGCG

- Iniciador antisentido RNasa P : GAGCGGCTGTCTCCACAAGT
- Sonda RnaseP: TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG
- Iniciador sentido ISB2L : 5'-AGGTGCGGACCACCAGCACCTAACC-3'
- Iniciador antisentido ISB2L: 5'-GGATCCGCCAGCCCAGGATCCTGCG-3'
- SuperScript III Retrotranscriptasa, Platinum Taq polimerasa, One-Step quantitative RT-PCR System estuche comercial, Invitrogen by Life Technologies, USA
- Estuche commercial para la extracción de RNA total por columnas QIAamp, USA.
- Agua destilada estéril grado molecular (libre de RNasa y DNasa)
- Agua con DEPC
- Regulador TBE (Tris-Boratos-EDTA) 0.25X, pH= 6, 5.4, 4.5
- Marcador de peso molecular (VIII 0.019-1.11 kbp), ROCHE, USA.
- Agarosa tipo II al 2.5%
- Agarosa Nusive al 1%
- GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Intercalante de bases)
- Regulador de carga: Azul de bromofenol
- PBS (Regulador de fosfatos) pH= 6.7

9.3. Equipo

- Vórtex
- Sistema de detección PCR punto final
- Sistema de detección PCR tiempo real
- Centrifuga de alta velocidad refrigerada
- Gabinete de bioseguridad nivel 2
- Balanza digital
- Equipo para electroforesis horizontal sumergida (Cámara de electroforesis, soporte, peines, burbuja niveladora fuente de poder)
- Fotodocumentador
- Congelador de -70°C
- Congelador de -20°C
- Medidor de pH (Potenciómetro)
- Baño a 37°C

9.4. Insumos

- Tubos tipo eppendorf de 1.5 mL
- Puntas de 1000 μ L
- Puntas de 200 μ L
- Puntas de 10 μ L
- Micropipetas de 100-1000 μ L, 10-100 μ L, 0.5-10 μ L
- Gradillas (racks) refrigerante para tubos de 0.2 mL
- Perlas de vidrio 2 mm de diámetro esterilizadas.
- Guantes desechables sin talco
- Mascarilla
- Bata desechable
- Bata blanca
- Tubos cónicos de 50 mL
- Microtubos de 0.2 mL
- Tira de tubos de PCR de 0.2 mL
- Tapas de tiras ópticas

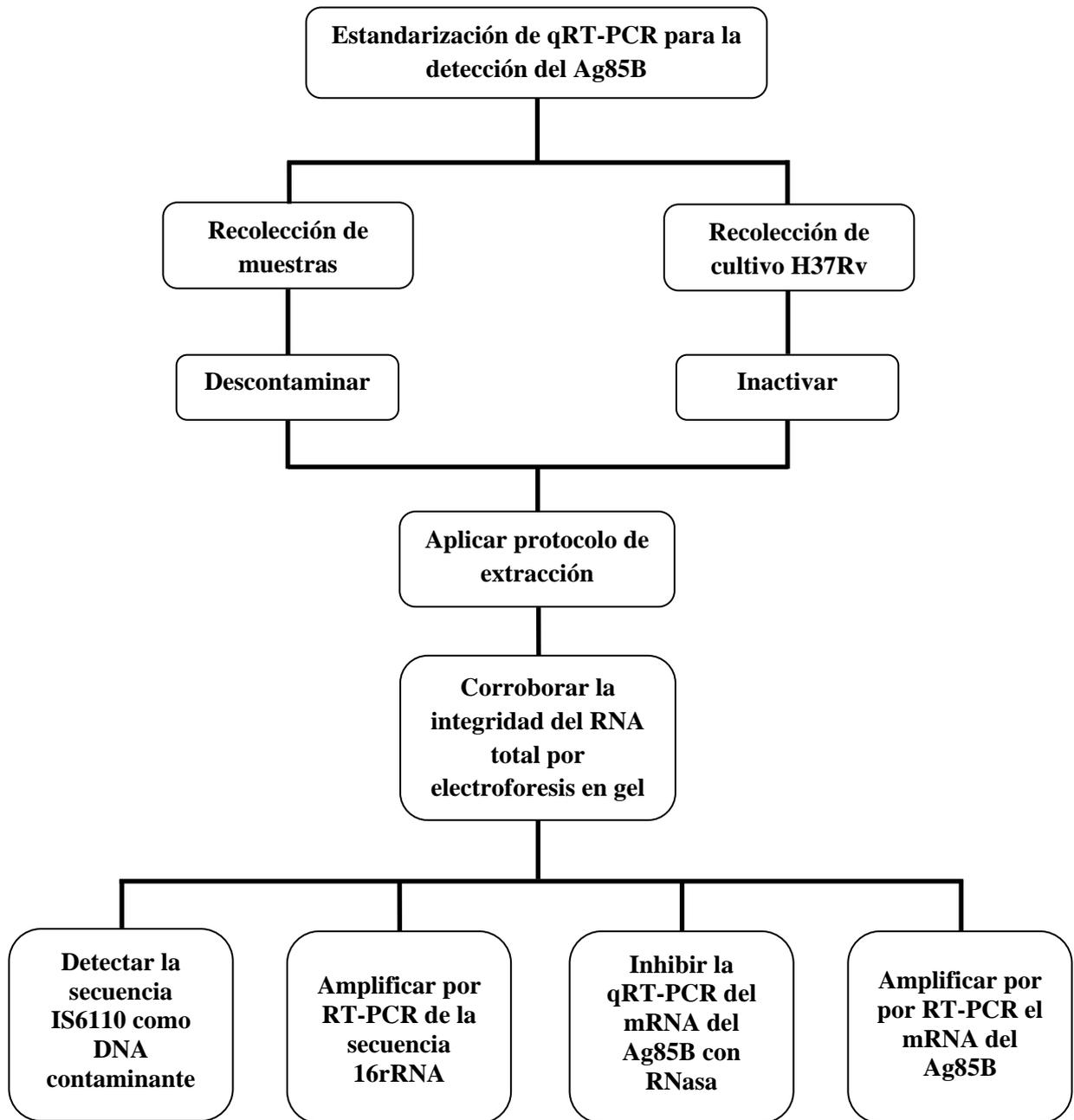


Figura 8. Diagrama de trabajo

10. Procedimiento experimental

Todos los procedimientos se realizaron bajo el uso de guantes. Las soluciones y reguladores se esterilizaron o filtraron en cada caso. Todo el material era nuevo o de lo contrario esterilizado y las soluciones comerciales, enzimas y reguladores eran grado biología molecular o grado analítico.

10.1. Extracción de RNA total Trizol-LS (PE1)

Para la extracción de RNA total de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* en medio Middlebrook 7H10, como primer paso se tomó una alícuota de 250 µl de agua grado PCR en un tubo tipo eppendorf de 1.5 mL, el cual fungió como blanco de extracción, posteriormente en un segundo tubo se tomó una alícuota de 50 µl de la cepa, la cual se llevó a un volumen final de 250 µl adicionando agua grado biología molecular. En seguida, se sometieron las alícuotas a calentamiento de 94°C en un termoblock por 30 minutos para inactivar la micobacteria. Como siguiente paso a cada alícuota se le incorporaron 750 µl de Trizol-LS frío y se les dió vórtex hasta observar una mezcla homogénea, la cual se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregó a cada alícuota un volumen de 200 µl de cloroformo-alcohol isoamílico frío (24:1) y se les dió vórtex por 1 minuto e incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. En seguida, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Donde, la fase acuosa resultante en cada tubo se transfirió a un nuevo tubo tipo eppendorf, al cual previamente se le incorporaron 500 µl de isopropanol frío, para inducir la precipitación del RNA total, por lo cual se procedió a mezclar cuidadosamente por inversión y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de esta incubación se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante, y se lavó la pastilla de RNA total resultante adicionando 1 mL de etanol al 75%, se dió vórtex por escasos segundos y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se decantó nuevamente y se lavó una última vez la pastilla, con la adición de 1 mL de etanol absoluto, se dió vórtex por escasos segundos y se centrifugó de nuevo a 6000 rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente se decantó el etanol y se dejaron secar las muestras hasta la total evaporación del etanol, en un último paso se resuspendió la pastilla de RNA total resultante con 30 µl de agua grado biología molecular y se almacenó a -20 °C hasta su uso, (33).

10.2. Extracción de RNA total con QIAamp por columnas (PE2)

Todos los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente, a excepción del regulador AVL (contiene acarreador de RNA) que se mantuvo a 4°C y el cual forma un precipitado, por lo cual se sometió a baño María de 50°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de usar.

Como primer paso, en tubos tipo eppendorf, se procedió a hacer alícuotas de la cepa H37Rv en medio Middlebrook 7H10 en volúmenes de 50 µl a los cuales se adicionó 90 µl de agua grado biología molecular, para obtener el volumen requerido de 140 µl, de acuerdo a las especificaciones del fabricante, de igual forma se preparó un blanco de extracción. Posteriormente cada muestra se sometió a una temperatura de 94°C por 30 minutos en un termoblock. Finalizado el tratamiento térmico se procedió a adicionar un volumen de 560 µl del regulador AVL, a cada muestra y se dió vórtex a la mezcla resultante por 10 minutos, después se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Pasados los 10 minutos, se centrifugaron las muestras durante 1 minuto a 8000 rpm a temperatura ambiente, para remover las gotas de condensación en la tapa. Posteriormente se adicionaron 560 µl de etanol absoluto (96 %) a las muestras y se mezcló empleando un vórtex durante 15 segundos, se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 8000 rpm a temperatura ambiente. De la mezcla final de 1260 µl, únicamente se tomaron 630 µl y se trasvasaron a una columna provista de un tubo colector de 2 mL, al trasvasar se debe tener cuidado de no mojar las paredes de la columna. Las columnas se centrifugaron a 8000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se desechó el tubo colector de cada muestra con el filtrado resultante y las columnas se colocaron dentro de un nuevo tubo colector. En este paso, si la solución no pasó completamente por la membrana de la columna, se requiere una segunda centrifugación a una velocidad más alta (11,000 rpm) por 1 minuto hasta que la solución pase totalmente. Una vez, filtrada toda la solución por las columnas, estas se abrieron cuidadosamente y se les adicionó la mezcla restante de 630 µl, se centrifugaron a 8000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente y desechó nuevamente cada tubo colector con el filtrado resultante. Se colocó cada columna en un segundo tubo colector limpio y se les adicionaron 500 µl de regulador AW1 como un primer lavado; se centrifugaron a 8000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente y se desecharon los tubos colectores con el filtrado resultante, se colocaron en otro tubo colector limpio. Se dió un segundo lavado a las columnas, adicionando 500 µl de regulador AW2. Se

centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente y se desechó una última vez cada tubo colector. Finalmente se colocó la columna dentro de un tubo tipo eppendorf nuevo de 1.5 mL, y se le adicionaron 30 µl de regulador AVE, para eluir el RNA, se incubó con el regulador la columna por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó por última ocasión a 8000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, se desechó la columna. El RNA obtenido se mantuvo a -20°C, hasta su uso, (34).

