



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

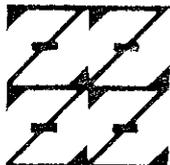
20
209

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DIAGNOSTICO MOLECULAR DE
TUBERCULOSIS MININGEA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ENRIQUEZ GONZALEZ ALEJANDRA LUCIA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR: DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO.
ASESOR: M EN C MA. DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE DE 1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

207220



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.

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

DIAGNOSTICO MOLECULAR DE TUBERCULOSIS MENINGEA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

ENRIQUEZ GONZALEZ ALEJANDRA LUCIA

DIRECTOR: Dr Armando Isibasi Araujo

ASESOR. M en C. Ma. del Carmen Maldonado Bernal

México, D.F

1998

DEDICADA A

DIOS POR PERMITIRME EXISTIR

CON AMOR , RESPETO Y ADMIRACION A MI PADRE

ASCENCION LUIS ENRIQUEZ DELGADO,

POR SU MAYOR HERENCIA QUE PUDO HABERME DEJADO EN ESTA VIDA,

MI PROFESION.

CON AMOR, A ESE SER MA DE JESUS G. J

DONDE QUIERA QUE SE ENCUENTRE,

PORQUE SIEMPRE ESTARA EN MI CORAZON

CON CARÍÑO, RESPETO Y AGRADECIMIENTO A

ESA PAREJA DE TIOS TAN LINDA:

GABRIEL GUTIERREZ Y CARMEN ENRIQUEZ

POR SU APOYO INCONDICIONAL DE TODA LA VIDA.

CON AGRADECIMIENTO A MI ABUELITA

MA. DE LOS ANGELES, POR SU AYUDA A LO LARGO DE TODA MI VIDA

CON PROFUNDO AMOR A ESA PERSONA TAN ESPECIAL

COMO LA VIDA MISMA

ING. GERARDO PLIEGO DUARTE,

POR ESE IDEAL DE SUPERACION, DIA CON DIA

A LA M.en C. MA. DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

POR SU TIEMPO Y POR TODAS Y CADA UNA DE SUS ENSEÑANZAS.

CON AFECTO Y RESPETO AL DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO
POR ESE APOYO INCONDICIONAL.

CON PROFUNDO AGRADECIMIENTO A TODOS Y CADA UNO
DE LOS PROFESORES DE LA CARRERA DE Q.F.B IMPARTIDA EN LA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA CAMPUS II U.N A.M.

CON CARIÑO A LA Q.F.B CAROLINA PIÑA VAZQUEZ , A LA
Q.F B GRISELDA RODRIGUEZ PEREZ Y A LA Q F.B. Ma. ISABEL
RIVERA FLORES POR SU APOYO Y AMISTAD A LO LARGO DE
NUESTRA ESTANCIA EN LA FES ZARAGOZA.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Armando Isibasi Araujo y la M. en C. Ma del Carmen Maldonado Bernal.

CONTENIDO

I.	RESUMEN...	8-9
II	INTRODUCCION	
II 1	¿Qué es la tuberculosis?...	10
II.2	Agentes causales de la tuberculosis.	10-11
II 3	Patogenicidad...	11-12
II 4	Historia de la tuberculosis.....	13-14
II 5	Problema actual de la tuberculosis	14-17
II 6	Tuberculosis Meningea (TBM).....	18-20
II.7	Diagnóstico de la tuberculosis	20-22
III	FUNDAMENTACION DEL TEMA	
III 1	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23-24
III 2	Etapas de la PCR.....	25-26
III 3	Curva experimental de la PCR.	26
III 4	Fases durante la amplificación	27-30
III.5	Control enzimático de la contaminación en PCR.	31-32
III 6	PCR anidada.....	32
III 7	Detección y análisis de los productos de PCR y PCR anidada	33-34
IV	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35-36
V	OBJETIVOS.	37
VI.	HIPOTESIS.	37
VII	POBLACION	38
VIII	CRITERIOS DE INCLUSION, EXCLUSION Y ELIMINACION	38
IX.	TIPO DE ESTUDIO.	38
X.	VARIABLES.....	39
XI	MATERIAL	39-40
XI 1	Reactivos y soluciones para el aislamiento del ADN.....	40
XI 2	Reactivos para PCR múltiple.....	40-41
XI.3	Reactivos para PCR anidada	41
XI 4	Soluciones para electroforesis.	41

XI 5	Equipo	42
XII.	METODOS	43
XII 1	Aislamiento del ADN	43-45
XII 2	Cuantificación del ADN.....	45
XII 3	PCR múltiple	45-46
XII 4	PCR anidada	46-47
XII 5	Electroforesis en gel de agarosa.	47-48
XII.6	Observación de geles de agarosa en un analizador de imágenes	48
XII.7	Cultivo en medio de Lowestein-Jensen.....	48-51
XII.8	Tinción de Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR) ..	51-54
XII.9	Oligonucleótidos iniciadores utilizados en el proyecto	55
XII.10	Genes amplificados en PCR y PCR anidada.....	56
XII 11	Perfil térmico en PCR múltiple	56
XII 12	Perfil térmico en PCR anidada	57
XIII	RESULTADOS	
XIII 1	Aislamiento y cuantificación del ADN	58
XIII.2	Datos clínicos y resultados de PCR múltiple y PCR anidada de los 48 pacientes con probable TBM.	58-62
XIII.3	Cultivo de muestras de LCR	63-64
XIII.4	BAAR de muestras de LCR	64
XIII 5	Geles de PCR múltiple y PCR anidada de los 48 pacientes ..	65-89
XIII 6	Gel del sistema PCR múltiple	90
XIII.7	Sensibilidad en PCR múltiple.....	91, 93
XIII.8	Sensibilidad en PCR anidada	92-93
XIII.9	Especificidad en PCR múltiple y PCR anidada.	94- 96
XIV	DISCUSION DE RESULTADOS	97-99
XV	CONCLUSIONES	100
XVI	PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	101-102
XVII	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	103-111

I. RESUMEN

La tuberculosis en humano es causada por *Mycobacterium tuberculosis* en la mayoría de los casos y actualmente el cuadro epidemiológico no es halagador debido a la aparición y diseminación de cepas drogoresistentes y al aumento de los casos del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El problema reviste una magnitud aún mayor en los países en desarrollo, en donde a los problemas inherentes al padecimiento se suma la carencia de recursos humanos y económicos para controlarlo (1,2).

Se conocen diferentes métodos tradicionales para el diagnóstico de la tuberculosis, que se basan en el estudio de la bacteria y su metabolismo, entre ellos están métodos bacteriológicos en los que se detecta por microscopía a los bacilos ácido-alcohol resistentes, así como el cultivo de la bacteria. La desventaja de estos métodos es que no permiten diferenciar entre especies y además requieren de una gran carga bacilar en las muestras para detectarse y sobre todo que para el cultivo tienen que pasar por lo menos 15 días para dar un resultado positivo y de 6 a 8 semanas para dar un resultado negativo (2-20)

Es por ello que se optó por utilizar un sistema de Biología Molecular para ayudar en el diagnóstico de la tuberculosis meníngea, que consta de un método de PCR múltiple y una prueba de PCR anidada. El método de PCR múltiple permite amplificar tres fragmentos de ADN genómico de manera simultánea, utilizando tres diferentes pares de oligonucleótidos iniciadores, que identifican al género *Mycobacterium*, a las micobacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y específicamente a *Mycobacterium tuberculosis*. Por otra parte la prueba de PCR anidada permite amplificar una región interna de *Mycobacterium tuberculosis* especie-específica que previamente fue amplificada por PCR múltiple.

Se analizaron 48 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes independientes, que tenían signos clínicos que orientaba hacia tuberculosis meningea. De las 48 muestras de LCR analizadas por PCR múltiple, se obtuvieron resultados negativos e indeterminados, en contraste con la prueba de PCR anidada que se obtuvieron 23 resultados positivos y 25 negativos. De las 48 muestras de LCR, se cultivaron 30 en medio de Lowestein-Jensen y se hizo tinción de Zielh-Neelsen en aquellos casos en que hubo crecimiento, ello con la finalidad de comparar la sensibilidad de las diferentes metodologías.

Para determinar la especificidad de los métodos de Biología Molecular, se analizaron 10 muestras clínicas de LCR de pacientes independientes con diagnóstico ya confirmado de otra etiología diferente a tuberculosis meningea mediante PCR múltiple y PCR anidada, obteniendo resultados negativos para los 10 casos.

Para determinar la cantidad mínima de ADN micobacteriano requerido para lograr amplificación en las pruebas PCR múltiple y PCR anidada, se realizó el ensayo de sensibilidad, obteniendo una sensibilidad mayor para ésta última. (100 pg de ADN para PCR múltiple y 10 fg para la PCR anidada)

II. INTRODUCCION

II.1 ¿Qué es la tuberculosis?

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa generalizada, que a menudo dura toda la vida, producida por *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch), que se localiza principalmente en los pulmones, se identifica principalmente por la presencia de tubérculos y necrosis caseosa. La tuberculosis es capaz de afectar cualquier órgano de la economía en forma progresiva y crónica, por lo que su cuadro clínico está en relación con el órgano o sistema que ataque. La más frecuente es la forma pulmonar que en la mayoría de las veces provoca un cuadro crónico caracterizado por tos, expectoración, fiebre y ataque al estado general (1,2,21,22)

II.2 AGENTES CAUSALES

La tuberculosis generalmente es causada por *M. tuberculosis* y en raros casos por *M. bovis* que pertenecen al orden actinomicetales, familia Mycobacteriaceae

Son bacilos delgados, aerobios, no esporulados, no capsulados e inmóviles que se tiñen con facilidad con la técnica de Ziehl-Neelsen (fucsina fenicada con calor) y cuya decoloración no es fácil, aún con alcohol acidificado (ácido-alcohol resistencia). Esta última es su principal característica y se debe a la composición de su pared celular, rica en lípidos de alto peso molecular (21).

El género *Mycobacterium* incluye organismos parásitos, saprófitos y formas intermedias. La mayoría de las especies pueden cultivarse *in vitro* en tanto que unas pocas son de difícil o nulo desarrollo como *M. paratuberculosis* o *M. leprae*. Los microorganismos del

género son de crecimiento muy lento, comparados con otras bacterias porque los tiempos de división celular son largos y muy variables (desde 2 a 3 horas para *M. phlei* hasta 14 días para *M. leprae*) y pueden pasar varias semanas para que sus colonias puedan ser visibles (21)

M. tuberculosis tiene la capacidad de producir niacina y carece parcial o totalmente de actividad de catalasa a 68°C.

Las micobacterias son procariotes cuya pared celular está compuesta esencialmente por dos tipos de polímeros, el arabino galactano micolato y el péptidoglicano. Aproximadamente del 20 al 40% del peso seco de las micobacterias son lípidos de la pared celular. Los ácidos micólicos (ácidos grasos ramificados hidroxilados) existen también en bacterias como *Nocardia* y *Corynebacterium*. El llamado factor cordón o de acordonamiento, identificado en la mayoría de las micobacterias, es el 6,6-dimicolato de trehalosa y funciona como tóxico, por lo que tiene que ver con la virulencia de las cepas. Por este factor algunas cepas de *M. tuberculosis* crecen como cuerdas o trenzas en algunos medios (21).

II.3 PATOGENICIDAD

Actualmente se considera a *M. tuberculosis* como un complejo que además incluye a las especies *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*, que es agente causal de la tuberculosis. Además de *M. leprae*, agente etiológico de la lepra, se han descubierto otras especies de micobacterias que también pueden ser patógenas para el hombre. Se sabe que estas micobacterias atípicas o no tuberculosas tienen una morfología similar a la del bacilo de

la tuberculosis y son bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), pero difieren básicamente de su actividad catalásica (21).

En la actualidad se conocen más de 50 especies micobacterianas atípicas para lo cual en 1959 Runyon sugirió una clasificación en cuatro grupos basada en la velocidad de su desarrollo y pigmentación (Cuadro1) Dentro de estos cuatro grupos no se incluyen las especies típicas y las no cultivables: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. microti* y *M. paratuberculosis* (21).

Micobacterias atípicas

GRUPO	NOMBRE	DESCRIPCION Y EJEMPLOS
I	Fotocromógenas	Crecimiento lento, colonias no pigmentadas en la oscuridad. Los cultivos jóvenes adquieren un color amarillo al exponerse a la luz. (<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i>)
II	Estocromógenas	Crecimiento lento Colonias pigmentadas amarillentas o anaranjadas aunque sean cultivadas en la oscuridad. (<i>M. gordonae</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. thermoresistible</i>)
III	No cromógenas	Crecimiento lento. Colonias generalmente nada o poco pigmentadas.(Complejo <i>M. avium</i> , <i>M. ulcerans</i>)
IV	De crecimiento rápido	Desarrollan colonias en medios de cultivo en 7 días o menos Pueden o no ser cromogénicas (<i>M. smegmatis</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. phlei</i>)

Cuadro 1

II.4 HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis emergió de las tierras de Asia meridional en tiempos remotos. Los mamíferos primitivos sucumbieron ante ella y ha acompañado al hombre a través de la historia. Elliot Smith descubrió una momia que data de hace 3 mil años con signos de tuberculosis vertebral. En los papiros de los egipcios existen descripciones de este padecimiento. Los asirios y babilonios de los siglos VI y V a.C. veían en ella la ira de Dios. Fue Hipócrates (460-379 a.C.) quien le dio el nombre de tisis a éste padecimiento que según decía se debía “a hemorragia de los pulmones”. El sigilo de la enfermedad “de paso lento y solemne” según la pluma de Dickens, hizo pensar a Hipócrates que era hereditaria. Sin embargo desde tiempos de la Grecia antigua se habló del contagio de la tisis. Ya en el 116 a.C. Varro sospechó de la existencia de organismos invisibles, pero fue Galeno, quien escribió acerca de su naturaleza contagiosa y recomendó el aislamiento de los enfermos y su estancia al aire libre (22)

La tuberculosis fue uno de los principales temas de estudio de los médicos en el siglo pasado. En particular ocupó la atención de patólogos y clínicos. Debido a la diversa posibilidad de localización de la enfermedad: en pulmones, huesos, riñones, sistema nervioso, entre otras, se decía que el tisiólogo tenía que ser muy buen clínico para reconocer la enfermedad en tan variadas formas. El nombre del tisiólogo al especialista en tuberculosis, provenía del nombre dado a una fase terminal de la enfermedad, la tisis o consunción, periodo de gran decaimiento orgánico, entonces con frecuencia fase final de la infección tuberculosa (22)

