

00549



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“Optimización del PCR y comparación
con cultivo para la detección de
M. tuberculosis en muestras clínicas”

T E S I S

Que para obtener el Título de:

ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA

P r e s e n t a:

Q.F.B. Olga Verónica Barrales Benítez



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

OPTIMIZACION DEL PCR Y COMPARACION
CON CULTIVO PARA LA DETECCION DE
M.tuberculosis EN MUESTRAS CLINICAS.

NOMBRE DEL ASESOR: DR. JAVIER GARCES EISELE

LUGAR DE REALIZACION: LABORATORIOS CLINICOS
DE PUEBLA.

QFB OLGA VERONICA BARRALES BENITEZ.

1. Tabla de Contenido

1. TABLA DE CONTENIDO	1
2. ABREVIATURAS	3
3. INTRODUCCIÓN	4
4. OBJETIVOS	7
4.1 OBJETIVO GENERAL	7
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
5. MATERIAL Y MÉTODOS	8
5.1 MUESTRAS CLÍNICAS	8
5.1.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS CLÍNICAS	8
5.1.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS	8
5.2 PURIFICACIÓN DEL DNA DE MUESTRAS CLÍNICAS	8
5.2.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN FENOL-CLOROFORMIO	9
5.3 AMPLIFICACIÓN DEL DNA	9
5.4 MARCAJE DE UNA SONDA DE DNA DE 188 PB	10
5.5 DETECCIÓN DEL DNA AMPLIFICADO	10
6. RESULTADOS	11
6.1 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN DE PCR Y DE DETECCIÓN.	11
6.1.1 CONDICIONES DE REACCIÓN DE PCR	11
6.1.2 CONCENTRACION ÓPTIMA DE SONDA MARCADA	12
6.2 SENSIBILIDAD DE PCR Y DE DETECCIÓN	12
6.3 OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	14
6.3.1 COMPROBACION DE LAS PROPIEDADES DEL SILECT Y DIACOMEAS	14
6.3.2 ELIMINACIÓN DE INHIBIDORES PARA PCR	16
6.3.3 COMBINACION DE TRATAMIENTOS	18
6.4 COMPARACION DEL MÉTODO DE PCR Y DEL CULTIVO.	18
7. DISCUSIÓN	21

8. CONCLUSIÓN	24
---------------	----

9. BIBLIOGRAFÍA	25
-----------------	----

2. Abreviaturas

A: Adenina
Baar: Bacilos ácido-alcohol resistentes
BCG: Bacilo Calmette Guérin
BrEt: Bromuro de etidio
C: Citosina
C.E.: Control estandar
CO₂: Bióxido de carbono.
DNA: Acido desoxirribonucleico
dNTPs: Trifosfatos de desoxirribonucleótidos
EDTA: Acido etilen-diamin-tetra acético.
G: Guanina
HCl: Acido clorhidrico.
KCl: Cloruro de potasio
MgCl₂: Cloruro de magnesio.
M.tb: Mycobacterium tuberculosis.
MPM: Marcador de peso molecular.
NaCl: Cloruro de sodio.
NaOH: Hidróxido de sodio
Oligos: oligonucleótidos.
pb: pares de bases.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
SDS: dodecil sulfato de sodio.
SIDA: Síndrome de inmuno-deficiencia adquirida.
SSC: Solución de citrato y cloruro de sodio.
T: Timina.
Taq: Thermophilus aquaticus.
TCG: Tiocianato de guanidina.
TE: Tris-HCl y EDTA.
TES: Tris-HCl, EDTA y N-laurilsarcosina.
Tris: Tri-(hidroximetil)-aminometano.
U: Uracilo.
UV: ultravioleta.
ZN: Ziehl-Neelsen, tinción
0.1 x: 0.1 veces concentrado.
2 x: 2 veces concentrado
20 x: 20 veces concentrado

3. Introducción

Se estima que la mitad de la población en el mundo ha sido infectada por el bacilo *M.tuberculosis* (*M.tb*), que hay 30 millones de casos de tuberculosis activa, que aparecen 10 millones de casos nuevos en un año, y que llegan a morir alrededor de tres millones de personas por este padecimiento. La enfermedad predomina en los países pobres, con problemas de saneamiento ambiental y con alta desnutrición (Torres, 1995).

En México, en 1922 (año en que se inició el programa de vacunación) la tasa de mortalidad era de 80 por 100 000 habitantes, en 1990 fue de 7.4 por 100 000 habitantes y ocupó el lugar 15 dentro de las primeras 20 causas de muerte en ese año. Para 1993 la tasa había disminuido hasta 5.5 por 100 000 habitantes, pero se detectaron 20 000 casos nuevos, de los que el 95 % eran de tipo pulmonar. Estas cifras, que reflejan sin duda los avances que en materia de salud ha logrado el país, muestran, sin embargo, los rezagos que aún persisten en nuestra sociedad.

Dentro de las posibles explicaciones de porque la tuberculosis tiende al incremento, están: el aumento en la población mundial así como la pobreza; la mayor esperanza de vida, que incrementa el tiempo durante el cual una persona está expuesta al riesgo de enfermar; el inicio de la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), ya que se considera que entre 20 y 30 % de los pacientes manifiestan alguna forma de infección tuberculosa, en el transcurso del padecimiento; la mayor resistencia del bacilo a los fármacos tradicionales y a su mal empleo. Con respecto a esto, la Secretaría de Salud reporta el aislamiento de 62 % de cepas de *M.tb* resistentes a isoniazida en 1992, en pacientes con enfermedad recurrente, mucho mayor al de 1959 que fue del 40 % (Torres, 1995).

Un diagnóstico correcto de la enfermedad por micobacterias es importante, debido a que el tratamiento de la tuberculosis es diferente al de enfermedades causadas por otras micobacterias, las cuales con frecuencia son resistentes a las drogas usadas en el caso de *M.tb* (Kotloff, 1993; Hoffner, 1994).

El diagnóstico de laboratorio de tuberculosis está basado en el método tradicional de tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) para bacilos ácido-alcohol resistentes (Baar), y en el cultivo del organismo causal, *M.tb*. La tinción de ZN a pesar de ser rápida y barata, carece de sensibilidad ya que la mínima concentración de bacilos que puede detectar es de 10,000 organismos/ml (Yeager, 1967). Además, carece de especificidad y no puede ser usada para distinguir entre los varios miembros de la familia *Mycobacteriaceae* (De Wit, 1990).

El método de cultivo es sensible ya que detecta de 10 a 100 organismos por muestra; (Hobby, 1973), pero debido a que requiere la multiplicación del bacilo que es un proceso muy largo, las decisiones clínicas y terapéuticas se hacen antes de que el resultado del laboratorio sea dado. Las técnicas de cultivo requieren también de organismos viables, y esto es un problema frecuente en pacientes parcialmente tratados. Además, los

procedimientos estándar requieren de por lo menos tres muestras cultivadas para asegurar resultados confiables, sobre todo cuando pocos microorganismos están presentes en el sitio de infección, lo cual prolonga aún más el tiempo de diagnóstico y retarda el inicio de la terapia (Bass, 1990)

Las técnicas serológicas pueden ser útiles en algunas situaciones clínicas, pero su sensibilidad y especificidad no es satisfactoria (Daniel, 1987). Por otra parte, la cromatografía de gases ha mostrado ser útil para la identificación de micobacterias cultivadas, pero este método no es sensible para ser usado en muestras clínicas (Larsson, 1986). Otra técnica empleada es la espectrometría de masa, que permite determinar ácido tuberculoesteárico en muestras clínicas, pero que requiere de equipo muy costoso (Larsson, 1987).