10.3. Extracción de RNA total Trizol-LS fenol ácido 1 (PE3)

Previo a la extracción, la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* en medio Middlebrook 7H10 se inactivó, tomando una alícuota de 50 µl en tubos tipo eppendorf de 1.5 mL y se adicionó un volumen de 200 µl de agua grado PCR, esta mezcla de 250 µl se sometió a tratamiento térmico de 94°C por 30 minutos en un termoblock. Seguido del tratamiento la cepa se sometió a centrifugación de 11,000 rpm durante 10 minutos a 4°C para concentrar el material celular, se decantó el sobrenadante y adicionaron 250 µl de agua grado biología molecular, se preparó un blanco de extracción en un segundo tubo tipo eppendorf con 250 µl de agua grado biología molecular y se adicionaron 3 perlas de vidrio, previamente esterilizadas, de un diámetro de 2 mm a cada tubo. Una vez establecido un volumen final de 250 µl para cada muestra de extracción se procedió a adicionar a cada una 750 µl de Trizol-LS frío y 300 µl de fenol frío (Fenol (pH=6.0)/cloroformo (5:1) + 50 mM acetato de sodio a pH 4.5 + 0.5% de sarcocina), se mezcló empleando un vórtex por 5 minutos y enseguida se sometieron a centrifugación por 11,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Concluida la centrifugación de las muestras se transfirió la fase acuosa a otro tubo tipo eppendorf de 1.5 mL, al cual previamente se le adicionaron 200 µl de cloroformo frío, y se mezcló utilizando el vórtex por 1 minuto, enseguida se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Nuevamente se transfirió la fase acuosa resultante a un nuevo tubo tipo eppendorf de 1.5 mL al cual previamente se le adicionaron 400 µl de fenol ácido (pH=6.0)-cloroformo (5:1), se procedió a dar vórtex a cada muestra por 1 minuto y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa resultante a otro tubo tipo eppendorf al cual se le agregaron 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico frío (24:1), se mezcló empleando vórtex por 1 minuto y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Una vez más se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo tipo eppendorf conteniendo 500 µl de isopropanol frío y se mezcló por inversión, la mezcla resultante se incubó a -20°C por 1 hora, enseguida se

centrifugaron las muestras a 11,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y agregaron 750 µl de alcohol al 75%, se dió vórtex por escasos segundos y se centrifugaron las muestras a 11,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se incorporaron 750 µl de etanol absoluto, y se mezcló mediante vórtex, se centrifugó una última vez a 11,000 rpm por 5 minutos a 4°C; finalmente se desechó el sobrenadante y se dejaron secar las muestras hasta la total evaporación del etanol, como último paso se hidrataron las muestras con 30 µl de agua grado PCR y se almacenaron a -20°C hasta su uso, (6, 34).

10.4. Extracción de RNA total Trizol-LS fenol ácido 2 (PE4)

A partir de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* crecida en medio Sautón se tomó una alícuota y se resuspendió en solución salina fisiológica (SSF) con tritón al 0.5% y 3 perlas de vidrio de 2 mm de diámetro, posteriormente se sometió a tratamiento térmico de 60°C por 20 minutos, para finalmente someterla a vórtex por 10 minutos con intervalos de 2 minutos en hielo. Después del tratamiento anterior, la cepa se resguardó en alícuotas que fueron almacenadas a -20°C hasta proceder a extraer el RNA total.

Para comenzar la extracción de la cepa se tomó una de las alícuotas resguardadas a -20°C, y se procedió a concentrar centrifugando por 10 minutos a 11,000 rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 250 µl de agua grado PCR y se preparó el blanco de extracción con 250 µl de agua grado PCR. A partir de este punto a las muestras por extraer se les incorporaron 3 perlas de vidrio, previamente esterilizadas, de 2 mm de diámetro, excluyendo los blancos. Posteriormente se adicionaron 750 µl de Trizol-LS y 300 µl de reactivo de fenol (fenol (pH= 6.0)/cloroformo (5:1) 50 mM de acetato de sodio a pH 4.5 + 0.5% de sarcocina), se mezcló mediante vórtex hasta que se obtuvo una mezcla homogénea y se sometió a centrifugación de 11,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo tipo eppendorf de 1.5 mL, al cual previamente se le adicionaron 200 µl de cloroformo frío y se les dió vórtex a las muestras por 1 minuto; enseguida se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se preparó un tubo tipo eppendorf para cada muestra con 400 µl de fenol ácido (pH= 6.0)-cloroformo frío (5:1), al cual se trasvasó la fase acuosa resultante. Se dió vórtex por escasos segundos y se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se tomó una vez más la fase acuosa y se agregaron a un tubo tipo eppendorf 400 µl de cloroformo alcohol isoamílico frío (24:1) y se mezcló empleando vórtex por unos cuantos segundos,

centrifugando posteriormente a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Una vez más se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo tipo eppendorf que contenía un volumen de 500 µl de isopropanol frío y se mezcló por inversión e incubó a -20°C por 1 noche, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se agregaron 750 µl de etanol al 75 %, se mezcló en vórtex por escasos segundos y se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se agregaron 750 µl de etanol absoluto dando vórtex a la mezcla final. Se centrifugaron las muestras por última ocasión a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C, se desechó cada sobrenadante. Se dejaron secar las muestras hasta la total evaporación del etanol, finalmente se hidrataron las muestras con 30 µl de agua grado biología molecular y se almacenaron a -20°C hasta su uso, (6, 34, 35, 36).

10.5. Extracción de RNA total Trizol-LS fenol ácido 3 (PE5)

La cepa H37Rv de *M. tuberculosis* proveniente de medio Sautón se resuspendió en solución salina fisiológica con tritón al 0.5%, se le incorporaron 3 perlas de vidrio de 2 mm de diámetro y se sometió a baño María por 45 minutos a 45°C y finalmente se sometió a vórtex por 15 minutos con intervalos de dos minutos en hielo por cada 3 minutos en vórtex. Después del tratamiento anterior, finalmente se dividió en alícuotas en tubos tipo eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -70°C hasta iniciar con la extracción del RNA total.

Para iniciar la extracción de la cepa, se empleó una de las alícuotas de resguardo a -70°C. Se centrifugó a 11,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 250 µl de regulador TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH = 8.0) y 4 µl de lisozima (100 mg/mL), se dió vórtex por escasos segundos y se procedió a incubar la mezcla por 10 minutos a 48 °C. En un siguiente paso, se preparó el blanco de extracción, y se incorporaron a cada muestra (blanco y cepa) un volumen de 750 µl de Trizol-LS, 300 µl de reactivo de fenol (fenol (pH= 5.3)/cloroformo (5:1) 50 mM de acetato de sodio a pH 4.5 + 0.5% de sarcocina), 10 µl de tRNA dilución 1:20 y 3 perlas de vidrio de 2 mm de diámetro (previamente esterilizadas), se dió vórtex hasta observar una mezcla homogénea y se sometió a centrifugación de 11,000 rpm por 10 minutos a 4°C. A partir de este paso, se obtuvo el RNA total, por lo cual se mantuvieron las muestras en baño de hielo hasta finalizada la extracción. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo tipo eppendorf de 1.5 mL, al cual previamente se le adicionaron 200 µl de cloroformo frío y se mezcló empleando vórtex por 1 minuto; enseguida se

centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se preparó un tubo tipo eppendorf para cada muestra con 400 µl de fenol ácido (pH= 5.3)-cloroformo frío (5:1), al cual se trasvasó la fase acuosa resultante. Se dió vórtex por escasos segundos y se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se tomó una vez más la fase acuosa y se incorporó a un tubo tipo eppendorf con 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico frío (24:1) y se les dió vórtex por unos cuantos segundos para centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo tipo eppendorf que contiene 500 µl de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se procedió a incubar a -70°C por 1 noche. Finalmente se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 30 minutos a 4°C, se decantó cada sobrenadante y se agregaron 750 µl de etanol al 75 %, se dió vórtex por escasos segundos y centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se desechó una vez más cada sobrenadante y se agregaron 750 µl de etanol absoluto, se dió vórtex y centrifugaron las muestras por última ocasión a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y dejaron secar las muestras hasta la total evaporación del etanol, finalmente las muestras se hidrataron con 30 µl de agua DEPC y se almacenaron a -70°C hasta su uso, (6, 33, 34, 35, 37).

10.6. Extracción de RNA total Trizol-LS fenol ácido 4 (PE6)

En este procedimiento se emplearon la cepa H37Rv, muestras biológicas (expectoraciones y lavados bronquiales) siendo las dos últimas una muestra idónea en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

La extracción de la cepa y las muestras clínicas se realizó en diferentes etapas de trabajo, para evitar contaminaciones; por lo cual se debe contar con un blanco de extracción para las muestras y otro al trabajar con la cepa.