Los médicos griegos de la antigüedad usaban el término *phthisis* para indicar su carácter consuntivo. Sin embargo esta enfermedad no constituyó un problema importante hasta que las condiciones de hacinamiento de la vida urbana de las primeras épocas de la revolución industrial crearon las circunstancias epidemiológicas favorables para su diseminación. En el siglo XVII y XVIII la tuberculosis fue la causa de muerte de la cuarta parte de los adultos en Europa. Las características clínicas de la tisis ya eran bien conocidas en ese entonces, pero no existía conciencia acerca de su etiología. En el sur de Europa se consideraba que era contagiosa y en el norte, la aparición en grupos familiares llevó a considerarla una predisposición familiar. Virchow pensaba que era una neoplasia (22)

Los conceptos modernos acerca de la tuberculosis fueron desarrollados en la segunda mitad del siglo XIX como resultado de tres logros médicos sobresalientes. Los estudios de autopsias convencieron a Laennec de que las diversas formas de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, hasta entonces consideradas no relacionadas, formaban parte de la misma enfermedad. En 1865, Françoise Villemain demostró que la tuberculosis podía ser transmitida por inoculación de tejidos enfermos a cobayos. Sin embargo, el acontecimiento más importante fue el hallazgo del bacilo tuberculoso y la demostración de su patogenicidad, realizados por Koch en 1882 (22)

II.5 PROBLEMA ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis, una de las enfermedades implacables que ha enfrentado el hombre a través de su historia, constituye nuevamente un reto para la ciencia médica. Durante años

se trató afanosamente de retirar el velo de la misteriosa consunción, pero fue hace 116 años cuando se dio un paso gigante en este conocimiento. Roberto Koch anunció con el descubrimiento del *Mycobacterium tuberculosis*, la posibilidad de erradicarlo del planeta. Este sueño se hizo realidad en 1924 con el desarrollo de la vacuna contra el bacilo por Calmette y Guérin (BCG) y aún más con el descubrimiento de la estreptomycin. Con este hallazgo, Waksman introdujo en los cuarenta el primero de una serie de compuestos que conformarían una efectiva terapia farmacológica (22)

Todo lo anterior constituía una base sólida para pensar que pronto se escribiría el capítulo final de la historia de la tuberculosis. La tendencia de los datos epidemiológicos de mediados de este siglo confirmaban esa creencia. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a los fármacos y la epidemia de Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), convirtió a la tuberculosis en una de las principales enfermedades oportunistas asociadas a este síndrome, revirtiendo la virtual erradicación. El resurgimiento de la tuberculosis a nivel mundial, a partir de la década de los ochenta, agregó un nuevo matiz al concepto de transición epidemiológica, sugirió que ésta debe ser como una enfermedad infecciosa emergente (22)

Desde 1993, la OMS declaró a la tuberculosis como una emergencia global, captando nuevamente la atención de diversos especialistas. En México se están realizando esfuerzos por conocer la epidemiología de esta enfermedad y se trata de identificar el flujo y la diversidad de micobacterias en algunas zonas de nuestro país con base en las modernas técnicas de Biología Molecular. También existen importantes contribuciones para el desarrollo de una vacuna molecular, que permita superar el nivel de protección que actualmente brinda la BCG (22)

Según estimaciones de la OMS, en el mundo anualmente aparecen más de 8 millones de nuevos casos de tuberculosis y aproximadamente unos 3 millones mueren por esta enfermedad. En México la tuberculosis ocupa el lugar número 15 como causa de mortalidad (21).

La tuberculosis fue una de las primeras enfermedades en las que se estableció una relación causal precisa con el agente productor. El descubrimiento del bacilo tuberculoso por Roberto Koch dio motivo a muy interesantes estudios acerca de la patogenia de la enfermedad. Patólogos y clínicos discutieron en largas sesiones acerca de las formas como se infectaban los seres humanos (22).

Existieron desde entonces claramente diferenciadas tres formas de enfermedad: la primoinfección, la diseminación hematológica y la reinfección.

La primoinfección, es decir, la primera ocasión en que el bacilo tuberculoso se pone en contacto con tejidos de un ser humano, por vía respiratoria o digestiva, es generalmente una lesión benigna. Ocasiona una pequeña lesión que no progresa y en el 99% de los casos cicatriza dejando una huella calcificada. Si ocurre por vía respiratoria es frecuente observar una pequeña lesión calcificada en la base del pulmón y en ganglios mediastinales. No sólo deja esta huella visible en radiografías, sino deja una huella inmunológica, el individuo queda inmunizado contra el bacilo tuberculoso y una nueva infección hace reaccionar distinto al tejido que la sufre ocasionando necrosis caseosa, un tipo de destrucción tisular peculiar de la lesión tuberculosa (22).

La diseminación hematológica es una forma de progresión de la enfermedad que se da cuando el organismo no tiene defensas para detener la infección. Sucede en personas mal

nutridas, parasitadas o con problemas inmunológicos. Esta forma de diseminación de la infección es la que explica las localizaciones en el sistema nervioso, riñones, huesos, o piel, puede presentar una forma invasiva con múltiples localizaciones, o descubrirse sólo por una lesión localizada.

Durante muchos años se discutió si la reinfección era exógena o endógena. Esta última forma de reinfección se explicaría por la reactivación de bacilos en una lesión cicatrizada de primoinfección, por disminución de los mecanismos de defensa de un organismo y fue defendida principalmente por los patólogos. Los clínicos, con Max Pinner a la cabeza de los fisiólogos, defendieron la teoría de la reinfección exógena, por contagio de un tuberculoso tosedor. En esto se basó la estrategia de las campañas antituberculosas, que consistían básicamente en separar a los tuberculosos tosedores para evitar que contagiaran a sujetos cercanos a ellos (22)

Sin embargo es posible que existan las dos formas y que sean dos formas de observar la enfermedad. En el estudio anatomopatológico hay evidencias de casos en que es muy clara la reinfección por vía endógena. Los clínicos y los epidemiólogos, por otra parte, han encontrado datos suficientes para explicarse la mayoría de los casos como reinfección exógena. Este último mecanismo ha sido el más aceptado por los especialistas en tuberculosis pulmonar en este siglo (22).

II.6 TUBERCULOSIS MENINGEA

Habitualmente, la meningitis tuberculosa se debe a la ruptura de un tubérculo subependimario en el espacio subaracnoideo, más que a la siembra hematógica directa de las propias meninges. Cuando la meningitis complica una forma miliar, generalmente aparece después de varias semanas de enfermedad. La meningitis en la infancia generalmente es un proceso posprimario temprano; tres cuartas partes de los pacientes presentan una enfermedad pulmonar asociada, ya sea tuberculosis miliar, una neumonía primaria reciente o derrame pleural. Tres cuartas partes de los adultos presentan manifestaciones de tuberculosis extrameningea, que en un número sustancial es de tipo extrapulmonar.

Aún se discute si el tubérculo subependimario evoluciona a partir de focos sembrados en una fase hematógica prealérgica no progresiva o si siempre se debe a la diseminación hematógica a partir de un área de tuberculosis crónica extrameningea, incluso totalmente latente desde el punto de vista clínico.

La afección meníngea es más marcada en la base del cerebro. En un caso de larga duración, el exudado puede ser espeso, gelatinoso y formar una masa, extendiéndose desde la protuberancia hasta los nervios ópticos y siendo más prominente en la zona adyacente al quiasma óptico. Cuanto más crónico es el proceso más se asemeja a una masa fibrosa que a menudo invade o rodea los nervios craneales adyacentes.

Puede afectar a las arterias llevando a isquemia o infarto localizado. La arteria cerebral es la afectada con mayor frecuencia, y esto provoca hemiparesia o hemiplejía. El infarto de las arterias pequeñas puede causar diversos síntomas similares a los de una encefalitis.

Las cisternas basilares y los forámenes ventriculares pueden estar obstruidos por el exudado inflamatorio o por la invasión de un tuberculoma creciente, determinando la aparición de hidrocefalia. Con menos frecuencia, estos mismos cambios patológicos pueden afectar la médula espinal con síntomas cerebrales tardíos o ausentes.

El espectro clínico es muy amplio y oscila desde una leve cefalea o alteración mental a lo largo de muchas semanas hasta una meningitis brusca y grave. Aproximadamente en tres cuartas partes de los casos se encontrarán signos de tuberculosis extrameningea activa o inactiva. Sin embargo es importante señalar que en 25% o más de los casos no existen evidencias clínicas o histológicas de tuberculosis activa o latente, en estos casos la fuente de diseminación hematogena que origina la meningitis con frecuencia es un foco latente en un ganglio linfático oculto, una lesión esquelética o genitourinaria. Puede sospecharse de una tuberculosis meningea cuando los signos menígeos están asociados con una tuberculosis extrameningea activa, pero la clave del diagnóstico es el examen de líquido cefalorraquídeo.

Habitualmente, la fiebre es de bajo grado, o no se presenta, en la mayoría de los casos el recuento de leucocitos periféricos es normal y la anemia es leve.

La clasificación clínica se basa sobre el estado neurológico; estadio 1, racional, sin signos neurológicos focales ni hidrocefalia, estadio 2, confusión o presencia de signos focales como parálisis o hemiparesia de nervios craneales; estadio 3, estupor o paraplejia densa o hemiplejia.

Los defectos neurológicos residuales que se observan en una cuarta parte de los pacientes después de la recuperación incluyen síndrome cerebral crónico, hemiparesia, paraplejia,

atrofia óptica con ceguera, parálisis oculomotora, sordera, trastornos convulsivos y diversos síntomas de disfunción hipotalámica o hipofisaria (23-30).

II.7 DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS EN EL LABORATORIO CLINICO

A pesar de que los métodos tradicionales de diagnóstico son bastante buenos, tienen la desventaja de ser muy lentos. En la mayoría de los casos la prueba de la tuberculina, conjuntamente con las radiografías de tórax, las tinciones de Zhiel-Neelsen, de uramina rodamina y el cultivo del microorganismo son suficientes para detectar la enfermedad, sin embargo se requiere de uno a dos meses para llegar al diagnóstico, efectuar las pruebas de sensibilidad y finalmente implantar el tratamiento. Una de las limitaciones de los métodos tradicionales es la sensibilidad ya que se requiere en la tinción de Zhiel-Neelsen que existan 10,000 bacilos/ml de muestra para lograr la observación de los mismos además de que el cultivo tarda hasta 8 semanas (21,22).

Se han desarrollado muchos métodos alternativos a fin de reducir el tiempo necesario para confirmar la tuberculosis, por ejemplo la cromatografía de gases y la espectrofotometría de masas (4,5), que se usan para detectar la presencia del ácido tuberculoesteárico o de los ácidos micólicos. La diferenciación entre especies también puede hacerse con anticuerpos monoclonales (6,7). A pesar de que estos métodos son útiles, requieren de equipo caro y con frecuencia no son lo suficientemente sensibles para usarse directamente sobre muestras clínicas sin previo cultivo del microorganismo.

También se desarrollaron algunos métodos radiométricos capaces de detectar el crecimiento de las micobacterias por la utilización de sustratos radioactivos. Dos

ejemplos son BACTEC 12B o 460TB (B-D Diagnostic Instruments System. USA) y Septi-Check AFB (Roche Diagnostic Systems. USA) (8,9) La bacteria puede identificarse presuntivamente al comparar la actividad metabólica que se presenta en un sistema de 2 viales inoculados con la muestra problema; uno de los viales contiene un inhibidor específico (NAP) del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. Con estos sistemas la confirmación puede darse en aproximadamente 3 días (10), aunque este tiempo dependerá, como en los métodos tradicionales, de la cantidad de bacilos presentes en la muestras.

Se han desarrollado métodos de hibridación de ADN y ARN con el objeto de reducir el tiempo para el diagnóstico de las infecciones micobacterianas y en algunos casos se ha logrado identificar *M.tuberculosis* y *M. avium* en aislamientos clínicos usando sondas para el cromosoma completo

En otros casos el uso de sondas de ADN ha permitido reconocer fragmentos de restricción polimórficos (RFLP) dentro del genoma de *M.tuberculosis* y, dado que ésta técnica puede identificar especies y aún subtipos de microorganismos, se ha propuesto que estas regiones RFLP puedan utilizarse como marcadores epidemiológicos para tuberculosis

Con el uso de sondas de ácidos nucleicos conjuntamente con sistemas de aislamiento y cultivo como BACTEC, se ha demostrado que es posible reducir el tiempo requerido para el diagnóstico de infecciones micobacterianas aún antes de contar con el cultivo primario (11).

Un avance importante en la tecnología de las sondas de ADN se logró con el desarrollo de métodos no radioactivos de marcado, lo que las hace más manejables para los laboratorios clínicos Las sondas marcadas con peroxidasa de rábano (SNAP, Syngene

San Diego CA) o las quimioluminiscencias (Accuprobe, Gen-Probe San Diego CA) son tan efectivas como las marcadas con ^{125}I . (12,13)

Sin embargo, debido al lento crecimiento de estos microorganismos, aun se requiere de mucho tiempo para lograr una biomasa suficiente que dé resultados satisfactorios al aplicar estas técnicas. Es por ello que en la actualidad se piensa que los métodos de amplificación de ADN representan los procedimientos de diagnóstico para tuberculosis que se emplearán en el futuro.