Se han descrito técnicas más rápidas como el sistema de detección BACTEC, el cual se basa en la medición de dióxido de carbono (CO₂) radiactivo liberado por el metabolismo del palmitato adicionado al cultivo (Peterson, 1989), o el sistema de identificación Gen-Probe, el cual se basa en la hibridación de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) marcados con ésteres de acridinio específicos para ácido ribonucleico ribosomal (Vlaspolder, 1995). A pesar de que estas técnicas reducen el tiempo de identificación, requieren de por lo menos una semana de periodo de cultivo en el caso del método de BACTEC, o no pueden eliminar inhibidores para el proceso de amplificación como ocurre con el de Gen-Probe.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método *in vitro*, que permite la amplificación específica de una secuencia blanco de ácidos nucleicos, a través de ciclos repetidos de desnaturalización térmica, alineación y extensión del oligonucleótido (oligo) cebador por medio de una DNA polimerasa termoestable (Saiki, 1988). Debido a las limitaciones de los métodos antes mencionados para el diagnóstico de tuberculosis, varios grupos han desarrollado ensayos de PCR para la detección directa e identificación de *M.tb* en muestras clínicas (Brisson-Nöel, 1991; DeWit, 1990; Eisenach, 1991; Kolk, 1992).

La mayoría de las pruebas de PCR se basan en la amplificación de la secuencia repetitiva IS6110, que ha sido encontrada exclusivamente en el grupo de micobacterias del complejo de *M.tb* (Hermans, 1990; Brisson-Nöel, 1991; Otal, 1991; Clarridge, 1993; Nolte, 1993; Forbes, 1993; Shavvar, 1993; Kox, 1994). El elemento IS6110 contiene 1,361 pares de bases (pb) de longitud y posee similitudes a las secuencias de inserción de la familia IS3 (Timmerman, 1985). A pesar de que la mayoría de las cepas del complejo de *M.tb* presentan múltiples copias de IS6110, estimándose un promedio de 10 a 20 copias, se han encontrado cepas que contienen muy pocas copias. Esto se observó durante un estudio realizado en la India, en donde se encontró un 31% de cepas con una sola copia y una sola cepa que careció del elemento IS6110 (van Soolingen, 1993). Otro caso raramente observado fue el reportado en zonas del Oriente y en Vietnam, en donde también encontraron cepas de *M.tb* con una sola copia de IS6110 (van Soolingen, 1991; Otal, 1991; Mazurek, 1991). Por lo que la experiencia general es, que las cepas de *M.tb*

contienen múltiples copias del elemento IS6110 y al presentarlo, están epidemiológicamente relacionadas (van Soolingen, 1993)

No obstante la importancia del uso de PCR para la detección de microorganismos patógenos, la purificación de ácidos nucleicos de especímenes como orina, suero, o cultivos bacterianos, continúa siendo laborioso y muy tardado. Entre los procedimientos clásicos reportados se encuentran los que involucran lisis mediada por detergente, tratamiento con proteinasa, extracciones con solventes orgánicos, y precipitación con etanol, los cuales no garantizan la eliminación de inhibidores de la amplificación y generalmente, afectan la sensibilidad del método de PCR. Debido a esto, Boom y cols. diseñaron un procedimiento de purificación de ácidos nucleicos de muestras como suero u orina, empleando partículas de sílice o diatomeas suspendidas en el agente desnaturizante tiocianato de guanidina (TCG); el cual demostró ser sensible, reproducible, rápido y sencillo (Boom, 1990).

En el presente estudio se empleó el método de PCR y una sonda marcada con digoxigenina, para la detección rápida, sensible y específica del complejo de *M.tb* en muestras clínicas. Desarrollamos el procedimiento de purificación de DNA con partículas de sílice, para favorecer la sensibilidad del PCR y comprobamos que este método tiene valor diagnóstico para muestras con Baar positivo, comparables a los del método de cultivo.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Estandarizar el método de obtención de DNA de micobacterias y determinar el valor diagnóstico del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en base a un estándar de oro (método de cultivo); para la detección rápida, sensible y específica de *M. tuberculosis* en muestras clínicas

4.2 Objetivos Específicos

- 1 - Determinar las características del método de purificación de ácidos nucleicos (DNA), con partículas de sílice o diatomeas
- 2 - Evaluar la eliminación de inhibidores para PCR de muestras clínicas, mediante el empleo de partículas de sílice suspendidas en tiocianato de guanidina (TCG)
- 3 - Comparar el método de purificación con sílice con otro tratamiento de obtención de ácido desoxirribonucleico (DNA).
- 4 - Comparar el método de amplificación y detección con el método clásico de cultivo en medio sólido, para el diagnóstico de *M.tb* en muestras clínicas.

5. Material y Métodos

5.1 Muestras clínicas

5.1.1 Recolección de muestras clínicas

Las muestras clínicas fueron obtenidas de pacientes provenientes del Laboratorio de Salud Pública del Estado de Puebla, las cuales en su mayoría fueron expectoraciones de personas que pertenecían a un programa epidemiológico, y de los Laboratorios Clínicos de Puebla de pacientes que fueron referidos para búsqueda de *M.tb* por cultivo (orinas, expectoraciones, jugo gástrico, líquido seminal, líquido pleural)

5.1.2 Tratamiento de las muestras clínicas

5.1.2.1 Procedimiento de descontaminación de las muestras

La mayoría de las muestras fueron descontaminadas según el método de Kubica y colaboradores, que consistió en incubación con NaOH/citrato de sodio/N-acetil-L-cisteína por 30 min y centrifugación, para eliminar el sobrenadante hasta dejar un volumen aproximado de 1 ml, en el cual se suspendió el sedimento (1963). Este procedimiento de descontaminación no se aplicó en muestras de orina y líquido pleural, debido a que se consideró no estaban muy contaminadas y el sedimento fue escaso

5.1.2.2 Tinción y cultivo de las muestras

El sedimento obtenido por previa descontaminación se dividió en tres alícuotas. En la primera se realizó tinción para Baar mediante el método de Ziehl-Neelsen, y la segunda fue tratada por el método clásico de cultivo en medio sólido Löwenstein-Jensen. La tercera se ocupó para PCR.

5.2 Purificación del DNA de muestras clínicas

De la tercera alícuota se extrajo DNA para el PCR, para lo cual se empleó el método de Boom y colaboradores (1990), el cual se basa en la adsorción de ácidos nucleicos a partículas de sílice en medios de alta concentración salina. Este método tuvo pequeñas modificaciones en cuanto a la cantidad de amortiguador de lisis, sílice y suspensión de diatomeas.

La alícuota se centrifugó por 3 min a 12,500 rpm para eliminar el sobrenadante y añadir un volumen aproximado de 150 µl de amortiguador de TES (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.5 mM, pH 7.5, N-laurilsarcosina al 0.5%), colocándose posteriormente a 95°C por 45 min (ver resultados). Después, se adicionó 120 µl de esta alícuota tratada a cada tubo que contenía la suspensión para purificación. Este tubo se preparó con 500 µl de

amortiguador de lisis (solución 4M de tiocianato de guanidina, citrato de sodio 25 mM pH 7.0, N-laurilsarcosina al 0.5% y 2-mercaptoetanol 0.1M) y 30 µl de partículas de sílice para muestras con escasa cantidad de DNA, es decir, orina, diversos líquidos corporales, o 40 µl de suspensión de diatomeas, para muestras ricas en DNA como expectoraciones.

A partir de este paso se realizó el tratamiento de las muestras que se emplearon durante la estandarización del procedimiento de purificación de DNA, para la comprobación de las propiedades del sílice o diatomeas. De la misma forma se trató una serie de 10 sedimentos urinarios, que se ocuparon en la comparación de los métodos para obtención de DNA, libre de inhibidores para PCR.