La cepa H37Rv de *M. tuberculosis* recibió el mismo tratamiento indicado en el protocolo de extracción de RNA total por Trizol-LS fenol ácido 3.

Con respecto a las muestras clínicas, estas se sometieron a una previa fluidificación y homogeneización para garantizar la óptima recuperación de las micobacterias, ya que pueden quedar englobadas en el espesor de la secreción mucosa a que dan lugar. Para lo cual se agregó al contenedor de origen 1mL de N-acetil cisteína (NAC: 2.5% en solución amortiguadora de fosfato [PB], 68 mM, pH 6,7) como agente mucolítico, por cada 5 mL de muestra y 6 perlas de vidrio de 2 mm de diámetro, previamente esterilizadas (dependiendo de la cantidad de muestra, se puede adicionar más NAC, o

aumentar el número de perlas de vidrio), se sometieron a la acción del vórtex, hasta observar pérdida de viscosidad. Después se procedió a concentrar ambas muestras (cepas y muestras clínicas) por centrifugación a 11,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos en 250 µl de regulador TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH= 8.0) y 4 µl de lisozima (100 mg/mL), se homogeneizó en vórtex por escasos segundos y se procedió a incubar la mezcla por 10 minutos a 48°C. En un siguiente paso, se prepararon los blancos de extracción y se procedió a incorporar a todos los tubos 3 perlas de vidrio de 2 mm de diámetro (previamente esterilizadas) y un volumen de 750 µl de Trizol-LS , 300 µl de reactivo de fenol (fenol (pH= 4.5)/cloroformo (5:1) 50 mM de acetato de sodio a pH 4.5 + 0.5% de sarcocina) y 10 µl de tRNA dilución 1:20, se dió vórtex hasta observar una mezcla homogénea y se sometió a centrifugación de 11,000 rpm por 15 minutos. A partir de este paso, se obtuvo el RNA total, por lo cual las muestras a procesar se mantuvieron en baño de hielo hasta finalizada la extracción. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo tipo eppendorf de 1.5 mL, al cual previamente se adicionaron 200 µl de cloroformo frío y se mezcló empleando vórtex por 1 minuto; enseguida las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se preparó un tubo tipo eppendorf para cada muestra con 400 µl de fenol ácido (pH= 4.5)-cloroformo frío (5:1), al cual se trasvasó la fase acuosa resultante. Se dió vórtex por escasos segundos y se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se tomó una vez más la fase acuosa y se incorporó a un tubo tipo eppendorf con 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico frío (24:1) y se les dió vórtex por escasos segundos para centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo tipo eppendorf que contenía 500 µl de isopropanol frío en presencia de 65 µl de acetato de sodio (3M), se mezcló por inversión cada muestra y se procedió a incubar a -70°C por 1 noche, finalmente se centrifugó a 14,000 rpm por 30 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y agregaron 750 µl de etanol al 75%, para lavar el sedimento de RNA total, se dió vórtex por escasos segundos y centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se agregaron 750 µl de etanol absoluto, se dió vórtex y centrifugaron las muestras por última ocasión a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y las muestras se dejaron secar hasta la total evaporación del etanol, posteriormente se hidrataron con 30 µl de agua DEPC y se

homogeneizó el RNA obtenido por pipeteo cuidadosamente. El RNA total hidratado se dividió en alícuotas de 5 µl y se almacenó a -70°C hasta su uso, (6, 34, 35, 37, 38).

10.7. Determinación de la integridad del RNA total extraído de *M. tuberculosis*

Es importante verificar que el RNA total extraído se encuentra intacto y por lo tanto apto para someter a un ensayo de amplificación.

La verificación de la integridad del RNA total se llevo a cabo mediante electroforesis en agarosa, empleando geles de agarosa Nusive al 1%. Los cuales se prepararon utilizando 30 mL de regulador TBE (Tris-Boratos-EDTA) al 0.25X, adicionando 0.3 gramos de agarosa Nusive; fundiendo la agarosa con ayuda de un horno de microondas durante 30 segundos, evitando ebullición. Como agente revelador e intercalante de bases para evidenciar la presencia del material genético se le adicionaron 0.5 µl de GelStar Nucleic Acid (LONSA), mientras aún se encuentra caliente la mezcla. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente; el corrimiento electroforético se llevó a cabo empleando regulador TBE 0.25X, 10 µL del producto de extracción (RNA total), marcador VIII (0.019-1.11 kbp, ROCHE), con un voltaje de 180 V durante 25 minutos. La imagen del corrimiento electroforético se documento utilizando un fotodocumentador (BIORAD) y el software QuantitiOne.

10.8. Amplificación y detección de la secuencia 16S rRNA de *M. tuberculosis*

La amplificación de la secuencia 16S se realizó mediante RT-PCR punto final a partir de un volumen total de reacción de 25 µl para cada muestra. La mezcla de reacción se preparó posterior al cálculo del número de reacciones (N), por analizar de acuerdo a la tabla 5.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación del gen 16S rRNA por RT-PCR

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración
H ₂ O	N x 5 µl	-----
*Regulador	N x 12.5 µl	2X
**Iniciador sentido 16Sr RNAF	N x 1 µl	10 pmol
**Iniciador antisentido 16Sr RNAR	N x 1 µl	10 pmol
***Enzima SuperScript III RT/Platinum Taq	N x 0.5 µl	-----
Mix		
Microlitros de mezcla de reacción por muestra	N x 20 µl	
Templado (RNA)	N x 5 µl	-----
Total	N x 25 µl	-----

* El regulador 2X contiene: 0.4 mM de cada dNTP y 6 mM de MgSO₄

** La secuencia de cada iniciador y sonda fue tomada de Desjardin et. al. 1996

*** (SuperScript III Platinum One-Step quantitative RT-PCR System Kit, Invitrogen by Life Technologies, USA). Este sistema combina la SuperScript III transcriptasa reversa (RT) y la Platinum taq DNA polimerasa en una mezcla única de enzimas.

La mezcla de reacción se homogeneizó por acción mecánica suave, evitando la formación de burbujas y se distribuyó en alícuotas de 20 µl en microtubos de reacción para PCR punto final de 200 µl. Finalmente se adicionó a cada microtubo un volumen de 5 µl de cada templado de RNA total por amplificar, homogeneizando por pipeteo suave la mezcla final. La RT-PCR se realizó empleando las condiciones de reacción descritas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de amplificación para la detección del gen 16S rRNA

	Etapas	Numero de ciclos	Tiempo	Temperatura
RT		1	10 minutos	50°C
	Etapa inicial de activación para la PCR	1	10 minuto	94 °C
	Desnaturalización	32	30 segundos	94 °C
	Alineamiento	32	1 minuto	65 °C
PCR	Extensión	32	1 minutos	72 °C
	Extensión final	1	20 minutos	72°C
	-----	---	∞	4°C

Tomado y modificado de referencia (6).

Concluida la amplificación, se procedió a la detección del amplicón 16S por electroforesis en agarosa, para lo cual se emplearon geles de agarosa tipo II al 2.5% preparados con regulador TBE (Tris-Boratos-EDTA) al 0.25X. Las condiciones de corrimiento y la fotodocumentación electroforética se realizaron como se describió en el punto 10.7.

10.9. Amplificación por qRT-PCR del mRNA del Ag85B de *M. tuberculosis*

Para la amplificación del mRNA del Ag 85B de *M. tuberculosis*, el ensayo de qRT-PCR se desarrolló con el par de iniciadores 85BF (5´-TCAGGGGATGGGGCCTAG-3´) y 85BR (5´-GCTTGGGGATCTGCTGCGTA-3´) siguiendo la metodología establecida en Desjardin et al., 1996, con algunas modificaciones establecidas por el laboratorio de Diagnóstico y Tipificación Molecular del InDRE.

La mezcla de reacción para la detección del mRNA 85B por qRT-PCR se preparó de acuerdo a lo descrito en la tabla 7. Donde (N) es el número de reacciones a realizar.

Tabla 7. Mezcla de reacción para detectar el mRNA del Ag85B por qRT-PCR

Reactivo	Volumen de reactivo por reacción	Concentración de trabajo
H ₂ O	N x 4.5 µl	-----
*Regulador	N x 12.5 µl	2X
**Iniciador sentido	N x 1 µl	10 pmol
**Iniciador antisentido	N x 1 µl	10 pmol
**Sonda	N x 0.5 µl	5 pmol
***Enzima SuperScript III	N x 0.5 µl	-----
RT/Platinum Taq Mix		
Microlitros mezcla de reacción por muestra	N x 20 µl	-----
Templado (RNA total extraído)	N x 5 µl	-----
Total	N x 25 µl	-----

* El regulador 2 X contiene: 0.4 mM de cada dNTP y 6 mM de MgSO₄

** La secuencia de cada iniciador y sonda fue tomada de Desjardin et. al., 1996

*** (SuperScript III Platinum One-Step quantitative RT-PCR System Kit, Invitrogen by Life Technologies, USA). Este sistema combina la SuperScript III transcriptasa reversa (RT) y la Platinum taq DNA polimerasa en una mezcla única de enzimas.

En cada corrida se consideraron tres reacciones más de reactivos por grupo de iniciadores y sonda, independientes del número de muestras por procesar, uno con agua que sirve como control negativos (NTC), un segundo para el blanco resultante durante la extracción y un control positivos (PTC) para la cepa. Cabe mencionar que en el caso único de las muestras clínicas, el RNA extraído también se analizó con un segundo par de iniciadores y sonda dirigidos a la secuencia de la RNasa P (RP). Esta segunda mezcla de reacción se realizó por separado de acuerdo a lo establecido en la tabla 8.