III. FUNDAMENTACION DEL TEMA

III.1 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

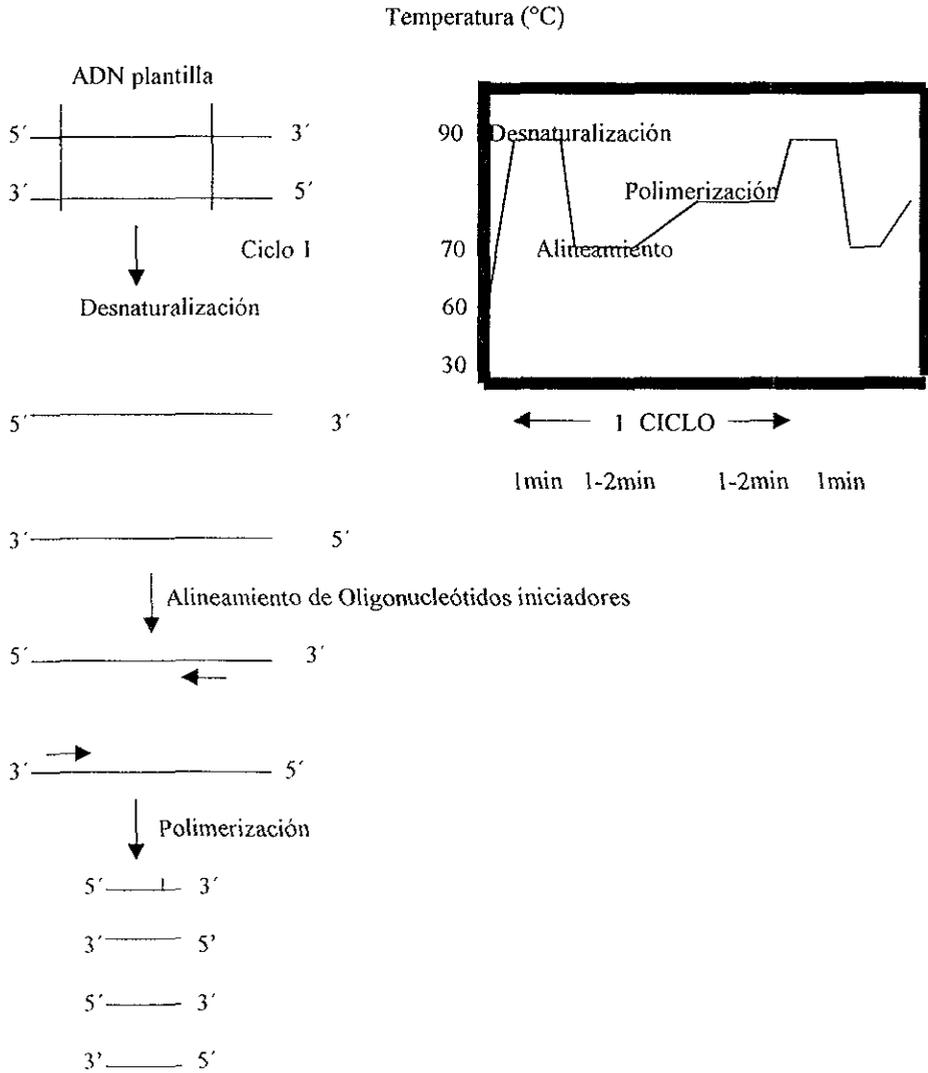
La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es un procedimiento rápido de amplificación enzimática, de un segmento específico de ácido desoxirribonucleico, llevado a cabo *in vitro*. El número de aplicaciones de la PCR es incontable y aún está creciendo. Dentro de ellas se incluyen clonación directa de ADN genómico o ADN copia (cADN), mutagénesis en Ingeniería de ADN *in vitro*, huellas genéticas de muestras forenses, ensayos para identificar agentes infecciosos (como lo es el caso de este proyecto), diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas, análisis de variaciones alélicas, análisis de ácido ribonucleico (ARN) transcrito, huellas genéticas. secuenciación nucleotídica directa de ADN y cADN genómico, así como para trabajar secuencias raras (31)

Las bases teóricas de la PCR son las siguientes.

Partir de tres segmentos de ácidos nucleicos: El segmento de DNA de doble cadena a ser amplificado y dos cadenas simples de DNA de longitud corta aproximadamente 20 a 30 pares de bases (pb) llamados oligonucleótidos iniciadores, que flanquean la región a amplificar. Además hay un componente proteico, una DNA polimerasa, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's) "adenina, citocina, guanina y timina", un amortiguador de pH y sales (31).

La PCR consiste de ciclos repetidos de:

- a) Desnaturalización
- b) Alineamiento
- c) Elongación (Polimerización o síntesis de ADN)



III.2 ETAPAS DE LA PCR

Primer etapa se lleva a cabo la desnaturalización o separación de la doble cadena del ADN plantilla, para obtener de esa manera cadenas simples, aplicando para ello una temperatura de 94°C (32)

Segunda etapa los oligonucleótidos iniciadores, dado que son específicos y complementarios a los extremos de la región de ADN que se desea amplificar, se alinean o hibridan a los extremos de cada cadena sencilla, flanqueando así la región de interés. La temperatura a aplicar en esta etapa depende de varios factores, entre ellos el número y la proporción de las diferentes bases nucleotídicas en los oligonucleótidos iniciadores y su longitud, cabe mencionar que son adicionados en exceso, comparados con el ADN a ser amplificado (32).

Tercer etapa: ya que los oligonucleótidos iniciadores se han alineado, la temperatura es llevada a 72°C, debido a que a esa temperatura actúa la Taq-polimerasa (enzima termoestable), la DNA polimerasa se ancla al complejo de doble cadena iniciador-ADN plantilla y entonces incorpora dNTPs libres del medio a las cadenas, polimerizándolas en sentido 5' → 3'. En esta primera ronda de síntesis se producen dos nuevas cadenas de ADN de longitud indeterminada, que del mismo modo como las cadenas originales pueden hibridarse con los oligonucleótidos iniciadores después de la desnaturalización y el alineamiento (31)

En el segundo ciclo de desnaturalización, alineamiento y polimerización, se sintetizan dos cadenas sencillas, productos que juntos componen una cadena discreta, la cual es exactamente igual a la longitud entre los extremos de los oligonucleótidos iniciadores, es

decir a la longitud del segmento de ADN flanqueado por las secuencias de los iniciadores. Cada cadena discreta es complementaria a uno de los dos oligonucleótidos iniciadores y por lo tanto pueden participar como plantilla en los ciclos subsecuentes. La cantidad de este producto con cada ciclo subsecuente de desnaturalización, alineamiento y polimerización es de tipo exponencial, así que n ciclos resultarán en una amplificación de 2^n veces del producto discreto (32).

II.3 CURVA EXPERIMENTAL DE LA PCR

La cantidad de producto de PCR está en función de la cantidad inicial de ADN y es descrito por la siguiente ecuación

$$N = N_0(1 + eff)^n$$

Donde N_0 es el número de copias del ADN inicial, N es la cantidad de ADN después de n ciclos de amplificación y eff es la eficiencia de la amplificación. El valor actual de la eficiencia depende de factores que pueden ser únicos para cada par de iniciadores y secuencias intermedias a ser amplificadas. Si la eficiencia fuera constante e igual a 1, la representación gráfica de la ecuación mostraría una relación lineal entre N y N_0 para cualquier valor de n . Pero como cualquier reacción enzimática, no puede esperarse que ésta relación sea lineal indefinidamente, ya que la eficiencia de la PCR varía a lo largo de los ciclos de amplificación, lo cual puede observarse en la cinética de reacción mostrada en la figura 2 donde se grafica el número de ciclos contra la cantidad de producto de PCR generado, mostrando que existen tres fases bien definidas durante la amplificación (32)

III.4 FASES DURANTE LA AMPLIFICACION

- FASE DE LOS PRIMEROS CICLOS

Se trata de una fase de monitoreo durante los primeros ciclos, el fragmento de ADN deseado es seleccionado por una unión específica con los iniciadores y la eficiencia se eleva desde cero hasta su valor máximo (33)

Tener finalmente un resultado exitoso requiere, primero, que los iniciadores usados se unan muy bien en los lugares deseados, pero pobremente en cualquier otro lugar del ADN plantilla sobre todo durante los primeros ciclos. La unión eficiente del iniciador a la secuencia deseada, depende del diseño de los iniciadores (secuencia y longitud) y de las condiciones de rigor de la reacción (especialmente la concentración del ión magnesio y de la temperatura de alineamiento). Cualquier alteración del iniciador con el ADN plantilla puede conducir a un producto de extensión cuya especificidad puede ser difícil de controlar durante los primeros ciclos. Dado el vasto exceso molar de los posibles sitios de alineamiento en el ADN plantilla con respecto al sitio deseado. Tales moléculas adicionales no deseadas producidas en un estado temprano del proceso pueden dar un resultado muy heterogeneo al final (33)

Se han desarrollado una variedad de técnicas para cambiar el balance dinámico hacia el producto deseado. Una de ellas es el inicio en caliente (Hot Start) de la PCR, que consiste en poner en contacto todos los elementos de la reacción a altas temperaturas, de modo que el alineamiento y extensión de secuencias erróneas o la formación de dímeros de iniciadores no ocurra bajo condiciones de baja rigurosidad durante la primera transición de baja temperatura (ambiente) hasta el primer paso de desnaturalización. Una variación

resiente consiste en adicionar una Taq polimerasa bloqueada químicamente lo cual evita que la polimerasa esté activa durante la primera transición de temperatura y es hasta que termina la primera etapa de desnaturalización, cuando el bloqueo se elimina y puede comenzar la extensión (33)

- FASE DE AMPLIFICACION EXPONENCIAL

Durante los ciclos subsecuentes, el número de copias del fragmento de ADN deseado se incrementa exponencialmente, la eficiencia es constante y la cantidad de ADN amplificado (N) a cualquier valor de n es directamente proporcional a la cantidad de ADN inicial (33)

Durante la mayoría de los ciclos de la etapa de amplificación de la PCR, los ADN plantillas son segmentos perfectamente demarcados, amplificados en ciclos anteriores. La complejidad del monitoreo es reducida efectivamente por el gran exceso del material recientemente amplificado que posee sitios perfectamente complementarios a ambos iniciadores (33)

Así, cualquier molécula presente será duplicada en número. Los únicos requerimientos para que la fase proceda son los siguientes:

- 1 Que haya una cantidad suficiente de moléculas de iniciadores y enzima.
- 2 Condiciones que permitan un alineamiento completo de los iniciadores, una extensión completa (por ejemplo, concentraciones adecuadas de nucleótidos libres) y una desnaturalización completa de las moléculas producidas antes del inicio del ciclo siguiente (33)

- LA FASE DE MESETA

Conforme los productos se acumulan, toda la enzima se ocupa y la razón iniciador-plantilla decrece, mientras que la razón plantilla-plantilla (amplificados de ciclos anteriores) aumenta, promoviéndose así el autolineamiento de las cadenas molde. Cuando el autoalineamiento se vuelve más significativo o la cantidad de la enzima se vuelve limitante, se pierde la relación lineal (33).

La fase de amplificación es finita para cualquier blanco. Los ciclos térmicos más allá de ésta fase desvían la amplificación en falsos blancos en baja concentración, un menor porcentaje de ellos se realinearán a ellos mismos en comparación con aquellos productos (blancos verdaderos) que se encuentren en mayor concentración (33)

En algunos casos de extremo exceso de producto, es posible que se de la concatemerización del producto, resultando en bandas de peso molecular mucho más alto que el producto deseado. Este artefacto puede evitarse por reducción del número de ciclos y mediante un cálculo cuidadoso de la razón iniciador-plantilla (33).

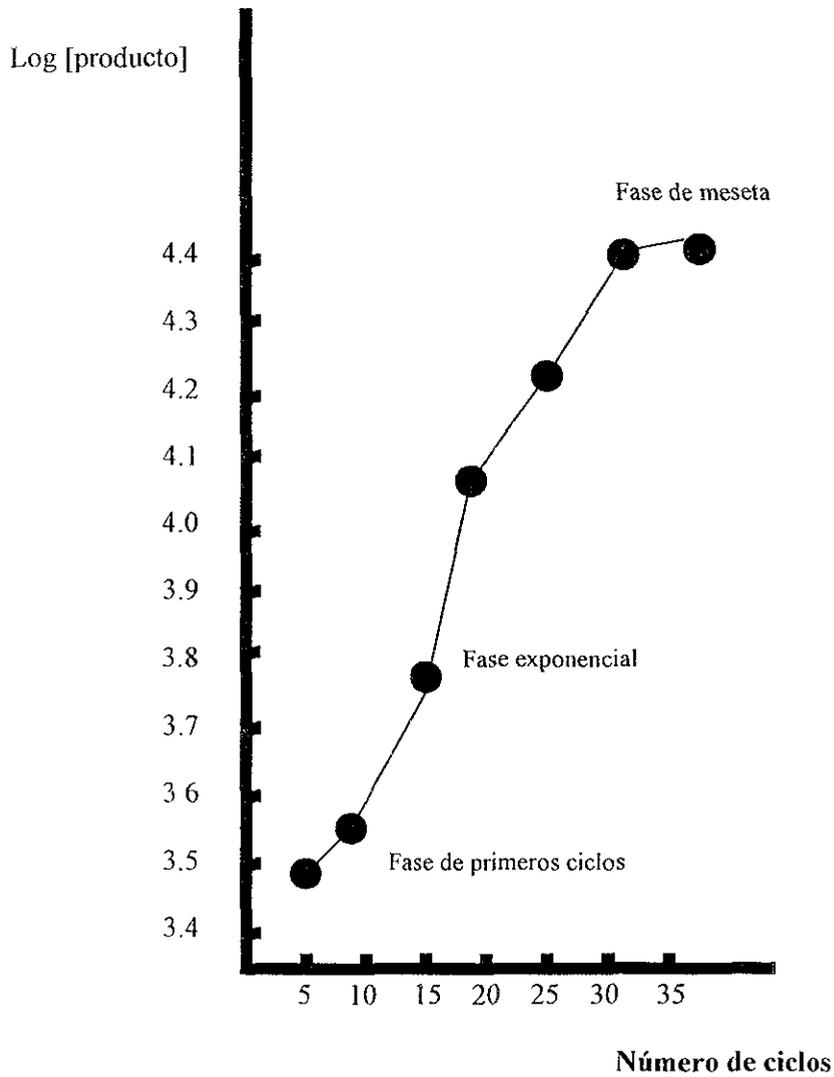


FIG. 2 Cinética experimental de la PCR. Se grafica número de ciclos contra cantidad de producto

III.5 CONTROL ENZIMATICO DE LA CONTAMINACION EN PCR

La PCR es especialmente sensible a la contaminación, ya que produce abundante amplificado a partir de trazas del ADN original. Cualquier posible contaminación debe ser eliminada para que los resultados de la PCR sean significativos. El ADN contaminante puede originarse de tres fuentes: ADN de otras muestras a probar, ADN de materiales experimentales como clonas recombinantes o ADN generado de amplificaciones previas de la misma secuencia blanco. Esta última fuente de contaminación es la más común y también la que causa más problemas y es llamada contaminación por acarreamiento. Es esencial detectar la contaminación por acarreamiento mediante la inclusión de un control negativo en las reacciones (34).