Después de 10 min de estar en contacto con las partículas de sílice o diatomeas, se centrifugó la muestra por 1 min a 12,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante para luego lavar con amortiguador de lisis una vez, a continuación 2 veces con etanol al 80% y por último, una vez con cetona, empleando para cada uno 500 µl de la solución respectiva. Se resuspendió el botón con 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.5 mM) para luego incubarlo por 10 min a 60°C, agitando por 10 s el tubo en vortex, antes y después de la incubación. Se centrifugó por 6 min a 12,500 rpm, se tomó el sobrenadante y se volvió a centrifugar de la misma forma la muestra, para poder eliminar totalmente el sílice. De aquí se tomaron 2 µl para el PCR teniendo mucho cuidado de tomar solo de la parte superior, para evitar cualquier posibilidad de llevar en la punta de la pipeta alguna partícula de sílice, que pudiera inhibir la amplificación (ver resultados).

5.2.1 Método de extracción fenol-cloroformo

Este tratamiento se empleó en muestras de orina (sedimentos), que fueron suspendidas en TES y previamente incubadas a 95°C por 45 min. A esta serie de 10 muestras, se les adicionó una concentración estándar de DNA de *M.tb.* (200 copias/µl), para después hacerles una primera extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (pH 8.0), y una segunda extracción con cloroformo/alcohol isoamílico. A continuación el DNA fue precipitado con acetato de sodio pH 5.2/etanol y redisolto en 100 µl de TE (Brisson-Noël y cols., 1989).

5.3 Amplificación del DNA

La amplificación por PCR se realizó empleando los oligos, INS1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3') e INS2 (5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3') correspondientes a los pares de bases 631 a 650 y 856 a 875, respectivamente del elemento de inserción IS6110 (McAdam y cols., 1990). La composición de la mezcla para PCR fue 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.005 mg/ml de gelatina, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs (dCTP, dATP, dGTP y dUTP), 0.4 µM de cada uno de los oligos INS1 e INS2 y 1U de *Taq* polimerasa por 50 µl de volumen de reacción (Kolk y cols., 1990). Se agregó 2 µl del DNA extraído de la muestra al tubo de reacción y se llevó a 40 ciclos térmicos de 15 s a 95°C, 20 s a 65°C y 20 s a 72°C; realizados en un termociclador Perkin Elmer 9600. Se incluyó en cada amplificación un

control positivo que correspondió a 200 copias/ μ l de DNA de *M.tb.*, un control negativo formado por los reactivos sin DNA, y un control interno que además de contener la muestra se le adicionó 200 copias/ μ l de DNA de *M.tb.*

5.4 Marcaje de una sonda de DNA de 188 pb

Un fragmento de 188 pb situado dentro del fragmento de 245 pb de la secuencia de inserción IS6110 de *M.tb.*, fue marcado con digoxigenina-11-dUTP en una PCR, según Kolk y colaboradores. Para esto se sintetizaron los oligos anidados Pt3 (5'-GAACGGCTGATGACCAAACCT) y Pt6 (5'-ACGTAGGC GAACCCTGCCCA), correspondientes a los pares de bases 661 a 683 y 832 a 851 de la secuencia de inserción IS6110. El PCR se desarrolló usando un volumen de reacción de 100 μ l, 150 μ M de dUTP con 50 μ M de digoxigenina-dUTP en lugar de 200 μ M de dUTP, y 1 ng. de DNA puro de *M.tb.* Los ciclos incluyeron uno inicial de 1 min a 95°C para desnaturalización, 20 s a 65°C y 20 s a 72°C; y los siguientes 39 ciclos fueron de 15 s a 95°C, 20 s a 65°C y 20 s a 72°C.

5.5 Detección del DNA amplificado

El análisis de los productos amplificados se desarrolló por electroforesis en geles de poliacrilamida al 4.5%, teñidos con bromuro de etidio (BrEt), que fueron fotografiados usando un transiluminador UV. Posteriormente, se realizó la detección por "dot blot" tomando 5 μ l del producto amplificado que fue diluido con 295 μ l de TE, para desnaturalizarlo a 95°C por 10 min. De la misma manera se trató el DNA humano, empleado para determinar la concentración óptima de sonda marcada (ver resultados). Inmediatamente se enfrió y se colocó en una membrana de nylon, a la que previamente se incubó por 2 min en una solución 2 x SSC (20 x SSC es NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M pH 7.0 en agua Milli-Q). La membrana se colocó en un aparato de "dot blot", para aplicarle un vacío de 40 cm de agua. La prehibridación e hibridación se desarrollaron en una bolsa de plástico, a 68°C por 1 h (Boehringer). Se empleó aproximadamente 6 ml de solución de hibridación por cada 100 cm² de membrana, que contenía 1 μ l de sonda marcada por cada ml (ver resultados), recién desnaturalizada.

Las membranas se lavaron 2 veces por 5 min con 2 x SSC- 0.1 % SDS a temperatura ambiente, y 2 veces por 15 min con 0.1 x SSC- 0.1 % SDS a 68°C. Se continuó el proceso de detección de acuerdo al instructivo de manufactura (Boehringer), dejándolo teñir por aproximadamente 45 min.

6. Resultados

6.1 Optimización de las condiciones de reacción de PCR y de detección.

6.1.1 Condiciones de reacción de PCR.

Para la amplificación del fragmento IS6110 de *M.tb* nos basamos en las condiciones previamente reportadas por Brisson-Noel y cols., que emplearon 50 µl de mezcla de reacción que contenía: solución amortiguadora 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, gelatina 10 mg/l, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, 50 pM de oligos, 2.5 U de *Taq* polimerasa y 2 µl de DNA de *M.tb* puro (1989). Esta amplificación dió como resultado la presencia de varias bandas inespecíficas, que disminuyen la sensibilidad del método, debido a que éstas compiten con las bandas específicas por la *Taq* polimerasa. Para eliminar estas bandas, los parámetros que suelen influir principalmente son la temperatura de alineación y la concentración de MgCl₂. Inicialmente se varió la temperatura de alineación empleando DNA de *M.tb* puro y DNA de *M.tb* en 0.1 mg/ml de DNA humano, obteniéndose un resultado óptimo a 65°C (fig. 6.1.1), ya que las bandas inespecíficas desaparecieron casi totalmente, y aumento la intensidad de la banda específica. Después se probó la concentración de MgCl₂ (10, 15 y 20 mM), pero se decidió emplear la reportada de 15 mM puesto que se comprobó era la que más favorecía la sensibilidad y especificidad del método de PCR, ya que generaba una banda de mayor intensidad y nitidez, que se perdía a concentraciones de 10 mM (resultados no mostrados).

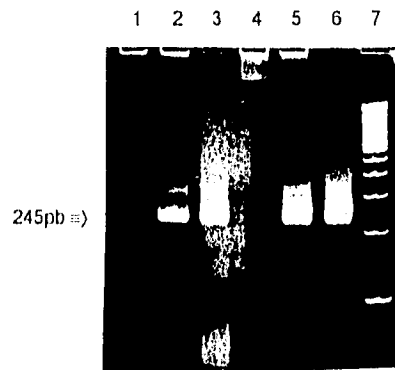


Figura 6.1.1 Temperatura de alineación óptima para PCR. Análisis de la amplificación de un fragmento de 245 pb del elemento de inserción IS6110, en un gel de poli-acrilamida de 4.5 %, teñido con BrEt. Para el PCR se probaron 2 temperaturas de alineación: 62° y 65°C; empleándose el programa de 40 ciclos térmicos de 15 s a 95°C, 20 s a 65°C (ó 62°C) y 20 s a 72°C. Carriles 1 y 4: DNA humano; carriles 2 y 5: DNA humano + DNA *M.tb.*; carriles 3 y 6: DNA *M.tb.*; carril 7 MPM (compuesto de bandas de 100 pb); carriles 1-3: 65°C; carriles 4-6: 62°C.