Tabla 8. Mezcla de reacción para la detección de RP

Reactivo	Volumen de reactivo por reacción	Concentración de trabajo
H ₂ O	N x 5.5 µl	-----
*Regulador	N x 12.5 µl	2X
**Iniciador sentido	N x 0.5 µl	40 µM
**Iniciador antisentido	N x 0.5 µl	40 µM
**Sonda	N x 0.5 µl	10 µM
***Enzima SuperScript III	N x 0.5 µl	-----
RT/Platinum Taq Mix		
Microlitros mezcla de reacción por muestra	N x 20 µl	-----
Templado (RNA total extraído)	N x 5 µl	-----
Total	N x 25 µl	-----

Los controles negativos fueron adicionados antes de que cualquier muestra se añada y los controles positivos siempre se agregan al final ya que todas las muestras y los controles negativos fueron sellados. Durante la adición de cada templado la mezcla de reacción final se homogeneizó por pipeteo suave. Finalmente las tiras de tubos de PCR

selladas se colocaron en el termociclador previamente programado, de acuerdo a los parámetros especificados en la tabla 9 y en el orden que indica la plantilla de la corrida por el software para identificar y diferenciar la amplificación del RP y del mRNA del Ag 85B, (6).

Tabla 9. Condiciones de amplificación para la detección del mRNA Ag85B

	N° de ciclos	Tiempo	Temperatura
RT	1 ciclo	10 minutos	50 °C
	1 ciclo	10 minutos	94°C
PCR	45 ciclos	30 segundos	94°C
	1 ciclo	1 minuto	68°C

10.10. Inhibición de la qRT-PCR con RNasa

Para proceder a inhibir la qRT-PCR, previamente se tomaron alícuotas de 5 µL de cada templado de RNA para incorporarlos a una tira de tubos de 200 µL, posteriormente se adicionó a cada tubo un volumen de 2 µL de Sigma RNasa (10mg/mL) y 2 µL de agua de grado molecular, finalmente por pipeteo se homogeneizó la mezcla de reacción y se incubó a 37° C por 30 minutos en el sistema de detección PCR punto final, tabla 10. Concluida la incubación se sometió a una amplificación por qRT-PCR cada muestra con su respectiva réplica sin RNasa, siguiendo la metodología de amplificación por qRT-PCR del mRNA del Ag 85B de *M. tuberculosis*.

Tabla 10. Condiciones de incubación para la activación de RNasa

	N° de ciclos	Tiempo	Temperatura
Activación de RNasa	1	30 minutos	37° C
	1	∞	4° C

10.11. Detección de DNA contaminante por PCR punto final

La detección de DNA contaminante se llevó a cabo siguiendo el protocolo de diagnóstico de tuberculosis establecido en el laboratorio de Diagnóstico y Tipificación Molecular del InDRE mediante PCR punto final. La detección se determinó a partir en un volumen final de reacción de 50 µl para cada muestra, incluyendo controles negativos (blanco de reactivos y blanco de extracción) y controles positivos (templado DNA de cepa H37Rv de *M. tuberculosis*), incorporando los reactivos según el número de reacciones (N) por analizar de acuerdo a la tabla 11.

Tabla 11. Mezcla de reacción para la detección de DNA contaminante por PCR

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración
H ₂ O	N x 28.5 µl	-----
*Regulador	N x 5 µl	10X
dNTPs	N x 10 µl	-----
**Iniciador sentido ISB2L	N x 1 µl	-----
**Iniciador antisentido ISB3LR	N x 1 µl	-----
Enzima Taq DNA polimerasa Roche	N x 0.2 µl	250 U
MgCl ₂	N x 1.5 µl	50 mM
Microlitros de mezcla de reacción por muestra	N x 47 µl	
Templado (DNA)	N x 3 µl	-----
Total	N x 50 µl	

La mezcla de reactivos se homogeneizó evitando la formación de burbujas. Posteriormente por cada muestra por amplificar se dispensaron 47 µl de la mezcla de reactivos en microtubos de 200 µl para PCR punto final y se adicionaron finalmente 3 µl de la muestra respectiva por analizar, mezclando por pipeteo suave la mezcla final. Las condiciones de reacción se describen en la tabla 12.

Tabla 12. Condiciones de amplificación para la detección de DNA contaminante

	Numero de ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	1 minuto	94 °C
Desnaturalización	45	15 segundos	90 °C
Alineamiento	45	50 segundos	70 °C
Extensión	1	7 minutos	72 °C
Extensión final	1	∞	4°C

El amplicón resultante de aproximadamente 140 pb, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% siguiendo las indicaciones que se señalaron en el ensayo de para determinar la integridad del RNA *M. tuberculosis* en el apartado 10.7.

11. Resultados

11.1. Detección de la integridad del RNA total

Los diferentes protocolos de extracción se enriquecieron con pasos adicionales durante el aislamiento del RNA lo que favoreció de manera importante mantener su integridad, siendo el protocolo de extracción Trizol-LS fenol ácido donde se obtuvieron mejores resultados por lo cual para futuras extracciones se seguirá implementando (4). El resultado obtenido se observa en el electroferograma, figura 9, donde se aprecia la diferencia entre la aplicación de los dos últimos protocolos de extracción, observándose un RNA degradado e íntegro, ya que en los demás protocolos no se llegó a visualizar material genético en los electroferogramas.

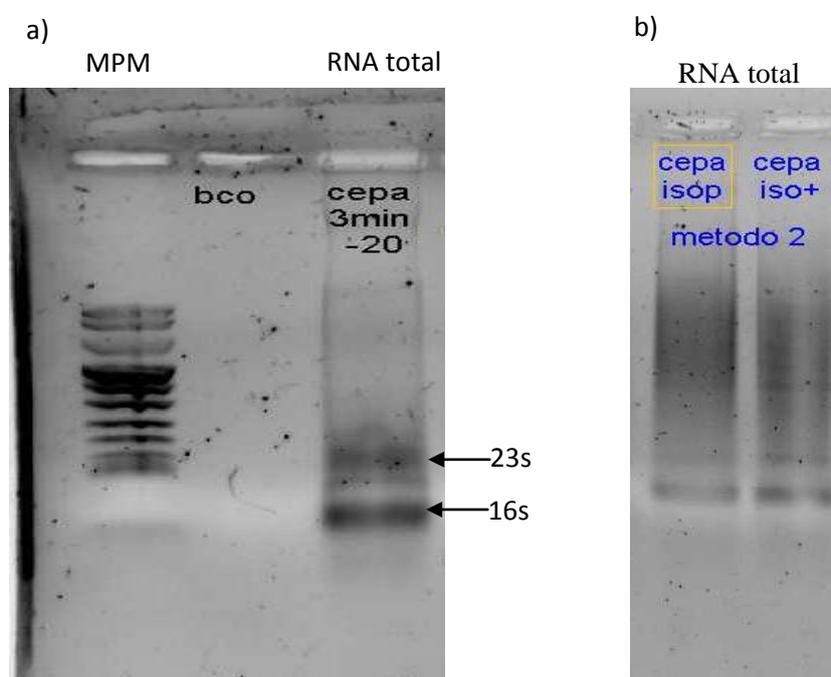


Figura 9. Electroferograma Nusive al 1% de la integridad del RNA total obtenido. (a) RNA aislado por el método de extracción Trizol-LS fenol ácido 4, donde se muestran las especies ribosomales 23s y 16s; (b) RNA degradado aislado por Trizol-LS fenol ácido 3. Ambas muestras aisladas de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

11.2. Detección del gen 16S rRNA

La amplificación del fragmento 16s rRNA se llevó a cabo mediante RT-PCR punto final, su detección resultó una guía para determinar la eficiencia de cada protocolo de extracción en el aislamiento de RNA total, así como un indicador en la mejora del rendimiento e integridad de su aislamiento, figura 10.

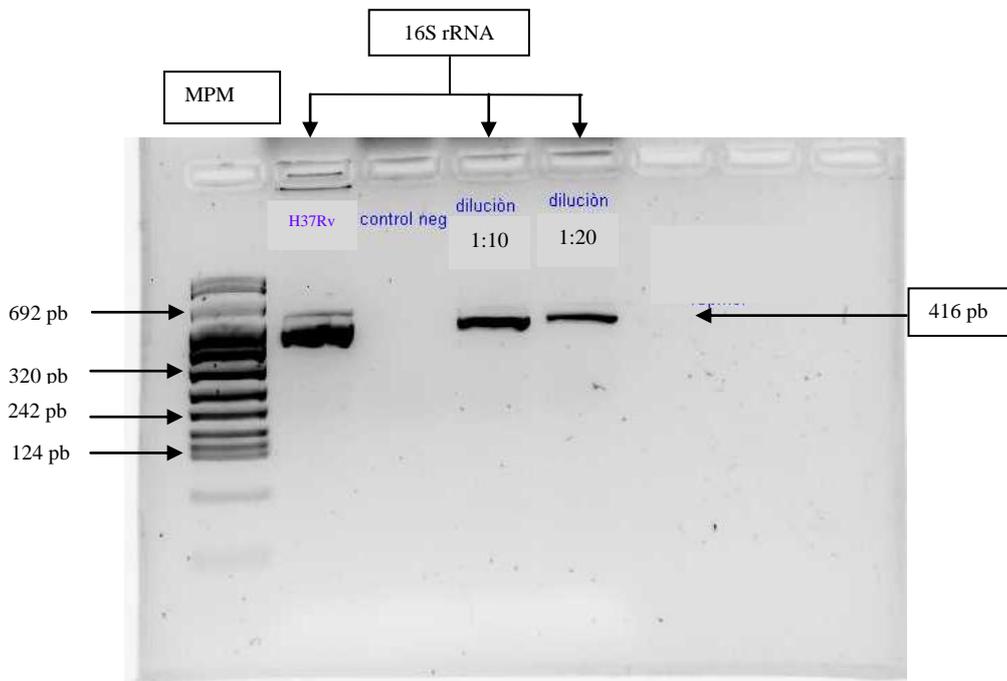


Figura 10. Electroferograma del amplicón correspondiente al gen 16S rRNA. Gel de agarosa al 2.5%. Diluciones 1:10 y 1:20 del RNA total obtenido por el método Trizol-LS fenol ácido 4.