El método más ampliamente usado para la descontaminación de la PCR está basado en sustituir timina por uracilo en el ADN producto de la PCR. El ADN producido en tales condiciones es normal en muchos aspectos (puede ser cortado con muchas enzimas de restricción y ser hibridizado a sondas), excepto que contiene decenas o centenas de desoxiuridinas. Una preincubación de todas las reacciones de amplificación con la enzima uracil DNA glicosilasa (UDG) resulta en la remoción de los uracilos del ADN acarreado (sin afectar ADN blanco y dUTP), creando decenas o centenas de sitios abásicos. Las DNA polimerasas se paran en estos sitios, además, tales sitios son lábiles al calor y se rompen durante los ciclos de temperatura, lo que evita la amplificación. Si el dUTP es usado rutinariamente en todas las amplificaciones, entonces todos los productos tendrán uracilo y serán susceptibles a la UDG. Este método es poderoso debido a que actúa en reacciones completas justo antes de los ciclos de temperatura (todos los

componentes están presentes, incluyendo el ADN plantilla), ningún producto de PCR acarreado, sin importar su fuente, puede escapar a la destrucción (34).

III.6 PCR ANIDADA

La PCR anidada es realizada a partir del amplificado obtenido de una PCR inicial, es decir los productos de amplificación obtenidos en PCR sirven como ADN plantilla en la PCR anidada. En la PCR anidada se utiliza un par de oligonucleótidos iniciadores diferente al par utilizado en la PCR, así el par de oligonucleótidos de la PCR amplifica el fragmento de ADN de interés bajo condiciones normales de PCR y una alícuota del producto amplificado es sujeto a una segunda PCR (PCR anidada) utilizando un segundo par de oligonucleótidos iniciadores complementarios a la secuencia interna del primer par de oligonucleótidos. Sólo el producto legítimo deberá ser amplificado en esta segunda PCR (31).

El par de oligonucleótidos utilizado en la PCR puede ser removido antes de continuar con la segunda PCR o PCR anidada, por centrifugación con filtros moleculares Centricon 30 o bien por uso de cantidades limitantes de dicho par de oligonucleótidos. Comúnmente la PCR anidada se utiliza cuando se requiere incrementar la sensibilidad del sistema ya que el producto de PCR no logra visualizarse mediante electroforesis en gel de agarosa al teñir con bromuro de etidio (ETBR).

Con la PCR anidada se ve favorecida la especificidad al reducir o eliminar productos no deseados mientras que al mismo tiempo se incrementa la sensibilidad del sistema (31).

III.7 DETECCION Y ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR Y PCR ANIDADA

Para la detección y análisis de los productos amplificados, hay disponibles una gran variedad de procedimientos, los productos de PCR de diferentes tamaños usualmente son separados por electroforesis en gel, en gel capilar o por HPLC. El método más fácil y el más usado es la electroforesis en gel sumada a la tinción con bromuro de etidio u otro colorante fluorescente equivalente, para visualizar las bandas de ADN. El gel puede estar hecho de poliacrilamida o de agarosa. La cantidad de colorante incorporado depende de la longitud del ADN, por lo que debe hacerse la corrección que tome en cuenta esto al momento de comparar las cantidades molares del blanco y del estándar para la cuantificación. Para determinar la cantidad de plantilla debe construirse una gráfica en la que el logaritmo de la razón de la intensidad de la señal correspondiente al estándar interno sobre la de la plantilla, usualmente corregida por la diferencia de tamaños, es graficada en función del logaritmo de la concentración del estándar interno agregado. Esto produce una gráfica lineal y para encontrar el número de copias de ADN plantilla presentes en la muestra, se hace una interpolación para $Y=0$ que es el punto en que los productos de amplificación del estándar y del blanco están en concentraciones iguales.

Un procedimiento más sensible que la tinción con bromuro de etidio es el marcaje de los oligonucleótidos o de los dNTPs con fluorescencia o radioactividad. En el caso de marcaje radioactivo, después de la separación electroforética, puede cuantificarse la radioactividad incorporada en las bandas cortadas, se puede hacer una densitometría de la autoradiografía del gel, o una radioimagen del gel seco. En el caso del marcaje fluorescente, los productos pueden separarse en geles de poliacrilamida y cuantificarse usando un secuenciador automático de ADN con inductor de fluorescencia (35).

Otro método es hacer la separación electroforética de productos no marcados transferidos a una membrana y cuantificar después de hibridarse con sondas marcadas de manera radioactiva o no radioactiva. Alternativamente los productos pueden hibridarse con sondas marcadas antes de la separación (hibridación en líquido). Para llevar a cabo una cuantificación automatizada, se han reportado métodos que envuelven la captura de los productos de PCR en soportes sólidos (como microplacas o cuentas magnéticas) seguida por cuantificación del material capturado por hibridación con sondas marcadas (35).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A más de 100 años de que Roberto Koch lograra la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* como el microorganismo causante de la tuberculosis en el humano, el cuadro epidemiológico mundial no es halagador. Hasta hace unos años la enfermedad parecía estar bajo control en los países desarrollados, pero esto ya no es así, debido a la aparición y diseminación de cepas resistentes y al aumento de los casos de síndrome de la inmunodeficiencia humana (SIDA). Por estas mismas razones, el problema actualmente reviste una magnitud aun mayor en los países en desarrollo, en donde a los problemas inherentes al padecimiento se suma la carencia de recursos humanos y económicos para controlarlo. La diseminación hematógena es una forma de progresión de la enfermedad que se da cuando el organismo no tiene la capacidad para detener la infección. Sucede en personas desnutridas, parasitadas, o con problemas inmunológicos. Esta forma de diseminación de la infección, es la que explica las localizaciones en sitios extrapulmonares, tales como en el sistema nervioso, considerada ésta como la tuberculosis de tipo extrapulmonar más peligrosa (21)

Existen métodos tradicionales para el diagnóstico de la tuberculosis que se basan en el estudio de la bacteria y su metabolismo, tales como la detección microscópica de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) o bien por cultivo en medio de Lowestein Jensen. La desventaja de estos métodos es que no permiten diferenciar entre especies y sobre todo que en cultivo tienen que pasar por lo menos quince días para dar un resultado positivo y de 6 a 8 semanas para dar un resultado negativo, así mismo la sensibilidad como la especificidad son considerablemente bajas en ellos (14,21,36).

Utilizando los métodos de biología molecular, que se basan en la detección del material genético de la micobacteria, puede demostrarse la presencia del bacilo tuberculoso en una muestra clínica en tres días, el método más conocido es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (21)

Debido a que los métodos de biología molecular son útiles y convenientes para detectar la infección de manera rápida, para realizar estudios epidemiológicos, para distinguir entre las diferentes especies, entre otros, se empleará un método de PCR múltiple para detectar e identificar micobacterias presentes en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) con diagnóstico probable de tuberculosis meníngea (TBM) y en muestras de LCR con diagnóstico confirmado de otra etiología. Así mismo para aquellos casos en los que se obtengan resultados indeterminados o negativos se utilizará un método de PCR anidada especie-específica

De esta manera se considera que puede tenerse un sistema de Biología Molecular que brinde mayores posibilidades de identificación de bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*, en muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo de manera oportuna y confiable que ayude al diagnóstico de la tuberculosis meníngea

V.OBJETIVOS

GENERAL

- ❖ Establecer un sistema de Biología molecular, que permita de manera rápida, sensible, específica y confiable ayudar en el diagnóstico de la tuberculosis meníngea.

PARTICULARES

- ❖ Establecer un sistema de PCR múltiple, cuya sensibilidad, especificidad y rapidez, permitan obtener resultados confiables para ayudar al diagnóstico de la tuberculosis meníngea, así como para identificar aquellos casos de infección por otro tipo de micobacterias
- ❖ Establecer una prueba de PCR anidada especie-específica para *Mycobacterium tuberculosis*, que permita incrementar la sensibilidad de la prueba de PCR múltiple
- ❖ Comparar los resultados obtenidos por PCR múltiple y PCR anidada especie-específica, con los que se obtengan por cultivo en medio Lowestein Jensen, y por baciloscopia (BAAR), con la finalidad de comparar la sensibilidad entre ellas

VI. HIPOTESIS

Tomando como base a la Biología Molecular, se implementará un Sistema de PCR múltiple y PCR anidada para ayudar en el diagnóstico oportuno y confiable de la tuberculosis meníngea, que tenga mayores ventajas sobre aquellos métodos que hasta el momento se utilizan en el Laboratorio de Análisis Clínicos y por tanto que sea de gran utilidad como una herramienta de trabajo para el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. I.M.S.S

V.OBJETIVOS

GENERAL

- ❖ Establecer un sistema de Biología molecular, que permita de manera rápida, sensible, específica y confiable ayudar en el diagnóstico de la tuberculosis meningea.

PARTICULARES

- ❖ Establecer un sistema de PCR múltiple, cuya sensibilidad, especificidad y rapidez, permitan obtener resultados confiables para ayudar al diagnóstico de la tuberculosis meningea, así como para identificar aquellos casos de infección por otro tipo de micobacterias.
- ❖ Establecer una prueba de PCR anidada especie-específica para *Mycobacterium tuberculosis*, que permita incrementar la sensibilidad de la prueba de PCR múltiple
- ❖ Comparar los resultados obtenidos por PCR múltiple y PCR anidada especie-específica, con los que se obtengan por cultivo en medio Lowestein Jensen, y por baciloscopia (BAAR), con la finalidad de comparar la sensibilidad entre ellas

VI. HIPOTESIS

Tomando como base a la Biología Molecular, se implementará un Sistema de PCR múltiple y PCR anidada para ayudar en el diagnóstico oportuno y confiable de la tuberculosis meningea, que tenga mayores ventajas sobre aquellos métodos que hasta el momento se utilizan en el Laboratorio de Análisis Clínicos y por tanto que sea de gran utilidad como una herramienta de trabajo para el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. I.M.S.S

VII. POBLACION

Los pacientes fueron captados en diferentes servicios del Hospital de Especialidades del C.M.N. S. XXI, tales como medicina interna y neurología, así como del Instituto Nacional de Referencia (I.N.D.R.E.).

Se trabajó con un total de 48 especímenes clínicos de LCR

VIII. CRITERIOS DE:

INCLUSION

- ❖ Serán incluidos en el estudio pacientes de ambos sexos, cuyos historiales clínicos indiquen una alta probabilidad de presentar TBM.
- ❖ Serán incluidos en el estudio pacientes vírgenes al tratamiento antituberculoso

EXCLUSION

- ❖ Serán excluidos del estudio pacientes que estén bajo tratamiento antituberculoso

ELIMINACION

- ❖ Serán eliminados del estudio aquellos pacientes que inicialmente reunían todos los criterios de inclusión, pero que en algún momento del proceso perdieron alguno de ellos.

IX. TIPO DE ESTUDIO

De acuerdo con el proyecto en que se capta la información, el estudio es: *Prospectivo*

De acuerdo con la evolución del fenómeno que se analiza, el estudio es: *Transversal*

De acuerdo con la comparación de las poblaciones el estudio es: *Descriptivo*

De acuerdo con la interferencia del investigador en el fenómeno que se analiza, el estudio es: *Observacional* (37).

VII. POBLACION

Los pacientes fueron captados en diferentes servicios del Hospital de Especialidades del C M,N S XXI, tales como medicina interna y neurología, así como del Instituto Nacional de Referencia (I N D R E)

Se trabajó con un total de 48 especímenes clínicos de LCR

VIII. CRITERIOS DE:

INCLUSION

- ❖ Serán incluidos en el estudio pacientes de ambos sexos, cuyos historiales clínicos indiquen una alta probabilidad de presentar TBM
- ❖ Serán incluidos en el estudio pacientes vírgenes al tratamiento antituberculoso

EXCLUSION

- ❖ Serán excluidos del estudio pacientes que estén bajo tratamiento antituberculoso.

ELIMINACION

- ❖ Serán eliminados del estudio aquellos pacientes que inicialmente reunían todos los criterios de inclusión, pero que en algún momento del proceso perdieron alguno de ellos

IX. TIPO DE ESTUDIO

De acuerdo con el proyecto en que se capta la información, el estudio es *Prospectivo*

De acuerdo con la evolución del fenómeno que se analiza, el estudio es *Transversal*

De acuerdo con la comparación de las poblaciones el estudio es *Descriptivo*

De acuerdo con la interferencia del investigador en el fenómeno que se analiza, el estudio es *Observacional* (37)

VII. POBLACION

Los pacientes fueron captados en diferentes servicios del Hospital de Especialidades del C.M.N S XXI, tales como medicina interna y neurología, así como del Instituto Nacional de Referencia (I N D.R.E.)

Se trabajó con un total de 48 especímenes clínicos de LCR.

VIII. CRITERIOS DE:

INCLUSION

- ❖ Serán incluidos en el estudio pacientes de ambos sexos, cuyos historiales clínicos indiquen una alta probabilidad de presentar TBM
- ❖ Serán incluidos en el estudio pacientes vírgenes al tratamiento antituberculoso

EXCLUSION

- ❖ Serán excluidos del estudio pacientes que estén bajo tratamiento antituberculoso

ELIMINACION

- ❖ Serán eliminados del estudio aquellos pacientes que inicialmente reunían todos los criterios de inclusión, pero que en algún momento del proceso perdieron alguno de ellos

IX. TIPO DE ESTUDIO

De acuerdo con el proyecto en que se capta la información, el estudio es *Prospectivo*

De acuerdo con la evolución del fenómeno que se analiza, el estudio es *Transversal*

De acuerdo con la comparación de las poblaciones el estudio es *Descriptivo*

De acuerdo con la interferencia del investigador en el fenómeno que se analiza, el estudio es *Observacional* (37)

XI. VARIABLES

INDEPENDIENTES

- ❖ Sexo, Peso, Estatura, Edad, Nivel socioeconómico. Area geográfica de procedencia, Inmunosupresión, Tuberculosis diagnosticada tiempo atrás.