6.1.2 Concentración óptima de sonda marcada.

Inicialmente un fragmento de la secuencia de inserción IS6110 fue marcado (ver material y métodos). Después se buscó la concentración de sonda que, por un lado, permitiera detectar los productos de amplificación y por otro, previniera su hibridación a sitios no específicos, disminuyendo la especificidad. Para esto se colocó por separado en tres tiras de membrana de nylon: producto de amplificación de *M.tb.*, DNA humano (1 µg) y buffer TE; previamente diluidos y tratados como se menciona en material y métodos. A continuación se hibridó cada tira con 0.05, 0.5 y 5 µl de sonda marcada (figs. 6.1.2A, B y C). Como resultado, se decidió emplear 1 µl de sonda marcada por cada 10 cm² de membrana, para poder detectar los productos de amplificación y evitar que con un exceso de sonda (10 µl), se hibride a toda la tira de membrana e incluso al DNA humano. Es importante que cada vez que se sintetize la sonda marcada, se determine la concentración óptima para la detección del producto de amplificación

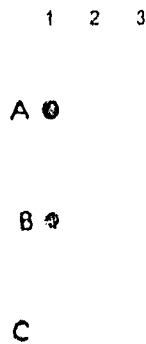


Figura 6.1.2 Concentración óptima de sonda marcada. Se colocaron en tres tiras de membrana de nylon: producto de amplificación de *M.tb.*, DNA humano y buffer TE, previamente diluidos; para realizarles análisis por hibridación en formato de "dot-blot" (ver material y métodos) y determinar la concentración óptima de sonda marcada, para la detección del producto de amplificación. A cada tira se adicionó buffer de hibridación con una concentración diferente de sonda marcada: A: 5 µl; B: 0.5 µl; C: 0.05 µl. Carril 1: producto de amplificación de *M.tb.*; carril 2: DNA humano; carril 3: buffer TE.

6.2 Sensibilidad de PCR y de detección

Para determinar la sensibilidad del PCR y de la detección, se procedió a la amplificación e hibridación de 1, 10 y 100 copias/µl de DNA de *M.tb.* en 0.1 mg/ml de DNA humano (fig. 6.2). El resultado demostró una banda y una mancha claramente detectable y reproducible hasta 10 copias/µl; no así para 1 copia/µl, en donde el resultado

puede deberse a fenómenos aleatorios. Un determinado volumen de producto de amplificación perfectamente mezclado contiene μ copias por unidad de volumen (μ designa el número promedio de copias en cada volumen). Si las copias se hallan distribuidas al azar en ese volumen, en este caso x es una variable aleatoria cuya distribución es igual a: $P(X = x) = \frac{\mu^x e^{-\mu}}{x!}$

En este caso los valores de x pueden variar teóricamente desde cero a infinito. Pero si asumimos que tenemos varias alicuotas con un valor de μ de 10 copias/ μ l, la probabilidad de tener un producto de amplificación con cero copias/ μ l es $P(X=0) = 0.0005$, es decir 1 en 2000. Sin embargo, si tenemos varias alicuotas con un valor de μ de 1 copia/ μ l, la probabilidad de obtener un producto de amplificación con cero copias/ μ l aumenta o se vuelve significativo, $P(X=0) = 0.368$. Por esta razón nuestra sensibilidad fue reproducible hasta 10 copias/ μ l.

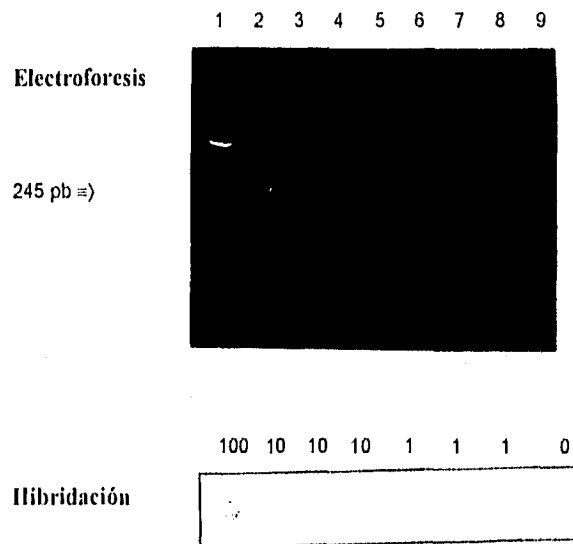


Figura 6.2. Sensibilidad del PCR y de la detección. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 4.5 %, y detección por hibridación en formato de "dot-blot" del producto de amplificación de 1, 10 y 100 copias de DNA de *M.tb.* en 1 μ g de DNA humano. *Carril 1:* MPM (pUC19/HpaII); *carril 2:* 100 copias; *carriles 3-5:* 10 copias; *carriles 6-8:* 1 copia; *carril 9:* cero copias.

6.3 Optimización del tratamiento de la muestra

6.3.1 Comprobación de las propiedades del sílice y diatomeas.

6.3.1.1 Capacidad de fijación de ácidos nucleicos

Para comprobar la capacidad de fijación de ácidos nucleicos a sílice en presencia de agentes como TCG (Boom y cols., 1990), se realizó una serie de diluciones de DNA de *M.tb.* en TE (10^5 a 10^1 copias/ μ l) que fueron tratadas con sílice (ver material y métodos); para luego amplificarse. Posteriormente se compararon con la amplificación de las mismas concentraciones, sin el tratamiento. En base al resultado obtenido, se observó que mediante este método de purificación el DNA de *M.tb.* se fijó a las partículas de sílice, sin que hubiera pérdida del DNA en cada uno de los lavados realizados durante el procedimiento (fig. 6.3.1.1), ya que la intensidad de las bandas después de la amplificación es equivalente, tanto para las diluciones tratadas como para las no tratadas. Por otra parte, al observar la intensidad y nitidez de las bandas obtenidas, se decidió emplear como concentración estándar y control positivo para la amplificación de las diferentes muestras clínicas, 200 copias/ μ l de DNA de *M.tb.*

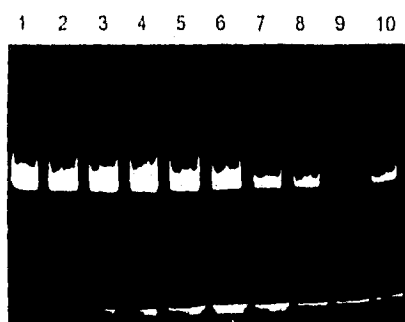


Figura 6.3.1.1 Capacidad de fijación de ácidos nucleicos a sílice. Se analizó el producto de amplificación de una serie de diluciones de DNA de *M.tb.* por electroforesis en gel de poliacrilamida, que previamente fueron purificadas con sílice (ver material y métodos). Las diluciones tratadas fueron comparadas con las mismas, pero sin tratamiento. Carriles 1 y 2: 10^5 copias/ μ l; carriles 3 y 4: 10^4 copias/ μ l; carriles 5 y 6: 10^3 copias/ μ l; carriles 7 y 8: 10^2 copias/ μ l; carriles 9 y 10: 10^1 copias/ μ l. Carriles 1,3,5,7 y 9: diluciones tratadas con sílice; carriles 2,4,6,8 y 10: diluciones no tratadas.

6.3.1.2 Purificación de DNA de *M.tb.* de muestras escasas en células

Para demostrar la capacidad de las partículas de sílice de fijar DNA de *M.tb.* en muestras clínicas con pocas células tales como suero, orina, líquido cefalorraquídeo; se trató de encontrar a partir de que cantidad de DNA las partículas de sílice están saturadas

y se disminuye, por lo tanto, la cantidad recuperada de DNA específico. En base a esto, se hicieron soluciones con concentraciones crecientes de DNA humano (10 ng/ μ l a 500 ng/ μ l), a las que se adicionó una concentración estándar de DNA de *M.tb.* Después, se llevo a cabo la purificación con sílice (ver material y metodos) y la amplificación de éstas muestras.