11.3. Amplificación del Ag85B a partir de mRNA por qRT-PCR

La qRT-PCR resulta un método muy sensible, que combina una transcripción inversa con una reacción de polimerasa en cadena (RT-PCR). En este estudio se utilizó el estuche comercial SuperScript III Platinum One-Step quantitative RT-PCR System, (Invitrogen by Life Technologies, USA), donde se combina la SuperScript III transcriptasa reversa (RT) y la Platinum taq DNA polimerasa en una mezcla única de enzimas que permite la realización de ambas reacciones en un solo paso, permitiendo un análisis rápido, sensible y reproducible del RNA.

El juego de iniciadores 85B, en combinación con el oligonucleótido detector 5´-(FAM) TCGAGTGACCCGGCATGGGAGCGT-3´-TAMRA, generaron un amplicón de 130 pb, a partir de la síntesis del cDNA correspondiente a una región del gen que codifica para la proteína 85B en los miembros del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*) desde el nucleótido 588 al 718 de la secuencia de *M. tuberculosis* Erdman (GenBank número X62398).

Con el objeto de estandarizar la técnica qRT-PCR para la detección del mRNA del antígeno 85B de *M. tuberculosis* se recurrió al empleo de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* proporcionada por el laboratorio de Micobacterias del InDRE, así como a 25 muestras respiratorias provenientes del Hospital General de México con previo cuadro clínico diagnosticado para tuberculosis pulmonar.

Durante los primeros ensayos se empleó únicamente el RNA de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* para amplificar el mRNA del Ag85B. La figura 11 muestra la curva de amplificación obtenida para el gen del mRNA del Ag85B. Se ajustaron los protocolos de extracción modificando los tratamientos previos a la extracción, condiciones como pH, temperaturas de incubación y resguardo, así como la adición de nuevos reactivos.

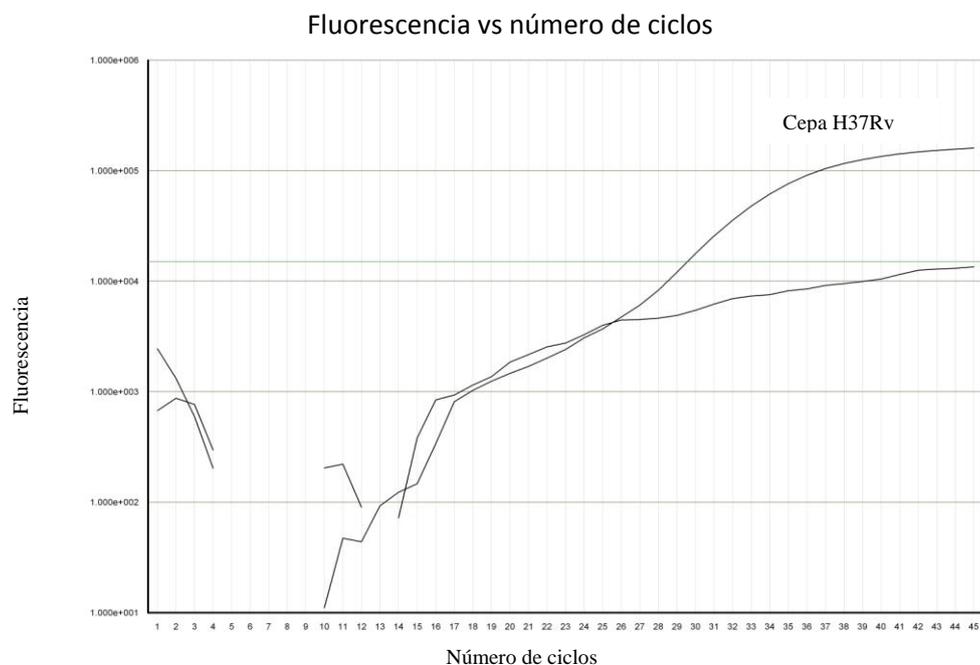


Figura 11. Curva de amplificación para el gen Ag85B mediante qRT-PCR. Se observa la amplificación del gen en el ciclo (Ct) 29.53 lo que refleja la eficiencia en cantidad y calidad del RNA extraído.

Tabla 13. Tamaño del fragmento generado por los iniciadores para el Ag85B

Nombre del gen	PRODUCTO	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Tamaño en pb cDNA
*85-B *fbpB (proteína de unión a la fibronectina B)	Proteína o antígeno 85-B	85B Forward: TCAGGGGATGGGGCCTAG 85B Reverse: GCTTGGGGATCTGCTGCGTA	130

11.4. Determinación de la ausencia de DNA en extractos de RNA total

Siguiendo el protocolo de extracción con Trizol-LS fenol ácido 4, se favoreció la ausencia de DNA contaminante en los extractos de RNA total, empleando los iniciadores ISB2L para su detección, como se puede apreciar en la figura 12, lo que permite corroborar que las amplificaciones por qRT-PCR para el mRNA Ag85B son específicas; mediante la detección de la secuencia de inserción IS6110 (amplicón de aproximadamente 140 pb) presente en las especies del MTBC cuya ausencia refleja la calidad del RNA extraído.

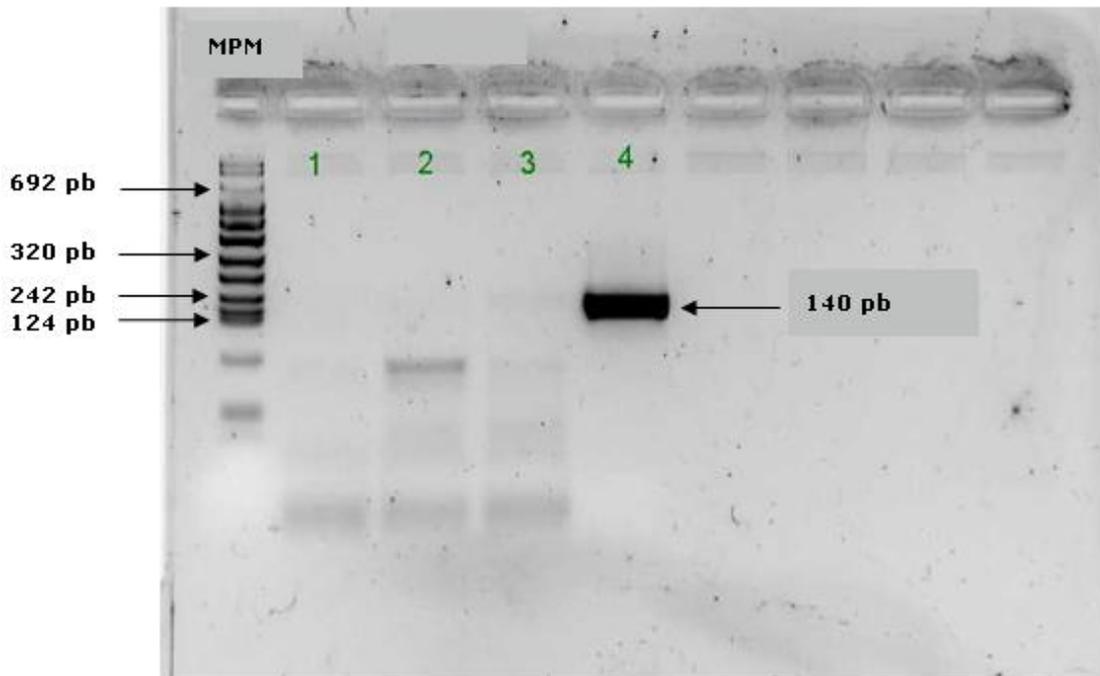


Figura 12. Electroferograma para la detección de la secuencia IS6110 como indicador de DNA contaminante. 1 control negativo, 2 y 3 cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, 4 control positivo para DNA con 140 pb, MPM marcador de peso molecular VIII.

11.5. Detección del mRNA de *M. tuberculosis* por qRT-PCR en muestras clínicas

Las 25 muestras clínicas, procedentes del Hospital General de México, se procesaron de la misma forma que la cepa H37Rv para la extracción de RNA y para la amplificación mediante qRT-PCR, siendo las determinaciones negativas para el Ag85B. Empleándose como controles positivos en la amplificación mRNA de la cepa H37Rv y RNasa P de humano (asegurando la calidad de la extracción), ver figuras 13 y 14.

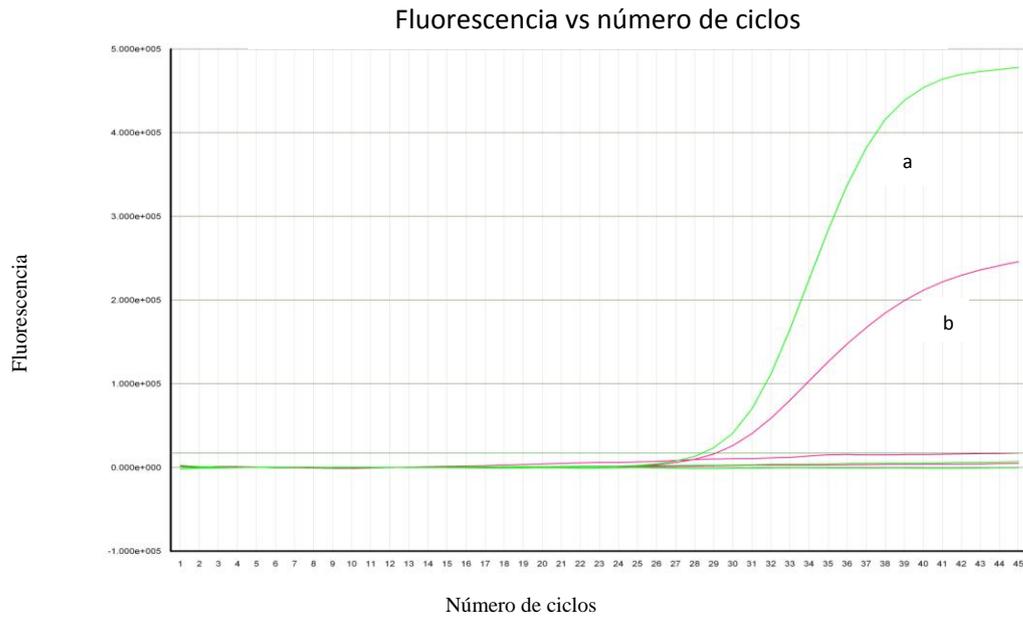


Figura 13. Curva de amplificación para el gen Ag85B mediante qRT-PCR. a) Amplificación para RNasa humana con un ct de 28, b) control positivo de mRNA con un Ct de 29.12. No se observan amplificaciones para las muestras clínicas