DEPENDIENTES

- ❖ PCR positivo Cultivo positivo
- ❖ PCR positivo Cultivo negativo
- ❖ PCR negativo PCR anidada positiva Cultivo positivo
- ❖ PCR negativo PCR anidada positiva Cultivo negativo
- ❖ PCR negativo PCR anidada negativa Cultivo positivo
- ❖ PCR negativo PCR anidada negativa Cultivo negativo

XII. MATERIAL

- Tubos eppendorf de 0.5 ml y de 2 ml
- Pinzas para tubos eppendorf
- Destapador para tubos eppendorf
- Flotador para tubos eppendorf
- Matraz erlenmeyer de 125 ml, 250 ml, 500 ml
- Probetas de 50ml y 1000 ml
- Celda de cuarzo
- Espátula
- Mechero bunsen
- Varillas de vidrio

XI. VARIABLES

INDEPENDIENTES

- ❖ Sexo, Peso, Estatura, Edad, Nivel socioeconómico, Area geográfica de procedencia, Inmunosupresión, Tuberculosis diagnosticada tiempo atrás.

DEPENDIENTES

- ❖ PCR positivo Cultivo positivo
- ❖ PCR positivo Cultivo negativo
- ❖ PCR negativo PCR anidada positiva Cultivo positivo
- ❖ PCR negativo PCR anidada positiva Cultivo negativo
- ❖ PCR negativo PCR anidada negativa Cultivo positivo
- ❖ PCR negativo PCR anidada negativa Cultivo negativo

XII. MATERIAL

- Tubos eppendorf de 0.5 ml y de 2 ml
- Pinzas para tubos eppendorf
- Destapador para tubos eppendorf
- Flotador para tubos eppendorf
- Matraz erlenmeyer de 125 ml, 250 ml, 500 ml
- Probetas de 50ml y 1000 ml
- Celda de cuarzo
- Espátula
- Mechero bunsen
- Varillas de vidrio

- Portaobjetos
- Lápiz graso
- Gasas
- Papel aluminio
- Papel Kraf
- Papel filtro
- Papel glacin
- Cinta testigo
- Guantes desechables
- Micropipetas de 0-2 ul, 5-40 ul, 40-200 ul y 200-1000 ul
- Puntas sin filtro para las diferentes micropipetas
- Puntas con filtro para las diferentes micropipetas
- Gradilla para tubos eppendorf

XI.1 REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA EXTRACCION DEL ADN

- TRIzol reagent Ultra Pure Gibco BRL Life Technologies
- Hidróxido de sodio 8mM
- Citrato de sodio 0.1M en etanol al 10%
- Etanol al 75%
- Etanol al 100%
- Cloroformo

XI.2 REACTIVOS PARA PCR MULTIPLE

- Cloruro de magnesio 25mM
- Regulador de fosfatos 10X

- Oligonucleótidos iniciadores (IS5-IS6, MT1-MT2, PT1-PT2)
- Agua inyectable
- Dinucleótidos fosfato
- Enzima DNA polimerasa (Taq polimerasa)

XI.3 REACTIVOS PARA PCR ANIDADA

- Cloruro de magnesio 25mM
- Regulador de fosfatos 10X
- Oligonucleótidos iniciadores (PT3-PT4)
- Agua inyectable
- Dinucleótidos fosfato
- Enzima DNA polimerasa (Taq polimerasa)

XI.4 REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS

- Amortiguador E para corrimiento 40X
 - Tris-HCL 1.6M
 - EDTA 40mM
 - Acetato de sodio 0.8mM
 - Acido acético glacial para ajustar pH a 7.9
- Agarosa al 2%
- Solución colorante 2X
 - Glicerol 10%
 - Azul de bromofenol 0.01-0.05%
 - Urea 0.8mM
 - Amortiguador E 1x o TAE o TBE

XI.5 EQUIPO

- Termociclador Techne Progene FPROGOSY
- Refrigerador Lab-Line Instruments 297-003
- Congelador a -70°C REVCO
- Dos campanas de bioseguridad VECO 70
- Centrifuga refrigerada para tubos eppendorf Hettich EBA 12R D78532
- Rotor de velocidad variable 151 Scientific Industries INC
- Secador a vacio HETOVAC EQUIPMENT UR-1/120/240
- Autoclave FEHLMEX AZTECA
- Espectrofotómetro DU640
- Unidad de filtración
- Termobañó FE-371
- Vortex Mixtral LR19314
- Camara de electroforesis horizontal Horizon 58 Life-Technologies
- Fuente de poder Life-Technologies 250
- Amplificador de imágenes IS-1000 Digital Imaging System Alpha Innotech Corporation
- Balanza analítica OHAVSAP2105
- Incubadora Napco 5100
- Parrilla de agitación y calentamiento Lindberg 53166
- Microscopio binocular con objetivo de inmersión.

XII. METODOS

- Aislamiento del ADN
- Cuantificación del ADN
- Amplificación del ADN por PCR múltiple
- Reamplificación de productos de PCR múltiple por PCR anidada especie-específica.
- Electroforesis en gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio
- Análisis de productos de PCR y PCR anidada a través de un amplificador de imágenes
- Cultivo en medio de Lowestein-Jensen
- Tinción de Ziehl-Neelsen para BAAR

XII.1 AISLAMIENTO DE ADN MEDIANTE EL REACTIVO DE TRIzol

- ❖ Encender la campana de bioseguridad 10 minutos antes de su uso, y sanitizarla utilizando etanol al 75 % o bien hipoclorito de sodio al 10 %.
- ❖ Limpiar con las mismas soluciones las micropipetas, la gradilla para eppendorf, las pinzas, el destapador de tubos eppendorf, la superficie de las cajas con puntas, es decir, la superficie de todo objeto que se coloque dentro de la campana de bioseguridad
- ❖ La gradilla donde se trabajen las muestras biológicas deberá estar dentro de un recipiente con hielo
- ❖ Tomar una alícuota de 500 μ l de líquido cefalorraquídeo con micropipeta y punta con filtro estéril y colocarlo en un tubo eppendorf de 2 ml
- ❖ Someter la muestra biológica a choque térmico durante 30 min a 70 °C

- ❖ Centrifugar a 14,000 rpm / 15 min a 4°C y decantar el sobrenadante
- ❖ Pasados los 30 min adicionar 1000 ul de TRIzol y agitar en vortex durante 60 seg.
- ❖ Incubar a temperatura ambiente durante 5 min
- ❖ Agregar 200 ul de cloroformo y tapar bien los tubos eppendorf
- ❖ Agitar vigorosamente en vortex durante 30 seg
- ❖ Incubar a temperatura ambiente durante 2 o 3 min.
- ❖ Centrifugar a 14 000 rpm / 15 min a 4°C.
- ❖ Descartar la fase acuosa y la interfase
- ❖ Precipitar la fase orgánica con 300 ul de etanol al 100 %
- ❖ Mezclar por inversión
- ❖ Mantener a temperatura ambiente por 2 o 3 min
- ❖ Centrifugar a 7500 rpm/ 5 min a 4°C
- ❖ Eliminar el sobrenadante
- ❖ Lavar el botón de ADN dos veces con 1000 ul de la solución de citrato de sodio 0.1 M por 30 min a 4 °C en el rotor de velocidad variable
- ❖ Centrifugar a 7500 rpm / 5 min a 4°C, en cada lavado, y decantar el sobrenadante
- ❖ Suspender el botón de ADN con 1.5 a 2 ml de etanol al 75%
- ❖ Mantener durante 10 a 20 min. a temperatura ambiente y mezclar por inversión periódicamente
- ❖ Centrifugar a 7500 rpm/ 5 min a 4 °C.
- ❖ Eliminar el sobrenadante y secar el boton durante 5 a 10 min. a bajo vacio
- ❖ Agregar 30 ul de hidróxido de sodio 8mM al ADN aislado

- ❖ Si fuera necesario remover el material insoluble mediante centrifugación a 14 000 rpm 10 min. a 4°C.
- ❖ Transferir el sobrenadante conteniendo el ADN a un nuevo tubo eppendorf (38,39,40).

XII.2 CUANTIFICACION DEL ADN

- ❖ Calentar el ADN que se encuentra en los 30 ul de NaOH 8 mM, durante 20 minutos a una temperatura de 55 °C.
- ❖ Hacer una dilución 1:100 y leer a 260 nm y 280 nm
- ❖ Obtener la concentración de ADN mediante la siguiente fórmula:

$$(\text{Absorbancia a } 260\text{nm}) \times (\text{Factor de dilución}) \times (50) = \text{ug de ADN/ml}$$

Donde.

50 corresponde a 50 ug de ADN de doble cadena por ml, que es igual a 1 unidad de absorbancia a 260 nm. (40).

XII.3 PCR MULTIPLE

- ❖ Dedicar pipetas exclusivas para Biología Molecular y no mezclarlas con las que se utilicen en el aislamiento del ADN y electroforesis, con la finalidad de evitar al máximo la posible contaminación cruzada.
- ❖ Realizar una mezcla maestra con los siguientes reactivos de PCR (considerar que los siguientes volúmenes son para un sólo tubo de reacción, por tanto se tendrá que hacer el cálculo para el número de tubos de reacción deseados)

Cloruro de magnesio 25 mM	...	5 ul
Regulador 10X	...	5 ul
Dinucleótidos fosfato 10 mM	...	1 ul

Oligonucleótidos iniciadores

MT1	10 pmol/ul	1 ul
MT2	10 pmol/ul	1 ul
IS5	15 pmol/ul	1 ul
IS6	15 pmol/ul	1 ul
PT1	20 pmol/ul	1 ul
PT2	20 pmol/ul	1 ul
Agua inyectable	22 75ul

❖ Agregar en tubos separados:

10ul de Agua inyectable para el control negativo

10ul de ADN de la muestra problema

10ul de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* para el control positivo (100 ng)

- ❖ Agregar a cada tubo de reacción 0 25 ul de Taq polimerasa (1 25 U)
- ❖ Cada tubo de reacción debe contener un volumen final de 50ul
- ❖ El perfil térmico de la PCR múltiple está indicado en la Tabla 3

XII.4 PCR ANIDADA

- ❖ Dedicar pipetas exclusivas para Biología Molecular, y no mezclarlas con las que se utilicen en el aislamiento del ADN y electroforesis, para así evitar al máximo la posible contaminación cruzada

Cloruro de magnesio 25 mM 5 ul

Regulador 10X5 ul

Dinucleótidos fosfato 10 mM 1 ul

Oligonucleóidos iniciadores

PT3 20pmol/ul... .1 ul

PT4 20pmol/ul... .1 ul

Agua inyectable 26 75 ul

- ❖ Agregar en tubos separados:
 - 10 ul de agua inyectable para el control negativo
 - 10 ul del amplificado de PCR múltiple de la muestra problema
 - 10 ul de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* para el control positivo (100 ng)
- ❖ Agregar a cada tubo de reacción 0 25 ul de Taq polimerasa (1 25 U).
- ❖ Todos los tubos de reacción debe contener un volumen final de 50 ul
- ❖ El perfil térmico de la PCR anidada está indicado en la Tabla 4

XII.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

CON TINCION DE BROMURO DE ETIDIO

- ❖ Dedicar pipetas exclusivas para los productos de PCR múltiple y PCR anidada y no compartirlas con las que se utilicen en el aislamiento del ADN y pruebas de PCR múltiple y PCR anidada
- ❖ Colocar 0 5 g de agarosa en un matraz erlenmeyer de 125 ml de volumen
- ❖ Agregar 25 ml. de regulador E 1X, agitar y homogeneizar
- ❖ Calentar la mezcla a punto de ebullición en un horno de microondas o directamente al fuego
- ❖ Agregar 1 ul de Bromuro de Etidio (0 5 ug por ml) y homogeneizar

- ❖ Enfriar la mezcla entre 45 °C y 48°C
- ❖ Preparar la cámara para electroforesis y colocar un peine con el número deseado de pozos
- ❖ Vertir cuidadosamente la agarosa a la cámara, evitando la formación de burbujas
- ❖ Esperar 20 min para que gelifique
- ❖ Remover el peine cuidadosamente para no dañar el gel
- ❖ Agregar suficiente regulador E 1X para cubrir el gel
- ❖ Colocar 3 ul de Marcadores Moleculares en el primer pozo del gel
- ❖ Mezclar 10 ul del producto amplificado de la muestra problema más 5ul de solución colorante 2X y colocar 10 ul en un pozo del gel. De la misma manera se procederá para el producto amplificado del control negativo y positivo.
- ❖ Aplicar al gel un voltage de 70volts durante aproximadamente 30min.
- ❖ Visualizar el gel en un Analizador de Imágenes o en una cámara de luz U V. (39)

XII.6 OBSERVACION DE GELES DE AGAROSA EN UN

ANALIZADOR DE IMAGENES

- ❖ Los geles de agarosa fueron visualizados en un Analizador de Imágenes IS-1000, Digital Imagin System, Alpha Innotech Corporation.

XII.7 CULTIVO EN MEDIO DE LOWESTEIN-JENSEN

- ❖ En el interior de la campana de bioseguridad se coloca un par de gradillas, una con los tubos de las muestras, bien etiquetadas e identificadas

- ❖ En la otra gradilla se colocan los tubos con medio de cultivo identificados con los números de los casos correspondientes
- ❖ Es importante que el primer espacio de la izquierda de cada gradilla este vacío para que durante la siembra ahí se coloque el tubo ya utilizado. Así, el espacio vacío se va desplazando hacia la derecha, sirviendo como punto de separación entre los tubos ya sembrados y los que están por sembrarse.
- ❖ Tomar 500 ul de la muestra de líquido cefalorraquídeo por sembrar, utilizando micropipeta y puntas con filtro, dejando escurrir sobre la superficie del medio sin tocarlo, observar que haya una distribución homogénea
- ❖ Una vez sembrados, los tubos se colocan en una bandeja con fondo inclinado, de manera que el líquido sembrado cubra toda la superficie del medio. Se llevan a la estufa de cultivo con la tapa ligeramente floja para lograr que se evapore cierta parte del líquido de la siembra.
- ❖ Después de 48 hrs se revisan los tubos y se ajusta el tapón de rosca para impedir la desecación del medio durante el tiempo de incubación
- ❖ Los tubos se mantienen en una gradilla e inclinados hasta el término del periodo de observación, esto es mejor cuando se dispone de una incubadora de cultivo amplia y se recomienda usar cajas de fondo inclinado con perforaciones que permitan la circulación uniforme del calor.
- ❖ La incubación de los tubos sembrados debe hacerse entre 35 y 37°C. Es necesario controlar regularmente la temperatura de la incubadora
- ❖ Las revisiones deberán hacerse por lo menos a las 48 hrs, 7 días, 15 días, 30 días y 60 días, debiendo anotar e informar en cada revisión únicamente los cultivos que sean

positivos. Los cultivos negativos sólo se informarán después de un periodo de incubación de 60 días (9 semanas).