De acuerdo a la intensidad de la banda en el gel, se obtuvo un resultado aun detectable hasta 500 ng/ μ l de DNA humano en 20 copias/ μ l de DNA de *M.tb.* (fig. 6.3.1.2), con lo cual se determinó que la capacidad de fijación de DNA para partículas de sílice es de 100 μ g/30 μ l de sílice.

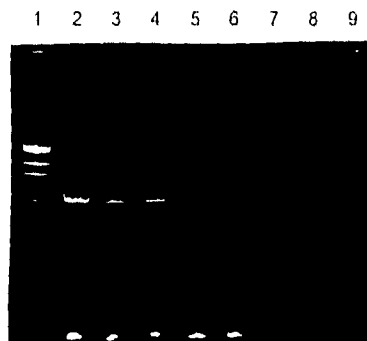


Figura 6.3.1.2 Purificación de DNA de *M.tb.* con sílice. Se analizó el producto de amplificación de muestras que contenían DNA de *M.tb.* (C.E., 20 copias/ μ l), adicionado de cantidades crecientes de DNA humano, por electroforésis en gel de poliacrilamida. Carril 1: MPM; carriles 2 y 3: 2 μ g/ μ l de DNA humano + C.E.; carriles 4 y 5: 10 μ g/ μ l de DNA humano + C.E.; carriles 6 y 7: 20 μ g/ μ l de DNA humano + C.E.; carriles 8 y 9: 100 μ g/ μ l de DNA humano + C.E.

6.3.1.3 Purificación de DNA de *M.tb.* de muestras ricas en células

Para muestras con gran contenido de células tales como sangre periférica, expectoración, jugo gástrico, secreción de ganglio, liquido seminal, la purificación se realizó con tierra de diatomeas. De la misma manera que con sílice, se trató de encontrar cual era la concentración de DNA que saturaba a la partícula de diatomea, para poder obtenerlo de muestras clínicas. Para esto se preparó una serie de soluciones con concentraciones crecientes de DNA humano (10 ng/ μ l a 500 ng/ μ l), a las que se adicionó una concentración estándar de DNA de *M.tb.*, para que luego fueran tratadas con diatomeas (ver material y métodos) y posteriormente amplificadas.

El resultado en el gel fue una banda reproducible hasta 500 ng/ μ l de DNA humano en 20 copias/ μ l de DNA de *M.tb.* (fig. 6.3.1.3), con lo cual, la capacidad de fijación de DNA de las diatomeas fue superior a 100 μ g/40 μ l de diatomeas al 50 %.

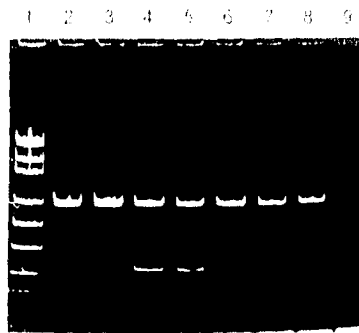


Figura 6.3.1.3 Purificación de DNA de *M.tb* con diatomeas. Se analizó el producto de amplificación de muestras que contenían DNA de *M.tb* (C.E. 20 copias/ μ l), más cantidades crecientes de DNA humano, por electroforesis en gel de poliacrilamida. Carril 1: MPM; carriles 2 y 3: 2 μ g/ μ l de DNA humano + C.E.; carriles 4 y 5: 10 μ g/ μ l de DNA humano + C.E.; carriles 6 y 7: 20 μ g/ μ l de DNA humano + C.E.; carriles 8 y 9: 100 μ g/ μ l de DNA humano + C.E.

6.3.2 Eliminación de inhibidores para PCR

6.3.2.1 Partículas de sílice como potentes inhibidores del PCR

En una serie de muestras en las que se estaba probando la reproducibilidad del método de purificación con sílice, no hubo amplificación de alguna de ellas (fig. 6.3.2.1A), esto sugirió que las partículas de sílice son inhibidores del PCR. Para probar esto a las muestras que no amplificaron se les hizo una segunda centrifugación del tubo, pero por más tiempo que el reportado por Kolk y cols (1992). Se volvió a lanzar la amplificación y el resultado fue positivo (fig. 6.3.2.1B), por lo que se modificó el paso de

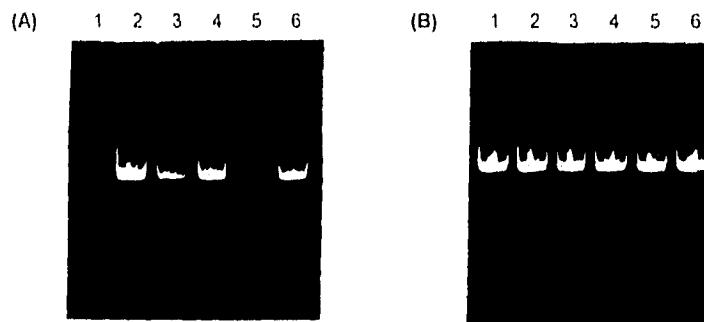


Figura 6.3.2.1A y B Inhibición del PCR por partículas de sílice. Se analizó la amplificación de varias muestras que contenían DNA de *M.tb*, por electroforesis en gel de poliacrilamida, después de purificación con sílice. Carriles 1-6: 200 copias/ μ l de DNA de *M.tb*. A: centrifugación por 2 min en el último paso de la purificación. B: centrifugación de 6 min para eliminar partículas de sílice.

eliminación de las partículas, en el procedimiento de purificación con sílice (ver material y métodos)

6.3.2.2 Extracción fenol-cloroformo versus sílice en TCG

Para demostrar qué tratamiento favorecía la eliminación de inhibidores de PCR, los cuales podrían encontrarse en las muestras clínicas se hizo una comparación de los métodos de obtención de DNA: purificación con sílice y extracción fenol-cloroformo. Para lo cual, se colocaron dos series de 10 muestras de sedimentos urinarios y se adicionó a cada muestra una concentración estandar de DNA de *M.tb* (200 copias/ μ l). A una serie se le hizo extracción con fenol-cloroformo y a la otra purificación con sílice (ver material y métodos)

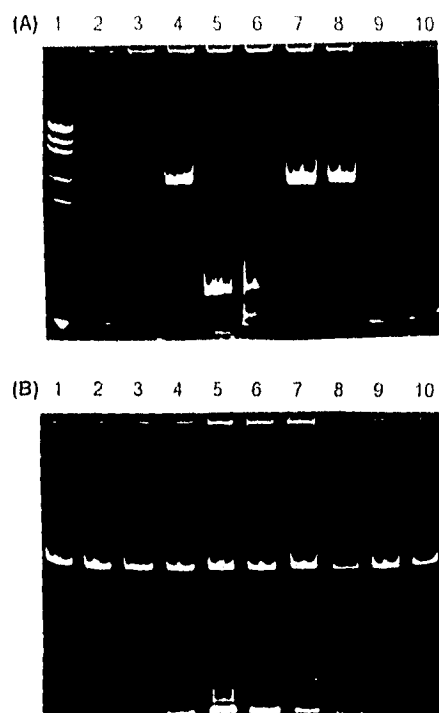


Figura 6.3.2.2A y B Extracción con fenol-cloroformo y purificación con sílice. Se analizó la amplificación de dos series de muestras de orina con DNA de *M.tb*, por electroforesis en gel de poliacrilamida, previamente tratadas con diferentes métodos de obtención del DNA. (A): serie tratada con fenol-cloroformo; Carril 1: MPM (pUC19/HpaII); carriles 2-10: 200 copias DNA de *M.tb*. (B): serie tratada con sílice; Carriles 1-10: 200 copias DNA de *M.tb*