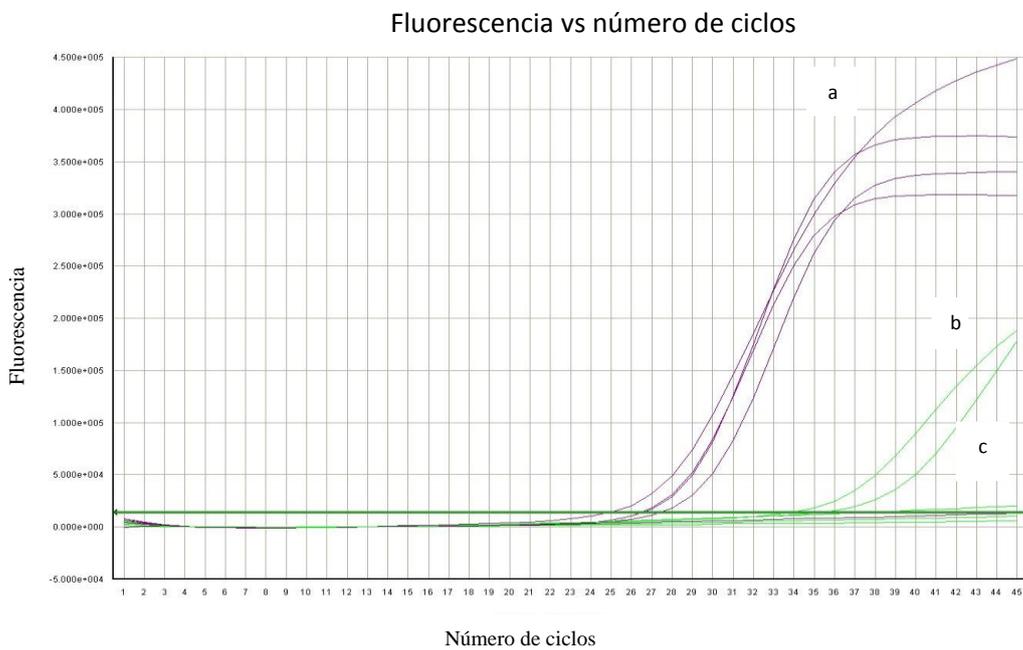


Figura 14. Curvas de amplificación para las muestras clínicas mediante qRT-PCR. a) amplicón para RP, b) control positivo H37Rv con valor de Ct de 33.93, c) amplicón de muestra con valor de Ct de 35.40, 10 μ L de templado.

12. Discusión

A pesar de los esfuerzos realizados para su control, la Tuberculosis todavía representa uno de los problemas sanitarios de más trascendencia mundial, aún cuando se cuenta con el programa TAES (Tratamiento acortado estrictamente supervisado) contra la tuberculosis hace varias décadas, ya que la infección por *M. tuberculosis* prevalece entre una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, (22).

En los últimos años la micobacteriología ha experimentado importantes avances tecnológicos y a pesar de ello el diagnóstico de la infección por micobacterias aún recae en el examen microscópico de las muestras mediante baciloscopía y la confirmación del agente causal por cultivo. Siendo la baciloscopía hoy día el procedimiento más simple, de mejor costo-efectividad y rapidez para proporcionar al clínico una orientación diagnóstica preliminar, y el cultivo el método más confiable para evaluar la viabilidad del microorganismo en muestras de pacientes bajo tratamiento y con sospecha de infección. Sin embargo, aunque ampliamente usados estos métodos tienen como desventaja una baja sensibilidad en el caso de la baciloscopía, y la obtención de resultados tardíos en el caso del cultivo, (23). Debido a ello recientes investigaciones han enfocado su atención en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico en la detección de *M. tuberculosis*, que combinen la rapidez y facilidad de la baciloscopía con la elevada sensibilidad y especificidad del cultivo; donde las técnicas de biología molecular juegan un papel predominante. La PCR ha demostrado ser un método muy eficiente para la identificación de *M. tuberculosis* cuando se aplica en cultivos puros y muestras clínicas dirigidos a una secuencia específica de DNA; sin embargo su detección resulta inadecuada para monitorear la respuesta ante el tratamiento antituberculoso, debido a su pobre correlación con los resultados microbiológicos convencionales; de ahí que diferentes autores se han visto en la necesidad de reportar a la RT-PCR como una importante herramienta alternativa en la investigación, diagnóstico y monitoreo de la enfermedad. (7, 8, 23).

Es así, que el estudio de Hellyer *et. al.* 1996, sugiere el uso del mRNA, que en contraste con el DNA y el rRNA, se degrada más rápido, presentando una vida media de hasta 3 minutos en procariontas. Por ello una prueba basada en la detección de mRNA demuestra la presencia de microorganismos viables. En consecuencia, para *M. tuberculosis* la detección del mRNA del Ag85B resulta de utilidad como indicador de la susceptibilidad del bacilo ante diferentes antimicrobianos reflejando con ello la

eficacia del tratamiento antituberculoso, (7,8). A partir de este análisis, el presente trabajo se planteo como principal objetivo estandarizar una qRT-PCR para la detección del mRNA de la proteína Ag85B de *M. tuberculosis* estableciendo el mejor método de extracción de RNA total en la cepa H37Rv como control y posteriormente estandarizar el método en muestras clínicas de pacientes con tuberculosis pulmonar como alternativa útil al cultivo convencional y así realizar un diagnóstico oportuno evaluando la viabilidad de *M. tuberculosis*. Por lo cual antes de aplicar los protocolos de extracción de RNA sobre cualquier muestra clínica, se procedió a probar cada uno de estos sobre masa bacteriana proveniente del cultivo de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, desempeñando ésta el papel de control positivo para la técnica qRT-PCR.

En la búsqueda del protocolo de extracción de RNA total más conveniente y eficiente para *M. tuberculosis* se encontraron numerosos protocolos de extracción por aplicar, de los cuales se decidió optar por aquellos que implicaran un menor tiempo de manipulación de las muestras, con el único objetivo de evitar la pronta degradación del mRNA. Es debido a esta inestabilidad que a lo largo del procedimiento de extracción se aplicaron diferentes controles de verificación para determinar el efecto de cada una de las variables como temperatura, pH y reactivos sobre los procesos de extracción descritos en la metodología sobre la estabilidad y respectivo aislamiento del RNA total en la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* asegurando la integridad del RNA extraído y ausencia de DNA contaminante que pudieran interferir en la qRT-PCR. La importancia del uso de RNA de gran integridad busca evitar un cambio en la distribución del tamaño RNA molde hacia fragmentos más pequeños lo que conllevaría a un decremento en la señal de fluorescencia como resultado de la destrucción de los sitios de hibridación para los iniciadores empleados, (39, URL⁵). Es por ello que antes de someter a qRT-PCR los templados de RNA total obtenidos se verificó su calidad e integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. Tomando en cuenta que el mRNA es una mezcla heterogénea de moléculas que codifican para diferentes proteínas, así como su bajo peso molecular y el bajo porcentaje que cubre (1-5%) dentro del RNA total resulta poco factible su visualización en una sola banda de geles de agarosa a pesar de las diferencias en composición y tamaño que puedan presentar; sin embargo su calidad e integridad se relacionó con la ausencia de contaminantes que no fueran los correspondientes a las subunidades 16s y 23s ya que la fracción ribosomal representa un 95-99% del RNA total, (42). De tal modo que el análisis de la integridad del RNA total por electroforesis

en gel para las muestras tratadas con los protocolos de extracción PE1, PE2, PE3, PE4, y PE5 revelaron resultados similares como el que se observa en la figura 9(b), donde se aprecian bandas difuminadas de los rRNA extraídos en geles de agarosa al 1%, indicativo de un RNA degradado. Donde el efecto sobre el RNA puede atribuirse al daño o la muerte de las micobacterias sumado a la pérdida del RNA por desnaturalización. Por el contrario, aplicando el protocolo de extracción RNA total por Trizol-LS fenol ácido 4 (PE6) se logró finalmente la obtención del RNA integro observando por ello en los geles de agarosa (figura 9 (a)) el rRNA en dos bandas bien definidas (23s y 16s). Hasta este punto los resultados indican que la técnica de extracción de RNA total se realizó de manera adecuada, sin embargo, no se puede asegurar que las muestras contengan mRNA, para lo cual se realizó la amplificación por qRT-PCR y RT-PCR punto final dirigida al mRNA del Ag85B y el gen rRNA 16s respectivamente. La detección del rRNA 16s permitió garantizar de manera constante la recuperación de RNA derivado de las muestras analizadas por electroforesis para cada proceso de extracción, ya que se reporta más estable y en mayores cantidades, por lo que una variación en la detección de este gen bajo las condiciones experimentales afectaría a su vez la detección del mRNA, (40). Es así, que la detección del rRNA 16s sólo se mantuvo constante aplicando el protocolo de extracción Trizol-LS fenol ácido 4, observando en todas las muestras resultados similares al que se observa en la figura 10, con lo cual se confirma la extracción de RNA íntegro. El Amplificado del rRNA 16s de manera constante, se procedió a realizar a la par la amplificación del mRNA del Ag85B por medio de qRT-PCR, observando en la mayoría de las extracciones para la cepa resultados positivos entre los ciclos 29 y 38 tomándose estos ciclos de amplificación como valor de corte y aquellas muestras que presenten Ct con valores mayores a 38 como muestras sospechosas de la presencia de *M. tuberculosis*. como se aprecia en la figura 11, donde el amplicón del mRNA presenta un valor de Ct de 29.53 en un total de 45 ciclos.