- ❖ Los datos a anotar serán los siguientes: fecha de cultivo, fecha de revisión, tipo de crecimiento que se observa (si lo hay), color, consistencia, forma y algún otro detalle relevante.
- ❖ Para las muestras donde se observe crecimiento lento (a partir de las dos semanas) es recomendable realizar un frotis y teñir con Ziehl-Neelsen, observando si son bacilos ácido alcohol resistentes o no
- ❖ Cuando el frotis resulte positivo a BAAR se permitirá el crecimiento de la bacteria, dejando incubar hasta que las colonias sean suficientemente grandes para su descripción morfológica.
- ❖ Si en las revisiones aparecen cultivos contaminados tardíamente, sólo deben eliminarse aquellos en los que la contaminación ha cubierto la mayor parte de la superficie del medio, dejando para nueva observación los que conservan la mayor parte del medio sin contaminación. La contaminación tardía no excluye la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium bovis*, por lo que siempre es conveniente realizar un frotis con Ziehl-Neelsen, a partir de los tubos que se desechan por esta causa.
- ❖ La morfología colonial de *Mycobacterium tuberculosis* en medio de Lowenstein-Jensen es la siguiente

Presentar colonias típicas blancas o color crema, de aspecto rugoso a seco, que con el tiempo toman forma de coliflor. Se desarrollan en la superficie del medio y el sitio en que se implantan no cambia de color (21)

- ❖ *Mycobacterium bovis* presenta una morfología colonial característica de colonias muy pequeñas (1 a 1.5 μm), translúcidas que con el tiempo toman la forma piramidal (21)

Nota:

Características del medio comercial utilizado en el estudio:

Medio de Lowestein-Jensen "BIOXON"

Caja con 10 tubo, cada tubo contiene 7 ml de medio.

Lote 4007081430071

Catálogo 300

Fecha de caducidad 010399

Se conserva entre 2 y 8°C

XII.8 TINCION DE ZIEHL-NEELSEN PARA BAAR

- ❖ El área de trabajo para realizar las baciloscopías requiere de una mesa de por lo menos 1 x 0 50 m, recubierta de un material que pueda desinfectarse fácilmente con soluciones germicidas como fenol al 5%

EQUIPO Y MATERIAL

- ❖ Microscopio binocular, con objetivo de inmersión.
- ❖ Portaobjetos, soporte de vidrio para tinción, mechero, lápiz graso o de diamante, recipientes para eliminación de material contaminado.
- ❖ Lavamanos dedicado a la coloración de los extendidos.

PROCEDIMIENTO

- ❖ Con un lápiz graso trazar una línea en un portaobjetos, dividiendo su superficie en un tercio, destinado a la numeración y dos tercios para el extendido.

- ❖ Anotar con lápiz graso en la parte superior la codificación del paciente.
- ❖ Colocar las muestras a procesar sobre la mesa de trabajo, en línea horizontal
- ❖ Tomar con un asa bacteriológica una porción del crecimiento bacteriano, previamente preparado con una gota de solución salina al 0.9% por muestra y depositarlo en el portaobjetos
- ❖ Cerrar cada tubo de muestra y colocarlo en una segunda línea, en el mismo orden de la lista de trabajo, detrás de las muestras que aún no se han procesado
- ❖ Dejar secar a temperatura ambiente y fijar con pases rápidos por la llama (dos o tres veces) teniendo cuidado de no producir aerosoles

La técnica de Ziehl-Neelsen consta de las etapas de coloración, decoloración y coloración de contraste.

Coloración:

- ❖ Los frotis se colocan, conservando el orden numérico, sobre el soporte de vidrio dispuesto en el lavamanos, con el extendido hacia arriba y el tercio numerado hacia el operador. Es conveniente que el soporte más cercano al operador esté ligeramente levantado, para evitar que el colorante cubra la numeración del portaobjetos
- ❖ Cubrir la superficie del extendido con fucsina fenicada.
- ❖ Calentar suavemente con un mechero bunsen por debajo de las láminas cubiertas con fucsina, hasta que produzca emisión de vapores blanquecinos visibles, dejar de calentar y repetir la operación por dos veces más. En ningún caso la fucsina debe hervir o secarse sobre el portaobjetos; si ocurre esto debe reponerse el colorante
- ❖ La operación de calentar tres veces hasta la emisión de vapores toma unos cinco minutos, que es el tiempo adecuado de contacto entre el extendido y el colorante.

- ❖ Eliminar la fucsina tomando al portaobjetos por los bordes del extremo numerado, con una pinza inclinándolo hacia adelante y lavar con agua a baja presión
- ❖ Girar el portaobjetos para lavar la cara inferior y eliminar la fucsina que ha escurrido
- ❖ Para la decoloración, cubrir la extensión con alcohol-ácido
- ❖ Tomar el portaobjetos por los bordes del extremo numerado y efectuar un suave movimiento suave de vaivén, de modo que el alcohol-ácido vaya decolorando y arrastrando la fucsina. Cuando la solución decolorante adquiera una coloración roja lavar con agua y en caso necesario decolorar nuevamente
- ❖ Eliminar el alcohol-ácido lavando el portaobjetos con agua a baja presión
- ❖ Se considera que la extensión ha sido decolorada cuando sus partes más gruesas sólo conservan un ligero tinte rosado. Esta operación tarda de uno a dos minutos.
- ❖ Una vez que se ha decolorado se procede a la coloración de contraste para lo cual se cubre la superficie del extendido con azul de metileno durante un minuto.
- ❖ Eliminar el azul de metileno y lavar la lámina con agua a baja presión, tanto por la cara del extendido como por la cara inferior
- ❖ Las preparaciones ya teñidas se secan a temperatura ambiente, colocándolas sobre papel absorbente limpio y en forma inclinada.
- ❖ Revisar la numeración de los portaobjetos y remarcar si se ha borrado durante la tinción
- ❖ Para la observación se emplea un microscopio equipado con objetivo de inmersión (100X) y ocular de 8X o 10X

Se coloca una gota de aceite de inmersión sobre el extremo más cercano a la numeración del extendido y sin tocar la superficie del portaobjetos.

- ❖ Enfocar el microscopio acercando el objetivo de inmersión hasta tocar la superficie de la gota de aceite. Ajustar enseguida con el tornillo micrométrico
 - ❖ Los bacilos aparecen como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, teñidos de rojo, generalmente con gránulos más teñidos en su interior, aislados en parejas o en grupos sobre el azul claro de la tinción de contraste
 - ❖ Se debe seguir una pauta sistemática para la observación, leyendo la preparación de izquierda a derecha.
 - ❖ Si no se encuentran BAAR o hay menos de un bacilo por campo en promedio, se examinan al menos 100 campos microscópicos.
 - ❖ Si se encuentran de 1 a 10 bacilos por campo en promedio, es suficiente la observación de 50 campos.
 - ❖ Si se encuentran más de 10 bacilos por campo en promedio, basta con la observación de 20 campos
 - ❖ Terminada la lectura se limpia el aceite de inmersión del objetivo con papel seda o suave, absorbiendo el aceite sin frotar la superficie del lente.
 - ❖ El frotis observado se sumerge en xilol, se escurre para eliminar el aceite y se archiva
- (21)

XII.9 OLIGONUCLEOTIDOS INICIADORES UTILIZADOS EN EL PROYECTO

TABLA 1.

La síntesis de los oligonucleótidos iniciadores se solicitó a Boehringer Mannheim

Gen amplificado	Denominación	SECUENCIA	Longitud de la banda
Antígeno alfa	MT1	5'-TTC CTG ACC AGC GAG CTG CCG-3'	506pb
	MT2	5'-CCC CAG TAC TCC CAG CTG TGC-3'	
Secuencia de inserción IS6110	IS5	5'-CGG AGA CGG TGC GTA AGT GG-3'	984pb
	IS6	5'-GAT GGA CCG CCA GGG CTT GC-3'	
<i>mtp-40</i>	PT1	5'-CAA CGC GCC GTC GGT GG-3'	396pb
	PT2	5'-CCC CCC ACG GCA CCG C-3'	
Fragmento interno	PT3	5'-CAC CAC GTT CGG GAT GCA CTG C-3'	223pb
	PT4	5'-CTG ATG GTC TCC GAC ACG TCG-3'	

XII.10 GENES AMPLIFICADOS EN PCR MULTIPLE Y PCR ANIDADA

TABLA 2

GEN AMPLIFICADO	UBICACION
Antígeno alfa	Presente en todas las micobacterias descritas
Secuencia de inserción IS6110	Presente en las micobacterias pertenecientes al complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mtp 40</i>	Especie-específico para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

XII.11 PERFIL TERMICO PARA PCR MULTIPLE

TABLA 3.

En el Termociclador Techne Progene FPROGOSY

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Alineamiento	71	2	
Extensión	72	3	
Extensión final	72	10	1

XII.12 PERFIL TERMICO PARA LA PCR ANIDADA

TABLA 4

En el termociclador techne Progene FPROGOSY

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (minutos)	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	30
Alineamiento	75	2	
Extensión	72	2	
Extensión final	72	7	1

XIII. RESULTADOS

XIII.1 AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DEL ADN

Las lecturas del ADN de las 48 muestras de líquido cefalorraquídeo se efectuaron a 260nm y 280nm. Se obtuvo la relación de las dos absorbancias, mismas que fueron entre 1.60 y 1.81. Se hicieron los cálculos para conocer las concentraciones de ADN, las cuales oscilaron entre 94.5 y 126 ug/ml.

XIII.2 DATOS CLINICOS Y RESULTADOS DE PCR MULTIPLE Y PCR ANIDADA DE LOS 48 PACIENTES

PACIENTE	SEXO	EDAD	DATOS CLINICOS	PCR MULTIPLE	PCR ANIDADA
1-02	M			I	P
2-03	F			N	N
3-11	M			N	N
4-12	F			N	P
5-13	F	62	Pérdida de peso 13 kg en 5 meses, vómito, cefalea, debilidad generalizada, adinamia. TAC revela hemisferio cerebeloso izquierdo hiperdenso.	N	P

Lease P como positivo, N como negativo e I como indeterminado

PACIENTE	SEXO	EDAD	DATOS CLINICOS	PCR MULTIPLE	PCR ANIDADA
6-22	M	28	Cefalea holocraneana, vómito, mareos, somnia, fiebre nocturna, pérdida de peso	N	N
7-24	M			N	P
8-25	M			N	P
9-27	F			N	N
10-28	M	49	Disminución de la fuerza muscular, parestecias y pérdida del control de esfínteres, atrofia de papila izquierda, hipertrofia de músculos interoseos	I	P
11-30				N	N
12-31	M	76	Deterioro de FMS	N	N
13-33	M	72	Tabaco dependiente	N	N
14-37	F	45	Deterioro neurológico	N	N
15-39	F			N	P
16-42	M			N	P
17-46	F	32	Cefalea, disminución de la agudeza visual	N	N
18-48				N	P
19-49				N	N

Lease P como positivo, N como negativo e I como indeterminado

PACIENTE	SEXO	EDAD	DATOS CLINICOS	PCR MULTIPLE	PCR ANIDADA
20-50				N	N
21-51				N	N
22-52				N	N
23-53				N	N
24-54				N	P
25-55				N	P
26-56	F			N	P
27-57	M	32	Inquietud progresiva, desorientación y disminución de la fuerza, deterioro del estado de alerta.	N	N
28-59	M			N	N
28-63				N	N
30-64				N	P
31-65				N	P
32-66				N	N
33-67				N	N
34-68				N	N
35-69				I	P
36-70				N	N
37-71				I	P
38-72	F	40	Presenta diploidía, cefalea	I	P
39-73	M	51	Cefalea, crisis convulsivas	I	P

Lease P como positivo, N como negativo e I como indeterminado

PACIENTE	SEXO	EDAD	DATOS CLINICOS	PCR MULTIPLE	PCR ANIDADA
40-76	M			N	N
41-77	M			I	P
42-78	F	63	Meningitis recurrente, sinusitis crónica, cefalea, mínima rigidez en cuello	N	P
43-79	M	72	Diabético, pérdida de peso 20 kg en 1 mes, paraplejia.	N	N
44-80			Deterioro neurológico franco	N	P
45-81	M	56	Cardiopatía reumática, deterioro neurológico, presenta paraplesia, fiebre	I	P
46-85	F	31	Cefalea holocraneana, disminución de agudeza visual y visión tubular, paraplesia bilateral	N	N
47-86	M	34	Paraplejia, en TAC se observa imagen supratentorial sugestiva de tuberculoma.	N	P
48-87	F	20	Alteración de memoria, juicio, cálculo, abstracción, desorientación en tiempo y lugar	N	P

Lease P como positivo, N como negativo e I como indeterminado

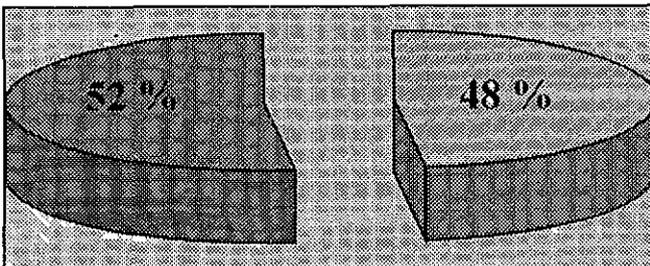
XIII.2 PCR MULTIPLE Y PCR ANIDADA

DE LOS 48 ESPECIMENES CLINICOS DE LCR

El ADN aislado de las 48 muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo obtenido de pacientes independientes, cuyos signos clínicos orientaban hacia tuberculosis meningea, fueron analizados mediante la prueba de PCR múltiple.