El resultado mostró que se requería de sucesivas extracciones con fenol-cloroformo para poder obtener el DNA de *M.tb* libre de inhibidores, porque sólo se amplificaron 3 muestras tratadas con fenol (fig. 6.3.2.2A), mientras que las 10 muestras tratadas con sílice, todas fueron amplificadas (fig. 6.3.2.2B)

6.3.3 Combinación de tratamientos.

Con respecto a la lisis de la micobacteria y la obtención de su DNA, se pretendió probar si la purificación con sílice mostraba un resultado equivalente al proporcionado por la incubación de la muestra a 95°C. Para esto, se hicieron dos series de diluciones de una suspensión de cepa pura de *M.tb*, y se colocó una serie a calentamiento (45 min a 95°C) y a la otra se le hizo tratamiento con sílice (ver material y métodos). El resultado fue una mayor intensidad de las bandas con el calentamiento, mientras que con la purificación con sílice ese resultado no fue favorable (fig. 6.3.3A). Debido a que el empleo del tratamiento con sílice era nuestro principal objetivo, porque favorece la eliminación de inhibidores para PCR, se decidió acoplar los tratamientos, es decir, calentamiento inicial y posterior purificación con sílice. El resultado final fueron unas bandas de mayor intensidad que las de las muestras tratadas solo con sílice (fig. 6.3.3B). En base a esto se decidió combinar los dos métodos para favorecer la sensibilidad de la determinación por PCR.

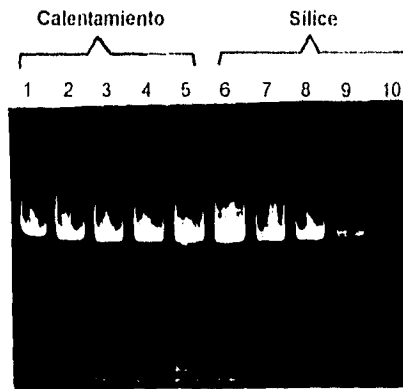


Figura 6.3.3A Comparación de calentamiento versus purificación con sílice. Se comparó la amplificación de dos series de diluciones de DNA de *M.tb*, por electroforesis en gel de poliacrilamida. Una serie se colocó a calentamiento por 45 min a 95°C (carriles 1-5) y la otra se trató con sílice (carriles 6-10), antes de realizar la amplificación. Carriles 1 y 6: 10^5 copias/ μ l; carriles 2 y 7: 10^4 copias/ μ l; carriles 3 y 8: 10^3 copias/ μ l; carriles 4 y 9: 10^2 copias/ μ l; carriles 5 y 10: 10^1 copias/ μ l.

6.4 Comparación del método de PCR y del cultivo.

Se analizaron 105 pacientes cuyas muestras fueron: orinas 12.3 %, expectoraciones 79 % y diversos líquidos corporales 8.7 %. A las muestras se les hizo

ZN, cultivo, PCR y detección por hibridación en formato "dot-blot" para *M.tb* mostrándose los resultados de PCR, ZN y cultivo en la tabla 6.4.1. Los resultados de PCR no fueron comparados de forma inmediata con los de ZN y cultivo sino hasta 8 semanas después de que habrían sido sembradas las muestras en el medio de cultivo tiempo estimado para el crecimiento de la micobacteria

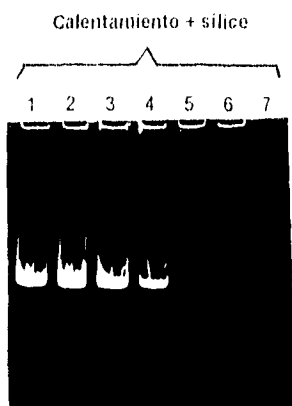


Figura 6.3.3B Tratamiento con calentamiento + sílice en TCG. Se analizó la amplificación de muestras de DNA de *M.tb*, por electroforesis en gel de poliacrilamida, después de acoplar dos métodos de obtención de DNA. Previo a la amplificación, las muestras se colocaron a 95°C por 45 min para luego tratarlas con sílice. Carril 1: 10^4 copias/ μ l; carril 2: 10^3 copias/ μ l; carril 3: 10^2 copias/ μ l; carril 4: 10^1 copias/ μ l; carril 5: 10^0 copias/ μ l; carril 6: 10^0 copias/ μ l; carril 7: C.N.

Tabla 6.4.1. Resultados de PCR, ZN y cultivo de muestras clínicas

		Cultivo				Totales
		positivo		negativo		
PCR	ZN	positivo	negativo	positivo	negativo	
		positivo	45	1	3	0
	negativo	1	0	12	43	56
Totales		46	1	15	43	105

Tabla 6.4.2. Resultados discrepantes de PCR y cultivo

No.Reg.Pac.	ZN	CULTIVO	PCR	DATOS CLINICOS
18	+	-	+	RX de torax (+)
44	+	-	+	Antec. fams. deterioro Edo salud
45	+	-	+	Antec. fams., RX torax (+)
55	+	+	-	RX torax (+), lisis un año de evolución

De las muestras investigadas 101 fueron concordantes en sus resultados para PCR y cultivo, presentándose 46 positivas y 55 negativas, mientras que 4 muestras dieron

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

resultados discrepantes, ya que 3 presentaron positividad por el método de PCR y cultivo negativo, y un paciente presentó PCR negativo y cultivo positivo lo cual nos dio un resultado de 97.9 % de sensibilidad y 94.8 % de especificidad. De las muestras positivas para cultivo y PCR, 45 muestras fueron positivas y 1 fue negativa para ZN. Con respecto a las muestras negativas para cultivo y PCR, 43 fueron negativas y 12 positivas para ZN. De estas últimas muestras, el reporte de lo observado al microscopio para todas fue bacilos muy escasos.

De las 4 muestras con resultados discrepantes entre el método de PCR y de cultivo, como se observa en la tabla 6.4.2 se decidió hacer una revisión de la historia clínica de los pacientes, en la búsqueda de datos adicionales que nos permitieran la confirmación del padecimiento. Se encontró que uno había iniciado el tratamiento antifímico en el momento del muestreo, debido al resultado de múltiples granulomas residuales e imágenes sugestivas de cavidad tuberculosa en la radiografía de tórax. Los otros dos pacientes correspondían a un programa epidemiológico de seguimiento por antecedentes familiares de tuberculosis, y por ésta razón habían recibido el tratamiento antifímico en base a sintomatología clínica. Los resultados de ZN anteriores a este estudio reportaban de 2+ a 3+ de bacilos por campo; mientras que los correspondientes a este estudio era bacilos muy escasos. Del cuarto paciente se modificó el resultado del PCR al realizar una posterior amplificación de la muestra, previa dilución de ésta, lo cual nos arrojó un resultado positivo que correspondía al del cultivo. En los otros tres pacientes también se repitió la amplificación pero no hubo modificación del resultado. En base a estos datos adicionales la sensibilidad fue corregida al 100 %.

7. Discusión

El PCR se ha vuelto un método útil para el diagnóstico de tuberculosis, un padecimiento con un alto índice de mortalidad. Mediante nuestro estudio se estandarizó el método de obtención de DNA de micobacterias, para su amplificación y detección, con la finalidad de poder hacer un diagnóstico rápido y específico de *M.tb* en muestras clínicas. Se reconoce que varios factores pueden influir en el proceso de amplificación, tal es el caso de la concentración de $MgCl_2$, parámetros de ciclización, y en forma no menos importante el procedimiento de extracción del DNA (Forbes, 1993). Así que, una vez que las condiciones del PCR fueron probadas y optimizadas (fig. 6.1.1), se desarrolló un procedimiento usando partículas de sílice o diatomeas y una solución altamente salina, para la lisis de la micobacteria y obtención de su DNA a partir de una amplia variedad de muestras clínicas. De este procedimiento se reconoció la propiedad de fijación del DNA a partículas de sílice o diatomeas (fig. 6.3.1.1), en presencia de agentes desnaturizantes como TCG (Vogelstein, 1979; Marco, 1982); así también, su empleo como método de purificación de ácidos nucleicos en muestras clínicas (Boom, 1990).