Si bien la qRT-PCR resulta ser la técnica más sensible para la detección y cuantificación de mRNA, la contaminación por DNA afecta la sensibilidad y especificidad del ensayo por lo que es recomendable descontaminar las muestras de DNA para la síntesis del cDNA (URL⁹). Por lo cual se realizaron lavados con fenol ácido-cloroformo donde el pH ácido favoreció la recuperación del RNA con la mínima o nula contaminación de DNA, (41). Para verificar la ausencia de DNA, se realizó la amplificación de una región

de 140 pb de la secuencia de inserción IS6110 por PCR convencional a los extractos de RNA y un control positivo donde únicamente se detectó el amplicón del control positivo para dicha secuencia corroborando que la amplificación obtenida para el mRNA del Ag85B es específica lo que permitirá emitir resultados precisos.

Por último, el método de extracción desarrollado específicamente para los sedimentos de cultivo H37Rv de *M. tuberculosis* se modificó y probó para la extracción de RNA en muestras de expectoración y lavado bronquial considerando que son las muestras clínicas más comúnmente colectadas para confirmar el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar. Las 25 muestras biológicas empleadas en este estudio provenían de pacientes con diagnóstico de tuberculosis con base al cuadro clínico reportado para tuberculosis y sin reporte de tratamiento antituberculoso previo para la misma. Cabe destacar que la extracción del RNA a las muestras se realizó de manera inmediata posterior a la toma, en un periodo de 3-4 horas durante el cual se mantuvieron en refrigeración de 4° C, con el objetivo de evitar afección en el rendimiento del RNA, razón por la cual no se realizó antes un diagnóstico de laboratorio que permitiera confirmar la presencia de *M. tuberculosis*; no obstante, para cada muestra, se corrió simultáneamente con la qRT-PCR para el Ag85B un ensayo de PCR punto final por el Laboratorio de Diagnóstico y Tipificación Molecular del InDRE para el diagnóstico de Tuberculosis por detección de la secuencia IS6110 a partir de DNA y así obtener un punto de comparación final. Sin embargo, 22 de 25 muestras resultaron negativas para la secuencia IS6110, resultando de 3 muestras positivas y únicamente 1 positiva para el mRNA del Ag85B, reportando un valor de Ct de amplificación de 35.40 como se observa en la figura 13. Para evaluar la calidad de la extracción sobre las muestras respiratorias se recurrió a la amplificación del gen RNasa P presente en las muestras clínicas provenientes de humano, que se desempeñó como un control extracción, donde las curvas para esta reacción muestran el cruce de la línea umbral obteniendo un valor de Ct entre 20-35, lo que indica la presencia de RNA suficiente del gen humano RNasa P y por lo que la muestra es de calidad aceptable, como consecuencia de una extracción apropiada sin pérdida de RNA, (43). Finalmente la falta de muestras clínicas con un adecuado diagnóstico previo es necesario para poder validar el método propuesto en este estudio, sin embargo, sienta las bases para la estandarización de las condiciones de extracción adecuadas, así como las condiciones de amplificación para qRT-PCR, para poder establecer futuros estudios de validación del método.

13. Conclusiones

- De los “6” número de protocolos probados para la extracción de RNA total, se determinó que el mejor fue el Trizol-LS fenol ácido 4 (PE6).
- Se logró la extracción del mRNA del Ag85B de *M. tuberculosis* a partir de la cepa H37Rv, resultando efectiva su amplificación mediante las condiciones de amplificación propuestas para qRT-PCR al emitir un valor de Ct variable entre un rango de 29-38.
- La amplificación de una fracción del gen rRNA 16s, se mantuvo constante con el método de extracción RNA total por Trizol-LS fenol ácido 4 (PE6), lo que permitió determinar que las condiciones de extracción eran adecuadas para mantener estable la fracción total de RNA.
- La ausencia de DNA contaminante permitió asegurar la pureza de los extractos de RNA obtenidos.
- La sensibilidad del ensayo sobre muestras de expectoración carece de confiabilidad debido a la falta de muestras positivas a *M. tuberculosis*, por lo tanto se sugiere reanudar el desarrollo de protocolos para la obtención de un mayor número de muestras y muestras positivas confirmadas para llevar a cabo la validez de los métodos de extracción y qRT-PCR propuestos en este estudio.
- El presente trabajo establece las bases para el desarrollo de un proyecto multidisciplinario que permita validar los métodos propuestos para ser empleados como un diagnóstico de rutina.

Resulta de gran beneficio la sensibilidad y velocidad que ofrece la qRT-PCR sobre otros métodos convencionales para la medición de RNA. Sin embargo se requiere normalizar la técnica mediante una serie de estrategias por elegir como normalizar el tamaño de la muestra, normalizar la cantidad de RNA total o mediante la cuantificación de un control para demostrar la eficiencia y sensibilidad de la técnica.

Tomando en cuenta los recursos de que se dispone en el país como la extensa infraestructura de servicios de salud, se puede incidir en el problema de salud que implica la tuberculosis en tanto se unan medios y voluntades orientados hacia un solo propósito, el beneficio a la población.

14. Referencias bibliográficas

1. Alcaide Fernando. 2009. ¿Qué aporta la biología molecular al diagnóstico de la tuberculosis?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*; 27(9): 493-495.
2. Hellyer T.J., Fletcher T.W., Bates J.H. 1996. Strand Displacement Amplification and the Polymerase chain Reaction for Monitoring Response to Treatment in Patients with Pulmonary tuberculosis. *Journal Infect. Dis*; 173 (4): 934-941.
3. H. Jordan, J. Solus. 1999. Multiplex PCR of Dinucleotide Repeat Markers. *Focus*; 21: 7-9.
4. ZaaidI N., Konstantinou K., Zervos M. 2003. The role of Molecular Biology and Nucleic Acid Technology in the Study of Human Infection and Epidemiology. *Arch. Pathol. Lab. Med*; 127: 1098-1105.
5. Folgueira L., Delgado R., Palenque E., Aguado J., Nogueira A. 1996. Rapid Diagnostic of Mycobacterium tuberculosis Bacteremia by PCR. *J. Clin. Microbiol*; 34 (3): 512-515.
6. Desjardin L.E., Perkins M., Teixeira L., Cave M., Eisenach K. 1996. Alkaline Descontamination of Sputum Specimens Adversely Affects Stability of Mycobacterial mRNA. *J. Clin. Microbiol*; 34 (10): 2435-2439.
7. Pai S.R., Actor J.K., Sepulveda E., Hunter R.L., Jagannath C. 2000. Identification of Viable and Non-viable Mycobacterium tuberculosis in Mouse Organs by Direct RT-PCR for Antigen 85B mRNA. *Microbial Pathogenesis*; 28 (6):335-342.
8. Hellyer T.J., Desjardin L.E., Hehman G.L., Cave M.D., Eisenach K.D. 1999. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol*; 37 (2): 290-295.
9. Moreno Gómez Martha. 2008. Situación epidemiológica de la tuberculosis en el área de salud de Salamanca; Cumplimiento terapéutico y resultados del tratamiento. Universidad de Salamanca, Departamento de medicina preventiva.
10. Ospina O. Sigifredo, MD. 2001. La tuberculosis, una perspectiva histórico-epidemiológica. *Asociación Colombiana de infectología*; 5 (4): 241-250.
11. Jave Oswaldo. 2009. Investigando en tuberculosis. ¿Dónde estamos, quiénes somos, hacia dónde nos dirigimos? (Revisión). *Perú Med. Exp. Salud Pública*; 26 (3): 276-277.

12. Farga C. Victorino. 2004. La conquista de la tuberculosis (Revision). Chil. Enf. Respir; 20 (2): 101-108.
13. Shinnick T.M, Good R.C. 1994. Mycobacterial taxonomy. J. Clin. Microbiol. Infect; 13 (11): 884-901.
14. Selman B. Carolina, Poggi M. Helena, C. Román Juan, García C. Patricia, Lagos L. Marcela. 2009. Análisis retrospectivo del rendimiento de Amplicor-PCR para la detección de Mycobacterium tuberculosis en muestras respiratorias y no respiratorias con baciloscopia negativa. Rev. Chil. Infect; 26 (6): 495-498.
15. A. Fuselier Pamela, Mt, Garcia Lynnes Ms.F., Garay W. Procop, MD, B. Thomson Richard Jr., PhD., K. York Mary, PhD. 2004. Diagnóstico Microbiológico. Un décima edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina; pg 562 y 563.
16. R. Murray Patrick, S. Rosenthal Ken, S. Kobayashi George, A. Pfaller Michael. 2002. Microbiología Médica. 4ª Edición. Ed. Elsevier. España. pg 361-365.
17. Guía de atención de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. 1998. Ministerio de salud de República de Colombia.
18. Orozco Andrade Isaías, Dr., Nesbitt Falomir Carlos, Dr., González Ortiz Salvador, Dr. 2009. Tuberculosis en Pediatría: Epidemiología (Revisión); Enf. Inf. Ped. 22(87): 83-90.
19. Mariscal Méndez Araceli, MVZ, Ramírez Palacios Claudia de Jesús, QFB, González Sánchez Laura, MSc, Zenteno Cuevas Roberto, PhD. 2005. Pobreza, resistencia a los medicamentos, diagnóstico, VIH-SIDA y su impacto en la evolución de la tuberculosis en México (Revisión). MedUNAB; 8 (1): 37-42.
20. Global tuberculosis control. 2010. World Health Organization.
21. Nava O., Prieto L. 2001. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis pulmonar (Revisión). Kasmera; 29 (1): 51-53.
22. Domínguez José, Blanco Silvia, Lacoma Alicia, García Sierra Nerea, Prat Cristina, Ausina Vicente. 2008. Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin; 26 (Supl 9): 33-41.
23. Guevara Armando, Reyes Emir, Waard Jacobus, Araque María. 2006. Optimización de un método de preparación de DNA a partir de muestras de esputo