Dado que en los 48 casos se obtuvieron resultados negativos o indeterminados, se prosiguió a someter a cada una de las 48 muestras a la prueba de PCR anidada, con la que se obtuvieron los siguientes resultados:

<i>RESULTADO</i>	<i>PCR</i>	<i>PCR ANIDADA</i>
<i>POSITIVO</i>	0	23
<i>NEGATIVO</i>	40	25
<i>INDETERMINADO</i>	8	0
<i>TOTAL</i>	48	48



- Resultados positivos de PCR anidada de LCR
- Resultados negativos de PCR anidada de LCR

XIII.3 MUESTRAS CULTIVADAS EN MEDIO DE LOWESTEIN-JENSEN.

PACIENTE	48 hr	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
4-24	X	X	X	X	X	X
10-28	X	X	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
12-31	X	X	X	X	X	X
13-33	X	X	X	X	X	X
14-37	X	X	X	X	X	X
15-39	X	X	X	X	X	X
16-42	X	X	X	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
17-46	X	X	X	X	X	X
19-49	X	X	X	X	X	X
20-50	X	X	X	X	X	X
21-51	X	X	X	X	X	X
23-53	X	X	X	X	X	X
26-56	X	X	X	X	X	X
28-59	X	X	X	X	X	X
29-63	X	X	X	X	X	X
31-65	X	X	X	X	X	X
32-66	X	X	X	X	X	X
33-67	X	X	X	X	X	X
36-70	X	X	X	X	X	X
37-71	X	X	X	X	X	X

Considere X resultado negativo

PACIENTE	48 Hr	7 días	15 días	30 días	45 días	60 días
38-72	X	X	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
39-73	X	X	X	X	X	X
40-76	X	X	X	X	X	X
41-77	X	X	X	X	X	X
42-78	X	X	X	X	X	X
43-79	X	X	X	X	X	X
44-80	X	X	X	X	X	X
45-81	X	X	X	X	X	X
46-85	X	X	X	X	X	X
47-86	X	X	X	X	X	X

Considere X resultado negativo

XIII.4 TINCION DE ZIEHL-NEELSEN PARA BAAR

MUESTRA	BAAR
10-28	NEGATIVO
16-42	NEGATIVO
38-72	NEGATIVO
Control positivo de <i>Mycobaterium</i> <i>Tuberculosis</i>	POSITIVO

PCR MULTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

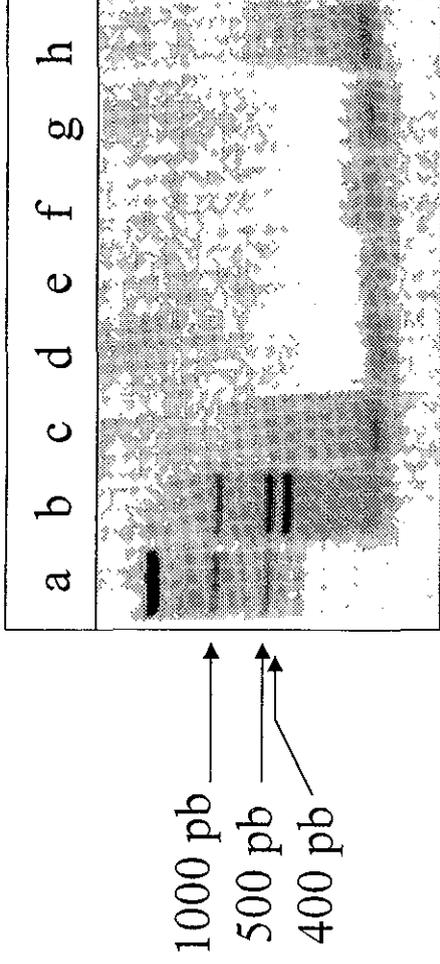


IMAGEN 1 Electroforesis de productos de PCR múltiple, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control Negativo
- d) Paciente 2-03
- e) Paciente 3-11
- f) Paciente 4-12
- g) Paciente 12-31
- h) Paciente 16-42

PCR MULTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

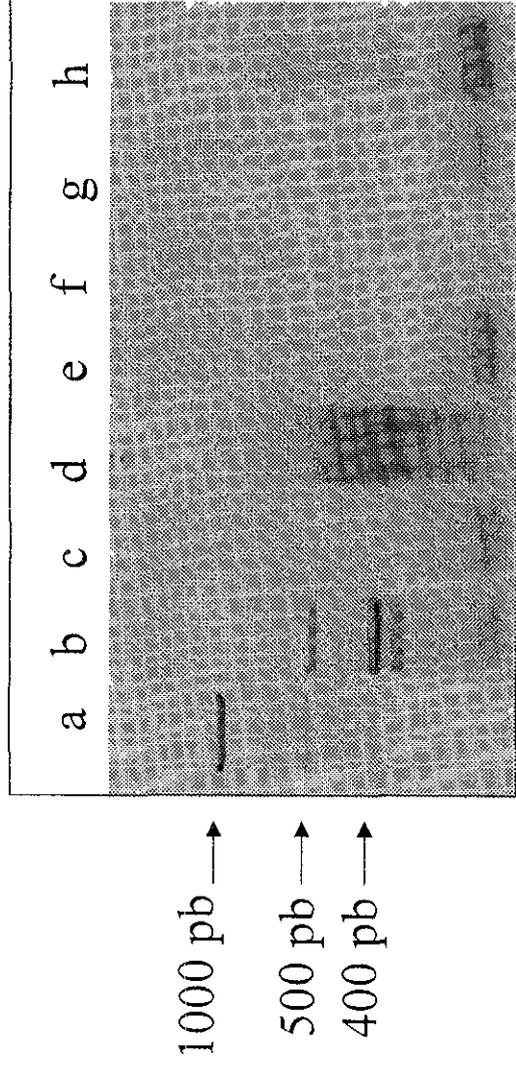


IMAGEN 2 Electroforesis de productos de PCR múltiple, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb) e) Paciente 5-13
- b) Control Positivo f) Paciente 6-22
- c) Control Negativo g) Paciente 7-24
- d) Paciente 1-02 h) Paciente 8-25

PCR MÚLTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

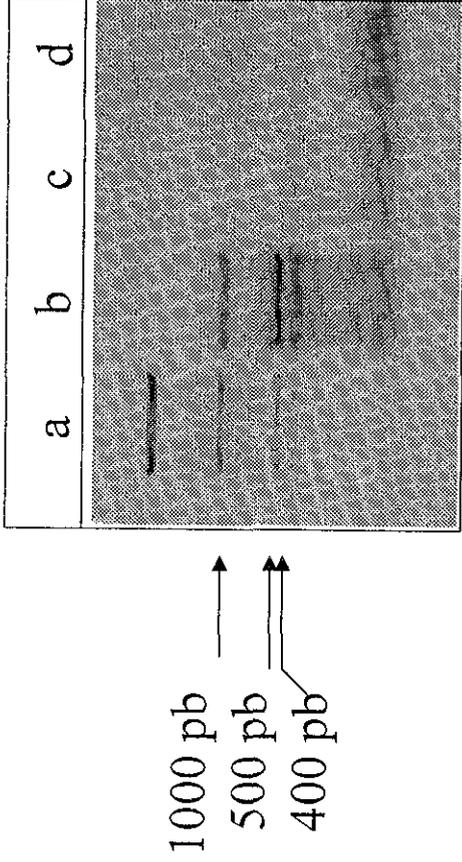


IMAGEN 3 Electroforesis de productos de PCR múltiple, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control Negativo
- d) Paciente 10-28

PCR MULTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

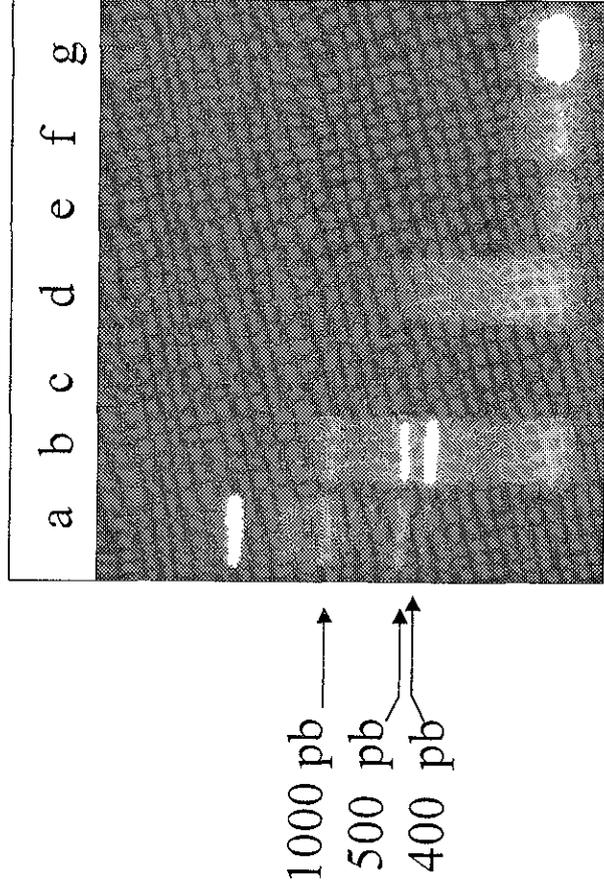


IMAGEN 4 Electroforesis de productos de PCR múltiple, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control Negativo
- d) Paciente 11-30
- e) Paciente 13-33
- f) Paciente 14-37
- g) Paciente 19-49

PCR MÚLTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

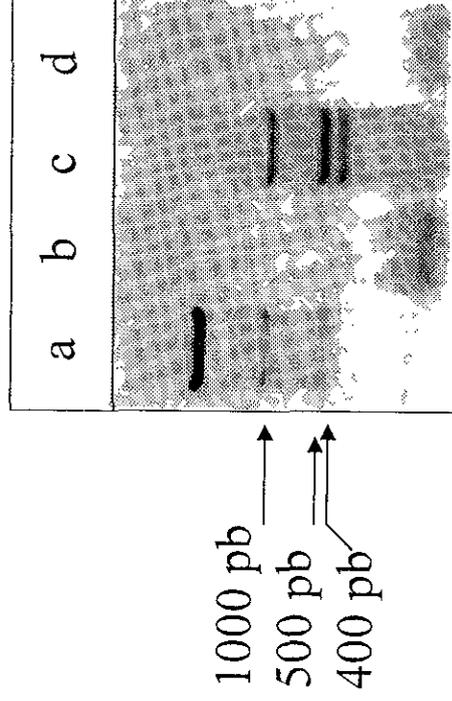


IMAGEN 5 Electroforesis de productos de PCR múltiple, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Negativo
- c) Control Positivo
- d) Paciente 17-46

PCR MULTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON
PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA.

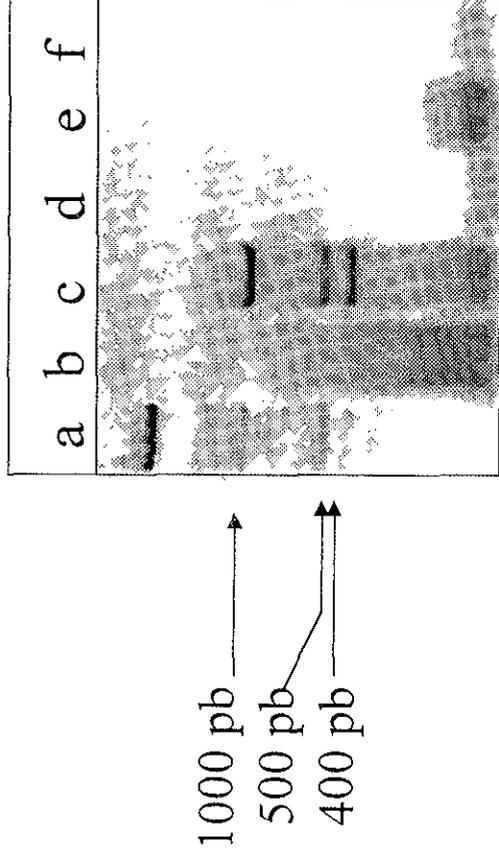


IMAGEN 6 Electroforesis de los productos de PCR múltiple,
en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb) d) Paciente 9-27
b) Control Negativo e) Paciente 15-39
c) Control Positivo f) Paciente 26-56

PCR MULTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

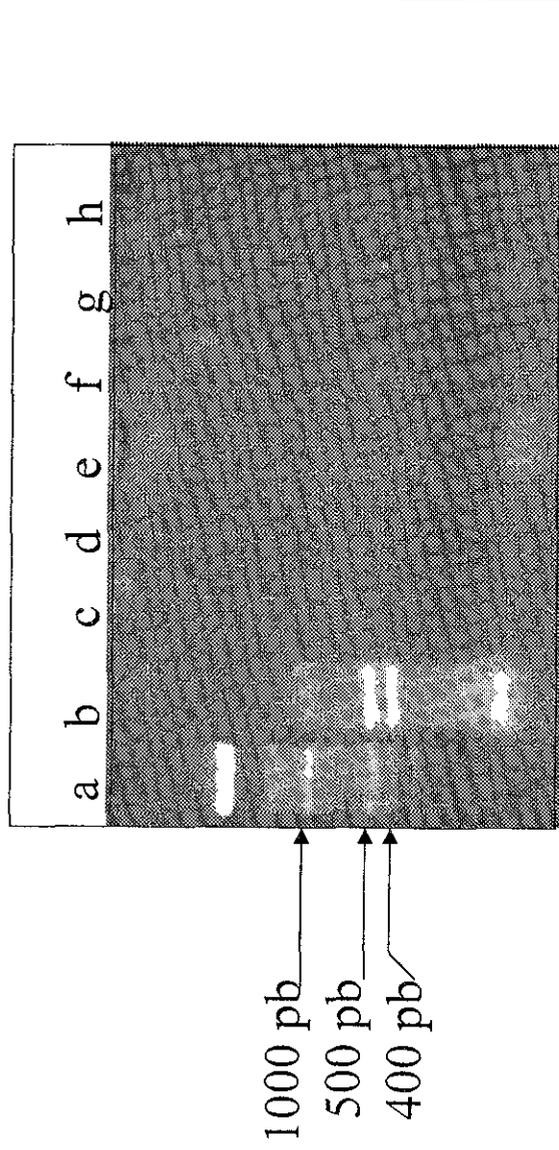


IMAGEN 7 Electroforesis de productos de PCR múltiple, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb) e) Paciente 20-50
- b) Control Positivo f) Paciente 24-54
- c) Control Negativo g) Paciente 27-57
- d) Paciente 18-48 h) Paciente 28-59