Este procedimiento de purificación con partículas de sílice demostró un alto índice de fijación al DNA (100 $\mu g/30 \mu l$ de sílice al 50 %), que bien podría exceder las cantidades presentes en muestras escasas en células como orina, y por lo tanto, ser favorable a la sensibilidad del método de PCR (fig. 6.3.1.2). Para partículas de diatomeas este índice de fijación de DNA también fue alto (superior a 100 $\mu g/40 \mu l$ de diatomeas al 50 %), que también suele ser favorable para recuperación del DNA en muestras ricas en células (fig. 6.3.1.3).

Por otra parte, la purificación con sílice permitió eliminar la necesidad de un gran número de extracciones con fenol-cloroformo, método generalmente reportado para la obtención del DNA libre de inhibidores para el PCR en muestras clínicas (Brisson-Nöel, 1989; Hance, 1989), pero que en ocasiones puede llevar a la pérdida de un poco del material genético (figs. 6.3.2.2A y B). El problema de varias extracciones es muy común en muestras de orina, que contienen sustancias tóxicas y metabolitos de desecho del organismo, los cuales son potentes inhibidores en el proceso de amplificación del DNA. Las extracciones sucesivas con fenol-cloroformo se realizaron hasta que la amplificación del control interno se llevara a cabo, pero mediante purificación con sílice esa amplificación fue inmediata al primer tratamiento. El empleo de un control interno fue para asegurar que ningún inhibidor estaba presente en la muestra, y la posibilidad de un falso negativo también fue eliminada. El control interno contiene además del DNA extraído de la muestra, 200 copias/ μl de DNA de *M.tb* que deben ser amplificados al igual que el control positivo. Sin embargo, es necesario hacer notar que las partículas de sílice por sí mismas son potentes inhibidores del PCR, como lo pudimos constatar durante nuestro estudio, por lo que se debe asegurar que no se pipetearán cuando se realice la amplificación (figs. 6.3.2.1A y B).

Varios investigadores han reportado la inhibición del PCR por sustancias interferentes en las muestras clínicas, lo cual afectó la sensibilidad de su estudio (Victor, 1992; Forbes, 1993; Shawar, 1993). En el caso de Victor y cols., usando purificación con sucrosa fueron teóricamente capaces de eliminar esas sustancias, sin embargo 11 de 169 muestras requirieron aún de una segunda amplificación. Forbes y cols., emplearon calentamiento y por agitación adicionando perlas de vidrio (con menos de 106 µm de diámetro) extrajeron el DNA, pero su sensibilidad fue del 87.2 %. La sensibilidad más alta (100 %) obtenida en nuestro estudio, posiblemente se debió al método de purificación del DNA con sílice.

Además, este procedimiento de obtención del DNA fue combinado con el método de incubación a 95°C por 45 min; esto es porque por un lado, encontramos un mejor resultado en cuanto a la lisis de la micobacteria y obtención de su DNA con el calentamiento (figs. 6.3.3A y B), hecho que ya había sido reportado por Sritharan (1991) y Kocagöz (1993), solo que ellos emplearon 30 y 10 min respectivamente. Por otro lado, la incubación a 95°C no garantiza que los inhibidores para PCR han sido eliminados, mientras que, como ya se ha demostrado este método de purificación sí los elimina (figs. 6.3.2.2A y B). Por esta razón se procedió a incubar la muestra, para después realizar la purificación de ácidos nucleicos con sílice.

La sensibilidad de la amplificación y de la detección fue de 10 copias/µl de DNA de *M.tb* (fig. 6.2), favorecida por el empleo de la secuencia de inserción IS6110 contenida múltiples veces dentro del genoma de *M.tb* (Thierry, 1990). Para la detección, esta sensibilidad dependió también de la cantidad de sonda marcada empleada, la cual fue suficiente para confirmar la presencia del fragmento del elemento IS6110. Por esta razón es importante que cada vez que se realice la síntesis de sonda marcada, se determine la cantidad a adicionar a las membranas (fig. 6.1.2). Ocasionalmente, se observaron bandas diferentes al fragmento de 245 pb en el gel de poliacrilamida, sin embargo, no hibridaron con el fragmento marcado con digoxigenina, indicando que no había homología.

Para la detección de *M.tb*, el método de cultivo siempre ha sido considerado como "estándar de oro", ya que su especificidad se considera del 100 %. La sensibilidad sin embargo, no es satisfactoria, porque con frecuencia se reporta de menos del 90 % (Jonas, 1993; Noordhock, 1995). En nuestro estudio analizamos 105 muestras clínicas correspondientes a expectoración, orina, jugo gástrico, y algunos otros líquidos corporales; de pacientes pertenecientes a un programa epidemiológico de detección de tuberculosis, y otros que fueron remitidos para la búsqueda del bacilo, de lo cual obtuvimos una especificidad de 94.8 % y una sensibilidad corregida de 100 %. En este estudio tres pacientes mostraron discrepancias por un resultado de PCR positivo y de cultivo negativo (tabla 6.4.2), en donde esto pudo deberse a que el PCR detecta organismos no viables y/o poco viables. Esto lo pudimos constatar ya que uno de los pacientes había iniciado tratamiento durante el estudio y los otros dos eran pacientes ya tratados con antimicrobianos. No es posible pensar que este resultado se deba a una contaminación intra o pre-analítica (Noordhock y cols., 1994), ya que durante nuestro trabajo siempre manejamos un control negativo, desde la purificación del DNA, la

amplificación y la detección por "dot-blot", el cual se matuvo negativo durante todo el proceso

Por otra parte, en una sola muestra se presentó el problema de un resultado de PCR negativo y de cultivo positivo (tabla 6.4.2), pero posterior a una segunda amplificación los resultados concordaron, para lo cual, se procedió a diluir la muestra de DNA y a centrifugar por más tiempo, para asegurar que ningún inhibidor estaba presente en la muestra. Esto demostró la necesidad de eliminar absolutamente las partículas de sílice o algún inhibidor

Nuestro trabajo fue ideado debido al reporte de un estudio ciego de comparación de los resultados obtenidos para muestras estándar, preparadas por diversos laboratorios y con diferentes métodos de PCR, el cual demostró discrepancia en los resultados y valores de sensibilidad y especificidad bajos (Noordhoek, 1994). Recientemente, Vlaspolder y cols. (1995) reportaron una sensibilidad de 98.4 % y una especificidad de 98.9 %, que sin duda son de excelente valor diagnóstico. Estos autores emplearon el método de amplificación desarrollado por Gen-Probe, el cual presentó falsos negativos por contaminación con sangre para aspirado bronquial, inconveniente que también generó que los resultados de muestras de exudados pleurales literan inconsistentes. Es por eso que este sistema no es recomendado para muestras diferentes a expectoraciones. Siendo otro inconveniente, el hecho de que los reactivos una vez reconstituídos tienen una vida media de 2 semanas.

Otro reporte reciente es el de Schirm y cols. (1995), quienes hicieron una comparación de los métodos para diagnóstico de *M.tb*: de Amplicor, PCR casero, cultivo y ZN; considerando los datos clínicos de cada paciente como evidencia de tuberculosis. En base a esto, las sensibilidades obtenidas para los métodos fueron 70.4, 92.6, 88.9 y 52.4 %, respectivamente. La especificidad de los 4 métodos fue de 98 %. La discrepancia de la sensibilidad entre el método de PCR casero y el de Amplicor fue la carencia en este último de un buen procedimiento de extracción del DNA, para eliminar los inhibidores; aunque un valor similar de sensibilidad fue reportado por el estudio hecho por D'Amato (1995). Con esto, observamos la importancia de tener un buen método de purificación del DNA, en el cual se pueda uno apoyar para favorecer un resultado más sensible y confiable para nuestra detección.