- para la detección por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Mycobacterium tuberculosis*. *Ciencia*; 14 (1): 46-55.
24. B. Coleman William, J. Tsongalis Gregory. 2004. *Molecular Diagnostics for the clinical laboratorian*. Ed. Human Press. USA. pg 17-19.
 25. J. Brooker Robert 2005. *Genetics analysis and principles*. Second edition. Ed. Higher Education. Mc Graw Hill. pg 235.
 26. S. Klug William, R. Cummings Michael, A. Spencer Charlotte. 2006. *Conceptos de Genética*. 8ª Edición. Ed. Prentice Hall Pearson. España. pg 286, 288 y 384.
 27. A. Pierce Benjamín. 2008. *Genetics a conceptual approach*. Third edition. Ed. W. H. Freeman and Company. New York. pg 350-351 y 383-385.
 28. D. Taug C. Moussard. 2006. *Fundamentos de las técnicas de biología molecular*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pg 86 y 87.
 29. *Introducción al PCR en tiempo real*. Sistema 7300, 7500 y 7500 FastApplied Biosystems.
 30. *Microbial systems*, S.L. Parc Científic de la UdG. 2009. *Sistemas de detección de patógenos por PCR a tiempo real*. Guía de interpretación de resultados.
 31. Araujo Zaida, Acosta Mariana, Escobar Hemir. 2008. *Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de Mycobacterium tuberculosis en la protección, patología y diagnóstico (Revisión)*. *Invest. Clín*; 49 (3): 411-441.
 32. M. Devlin Thomas. 2006. *Bioquímica, Libro de texto con aplicaciones bioquímicas*. 4a ed. Ed. Reverte. España. pg 77-80.
 33. *Life technologies*. 1999. *Trizol-LS Reagents*. Total RNA isolation LS Reagents.
 34. *Sample and Assay Technologies*. 2010. *QIAamp Viral RNA Handbook*. Third Edition. QIAGEN.
 35. Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. 2005. *Review Real-time, RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. *J. Genes and Immunity*; 6: 279-284.
 36. Eltringham I.J., Drobniewski F.A., Mangan J.A., Butcher P.D., S.M. Wilson. 1999. *Evaluation of Reverse Transcription-PCR and a Bacteriophage-Based Assay for Rapid Phenotypic Detection of Rifampin Resistance in Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*; 37 (11): 3524-3527.

37. Speedtools total RNA extraction kit. 2008. Protocolo adicional de purificación de RNA total a partir de cultivos de bacterias: Preparación de la muestra.
38. K. Evans Judith, Troilo Philip, J. Ledwith Brian. 1998. Simultaneous Purification of RNA and DNA from Liver Using sodium Acetate Precipitation. *BioTechniques*; 24 (3): 416-418.
39. A. Bustin Stephen, Nola Tania. 2004. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques*; 15 (3): 155–166.
40. Andreu Martín Núria. 2007. Estudio de la implicación de los Genes Rv0576-Rv0577 en la tinción con rojo neutro y la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Doctorado, Universidad autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
41. Mangan J.A., Sole K., Mitchison D.A., Butcher P.D. 1997. An effective method of RNA extraction from bacteria refractory to disruption, including mycobacteria. *Nucleic Acids Research*; 25 (3): 675-676.
42. Slater R.J. 1986. *Experiments in molecular biology*. Humana Press. USA. pp. 109-129
43. Centro Colaborador para la Influenza de la OMS, CDC Atlanta, Estados Unidos de América. 2009. Protocolo del CDC para el RT-PCR en tiempo real para el nuevo subtipo del virus de influenza A (H1N1).
44. Ruiz-Manzano Juan, Blanquer Rafael, Calpe José Luis, A. Caminero José, Caylà Joan, A. Domínguez José, García José María, Vida Rafael. 2008. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol*; 44 (10): 551-566.
45. Alcaide Fernández de Vega Fernando. 2006. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín*; 24 Supl 1:53-57.

URL (Uniform Resource Locators). Última visita 14 de diciembre del 2011

URL¹: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr11_executive_summary_es.pdf

URL²: <http://www.encolombia.com/medicina/academedicina/academ25262resumenhist.htm>

URL³: http://www.slideshare.net/augusto_vergel/tuberculosis-289277

URL⁴: http://www.mediterraneo.cl/documentos/catalogo/extracto_978-956-220-312-8.pdf

URL⁵: <http://matasanos.org/2011/03/22/dia-mundial-de-la-tuberculosis-%C2%BFque-pasa-en-chile/>

URL⁶: <http://www.niaid.nih.gov/topics/tuberculosis/Understanding/Pages/cause.aspx>.

URL⁷: <http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/signsandsymptoms.htm>

URL⁸: <http://cenave.gob.mx/tuberculosis/>

URL⁹: http://www.ehu.es/SGIker/es/expresion_genica/documentos/analisis_de_expresion.pdf

URL¹⁰: [http://www.news-medical.net/health/What-is-Tuberculosis %28Spanish%29.aspx](http://www.news-medical.net/health/What-is-Tuberculosis%28Spanish%29.aspx)

URL¹¹: http://susanahoyosmontoyabdc.blogspot.com/2010_09_01_archive.html

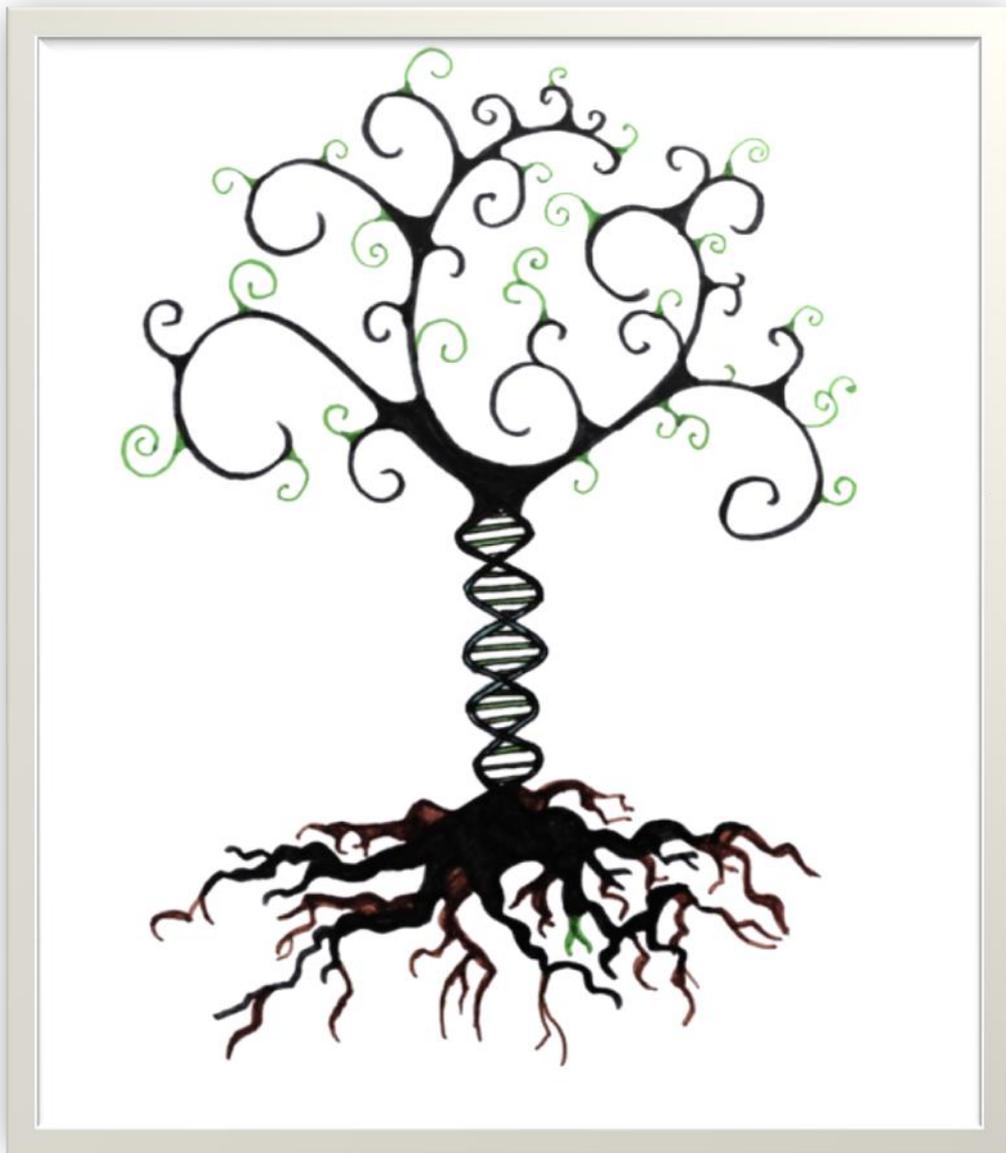
URL¹²: <http://virtualciencias.wordpress.com/>

URL¹³: <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab>

URL¹⁴: http://www.siumed.edu/~bbartholomew/course_material/methods_B.html

URL¹⁵: <http://piel-1.org/libreria/item/1074>

URL¹⁶: http://www.cochrane.ihcai.org/programa_seguridad_paciente_costa_rica/pdfs/25Tratamiento-de-la-Tuberculosis.pdf



*Serás sometida a diversas pruebas en la vida para ver
si eres o no fuerte y pura. Toda creencia y valor será puesto
a prueba, así como el fuego pone a prueba el oro y lo purifica y si
permaneces fuerte después de ello esto te traerá alegría, gloria y honor.*

Ésp