Además, el tiempo necesario para obtener un resultado por el método de cultivo no tiene comparación con el de PCR; ya que por cultivo un crecimiento del bacilo se obtiene en 4 a 6 semanas, que será tipificado para la confirmación de *M.tb* en otras 6 semanas. Por el método de PCR el resultado se puede obtener en 48 h, que corresponde al tiempo en que se realiza la amplificación del DNA para después someter al producto obtenido a un procedimiento de hibridación con sonda específica, que nos permitirá confirmar la presencia de *M.tb*.

8. Conclusiones

El método de purificación empleando partículas de sílice o diatomeas, en presencia de TCG, manifestó como características

- a) La fijación de ácidos nucleicos (DNA de *M.tb*) sin pérdida apreciable de estos, durante el desarrollo del método
- b) La capacidad de fijación de ácidos nucleicos, de las partículas de sílice o diatomeas, excedió las cantidades presentes en muestras escasas o ricas en células, respectivamente
- c) La eliminación de inhibidores para PCR de muestras clínicas, sin necesidad de realizarla repetidas veces
- d) La combinación del método de incubación a 95°C con el de purificación con partículas de sílice o diatomeas para la obtención de ácidos nucleicos (DNA de *M.tb*).

En base a los resultados de valor diagnóstico de nuestro estudio clínico se demostró que el PCR es un método altamente sensible y específico (100 y 94.8 %, respectivamente), además de ser rápido, para la identificación de *M.tb*, en muestras clínicas.

9. Bibliografia

- 1 - Bass JB, Farer LS, Hopewell PC, Jacobs RF, Snider DE. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* (1990) 142:725-735.
- 2 - Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, Noordaa Jvaander. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* (1990) 28:495-503.
- 3 - Brisson-Noël A, Lecossier D, Nassif X, Gicquel B, Lévy-Frebault V, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* (1989) ii 1069-1072.
- 4 - Brisson-Noël A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, Bonette R, Pifaloux G, Gicquel B, Garrigue G. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* (1991) 338:364-366.
- 5 - Buck GE, O'Hara LC, Summersgill JT. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* (1992) 30:1331-1334.
- 6 - Clarridge JEH, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* (1993) 31:2049-2056.
- 7 - D'Amato RF, Wallman AA, Hochstein LH, Colaninno PM, Scardamaglia M, Ardila E, Ghouri M, Kim K, Patel RC, Miller A. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* (1995) 33:1832-1834.
- 8 - Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* (1987) 135:1137-1151.
- 9 - de Wit D, Steyn L, Shoemaker S, Sogin M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* (1990) 28:2437-2441.
- 10 - Eisenach KD, Sifflord MK, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* (1991) 144:1160-1163.
- 11 - Forbes BA, Hicks KES. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* (1993) 31:1688-1694.
- 12 - Hance AJ, Grandchamp B, Lévy-Frebault VV, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, Gicquel B. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol* (1989) 3:843-849.
- 13 - Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, Schuitema AR, McAdam RA, Catty D, van Embden JD. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* (1990) 28:2051-2058.

- 14.- Hobby GL, Holman AP, Iseman MD, Jones JM. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* (1973) 4:94-104.
- 15.- Hoffner SE. Pulmonary infections caused by less frequently encountered slow-growing environmental mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (1994) 13: 937-941.
- 16.- Jonas V, Alden MJ, Curry JJ, Kamisango K, Knott CA, Lankford R, Wolfe JM, Moore DF. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* (1993) 31: 2410-2416.
- 17.- Kocagoz T, Yilmaz E, Ozkara S, Kocagoz S, Hayran M, Sachedeva M, Chambers HF. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *J Clin Microbiol* (1993) 31: 1435-1438.
- 18.- Kolk AHJ, Schuitena ARJ, Kuijper S, van Leeuwen J, Hermans PWM, van Embden JDA, Hartskeerl RA. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J Clin Microbiol* (1992) 30: 2567-2575.
- 19.- Kotloff RM. Infection caused by nontuberculous mycobacteria: clinical aspects. *Semin Roentgenol* (1993) 28: 131-138.
- 20.- Kox LFF, Rienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, van Heusden S, Kuijper, Kolk AHJ. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* (1994) 32:672-678.
- 21.- Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxyde for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* (1963) 87:775-779.
- 22.- Larsson L, Odham G. Diagnosis of mycobacterial infections using gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. In M Casal (ed), *Mycobacteria of clinical interest*. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam. (1986) p.42-50.
- 23.- Larsson L, Odham G, Westerdahl G, Olsson B. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by selected ion monitoring: improved analysis of tuberculostearate in sputum using negative ion mass spectrometry. *J Clin Microbiol* (1987) 25: 893-896.
- 24.- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) p.194-197.
- 25.- Marko MA, Chipperfield R, Birnboim. A procedure for the large scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal Biochem* (1982) 121: 382-387.
- 26.- McAdam RA, Hermans PWM, van Soolingen D, Zainuddin ZF, Catty D, van Embden JDA, Dale JW. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol* (1990) 4: 1607-1613.
- 27.- Nolte FS, Metchock B, McGowan JE, Edwards A, Okwumabua O, Thurmond C, Mitchell PS. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* (1993) 31: 1777-1782.

- 28.-Noordhoek GT, Kolk AHT, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PEM, Godfrey-Faussett P, Cho S-N, Shinnick T, Svenson SB, Wilson S, van Embden J. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* (1994) 32:277-284.
- 29.-Noordhoek GT, Kaan JA, Mulder S, Wilke U, Kolk AHT. Application of the polymerase chain reaction in a routine microbiology laboratory for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Pathol* (1995) 48:810-814.
- 30.-Otal I, Martin C, Lévy-Frébault V, Thierry D, Gicquel B. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol* (1991) 29:1252-1254.
- 31.-Peterson EM, Lu R, Floyd C, Nakasone A, Friedly G, de la Maza UM. Direct identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary cultures in BACTEC media using DNA probes. *J Clin Microbiol* (1989) 27:1543-1547.
- 32.-Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (1988) 239:487-491.
- 33.-Schirm J, Oostendorp LAB, Mulder JG. Comparison of AmpliCor, in house PCR, and conventional culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol* (1995) 33:3221-3224.
- 34.-Shawar RM, El-Zaatari FAK, Nataraj A, Clarridge JE. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods. *J Clin Microbiol* (1993) 31:61-65.
- 35.-Sriharan V, Barker RH. A simple method for diagnosing *M.tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. *Mol Cell Probes* (1991) 5:385-395.
- 36.-Timmerman KP, Tu CPD. Complete sequence of IS3. *Nucleic Acids Res* (1985) 13:2127-2139.
- 37.-Thierry D, Brisson-Noël A, Lévy-Frébault V, Nguyen S, Gutesdon J-L, Gicquel B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence IS6110 and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* (1990) 28:2668-2673.
- 38.-Torres JL. Panorama de la tuberculosis. *Epidemiologia, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica* (1995) 12 (11), sem 36.
- 39.-Victor T, du Toit R, van Helden PD. Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* (1992) 30:1514-1517.
- 40.-Vlaspolter F, Singer P, Roggeveen C. Diagnostic value of an amplification method (Gen Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* (1995) 33:2699-2703.
- 41.-Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979) 76:615-619.
- 42.-Yang RCA, Lis J, Wu B. Elution of DNA from agarose gels after electrophoresis. *Methods Enzymol* (1979) 65:176-182.
- 43.-Yeager H, Lacy J, Smith LR, LeMaistre CA. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Am Rev Respir Dis* (1967) 95:998-1009.