PCR MULTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

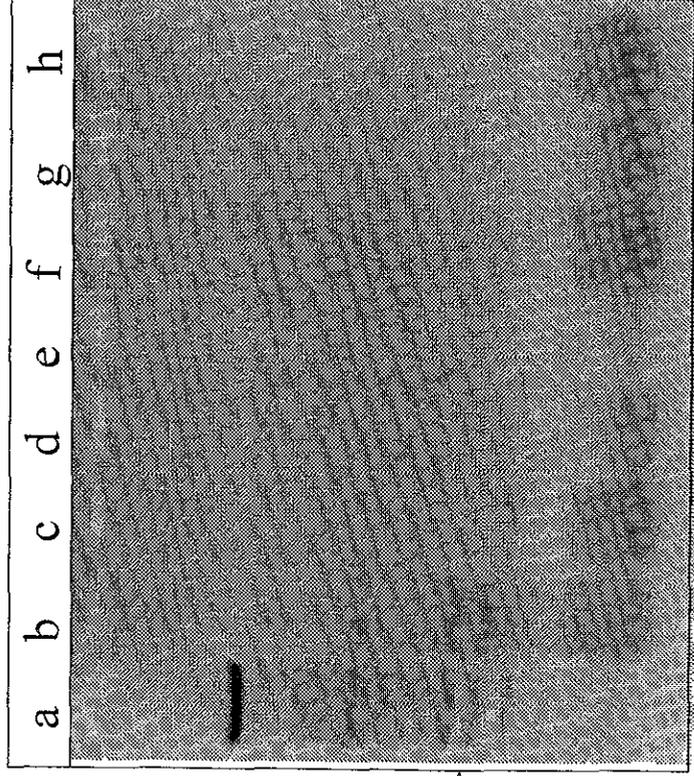


IMAGEN 8
Electroforesis
de productos
de PCR múltiple
en gel de agarosa
al 2%, teñido con
ETBR (0.5ug/ml).

1000 pb
500 pb
400 pb

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control Negativo
- d) Paciente 21-51
- e) Paciente 22-52
- f) Paciente 23-53
- g) Paciente 25-55
- h) Paciente 29-63

PCR MÚLTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

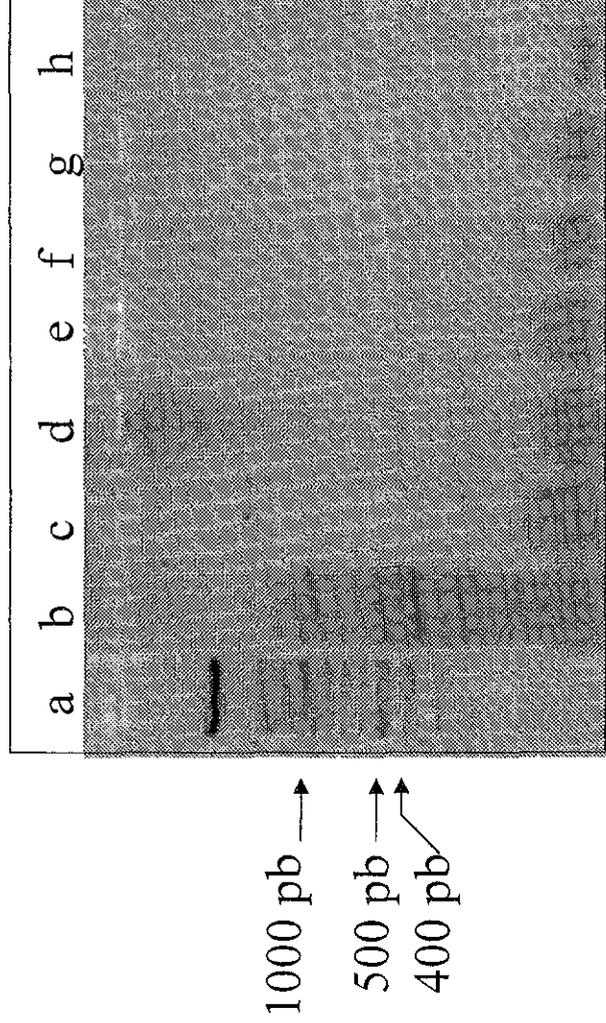


IMAGEN 9 Electroforesis de productos de PCR múltiple , en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control Negativo
- d) Paciente 30-64
- e) Paciente 31-65
- f) Paciente 32-66
- g) Paciente 33-67
- h) Paciente 34-68

PCR MULTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

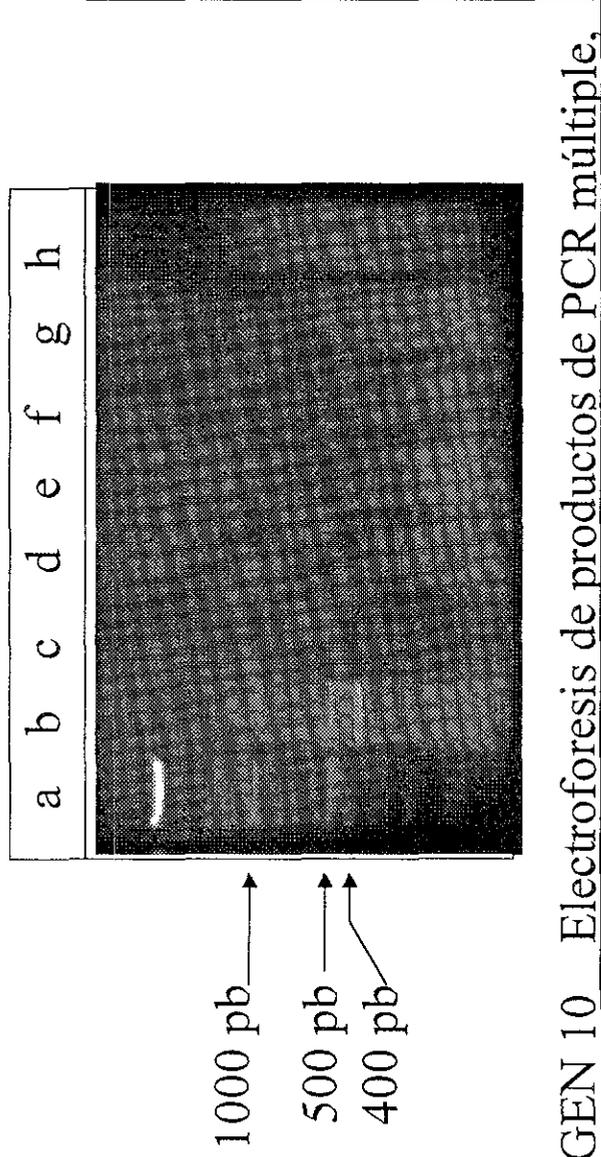


IMAGEN 10 Electroforesis de productos de PCR múltiple,
en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb) e) Paciente 36-70
- b) Control Positivo f) Paciente 37-71
- c) Control negativo g) Paciente 38-72
- d) Paciente 35-69 h) Paciente 39-73

PCR MULTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

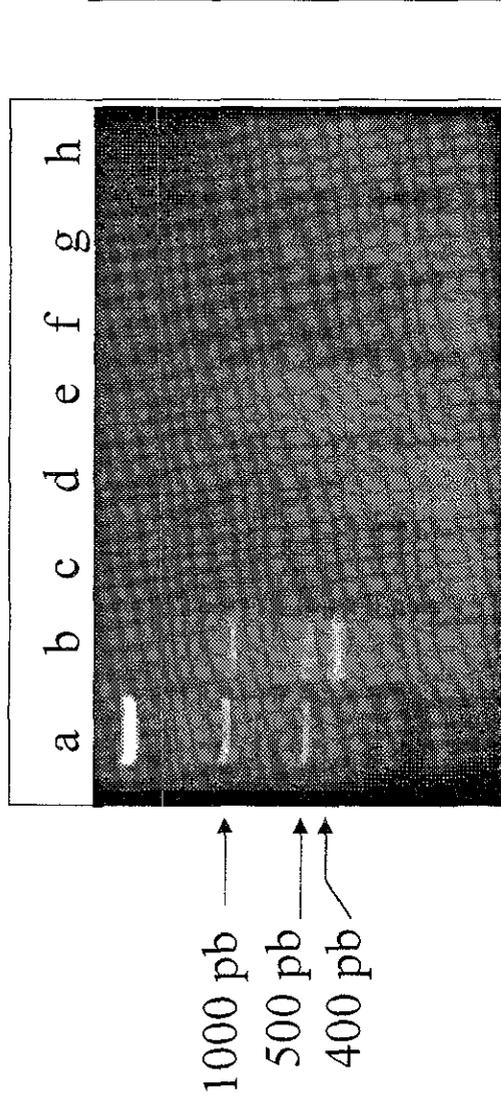


IMAGEN 11 Electroforesis de productos de PCR múltiple, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control Negativo
- d) Paciente 40-76
- e) Paciente 41-77
- f) Paciente 42-78
- g) Paciente 43-79
- h) Paciente 39-73

PCR MÚLTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

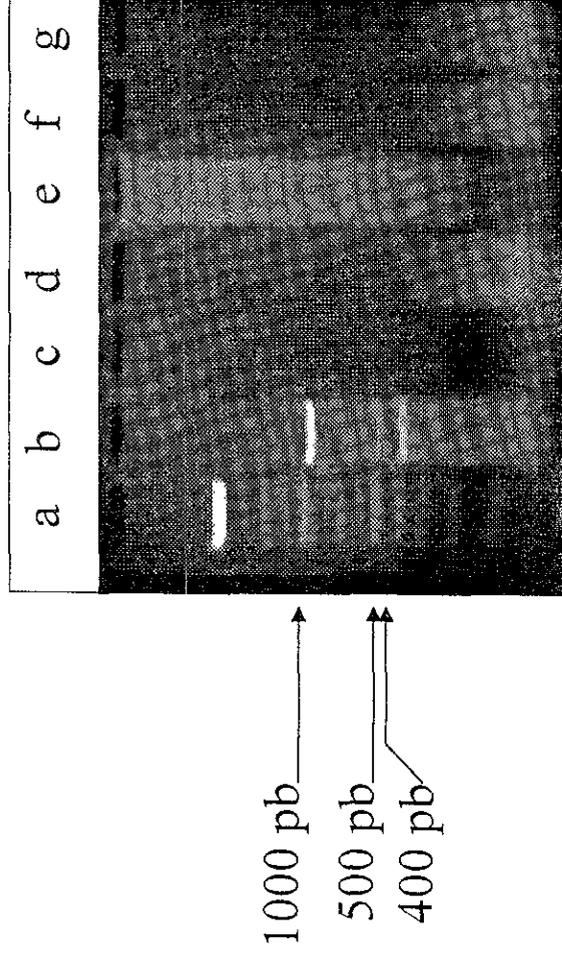


IMAGEN 12 Electroforesis de productos de PCR múltiple,
en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control Negativo
- d) Paciente 44-80
- e) Paciente 45-81
- f) Paciente 46-85
- g) Paciente 47-86

PCR MÚLTIPLE DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

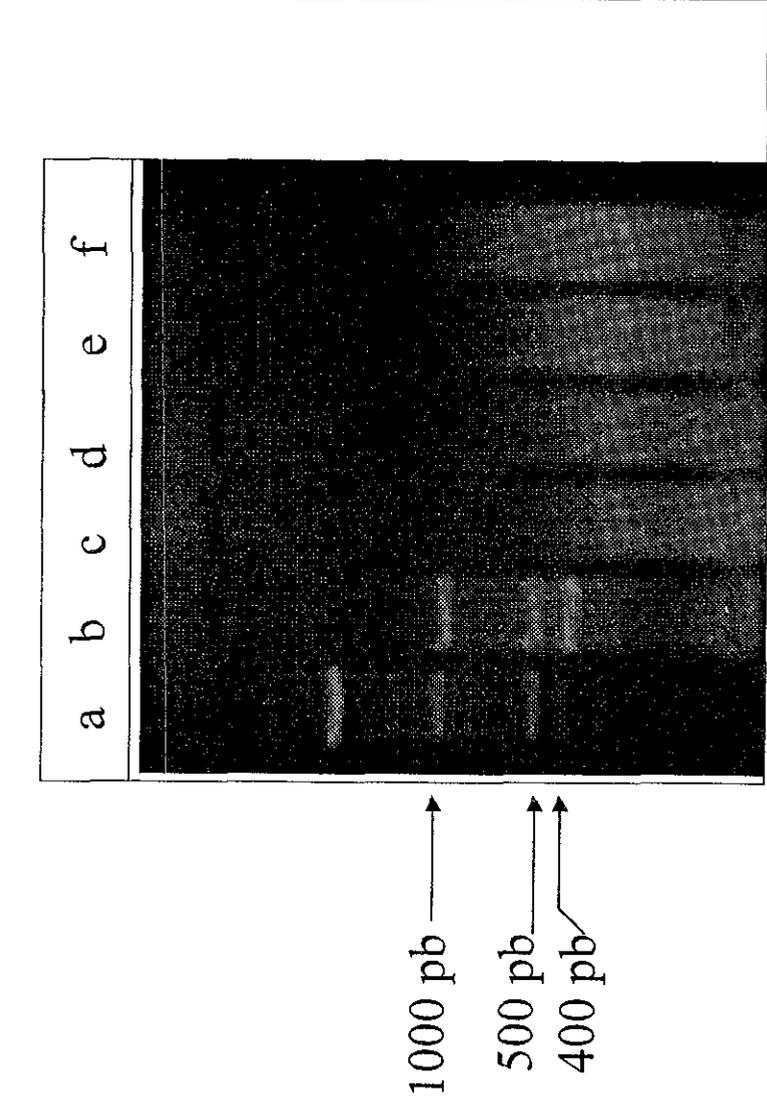


IMAGEN 13 Electroforesis de productos de PCR múltiple, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml)

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control negativo
- d) Paciente 44-80
- e) Paciente 45-81
- f) Paciente 48-87

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

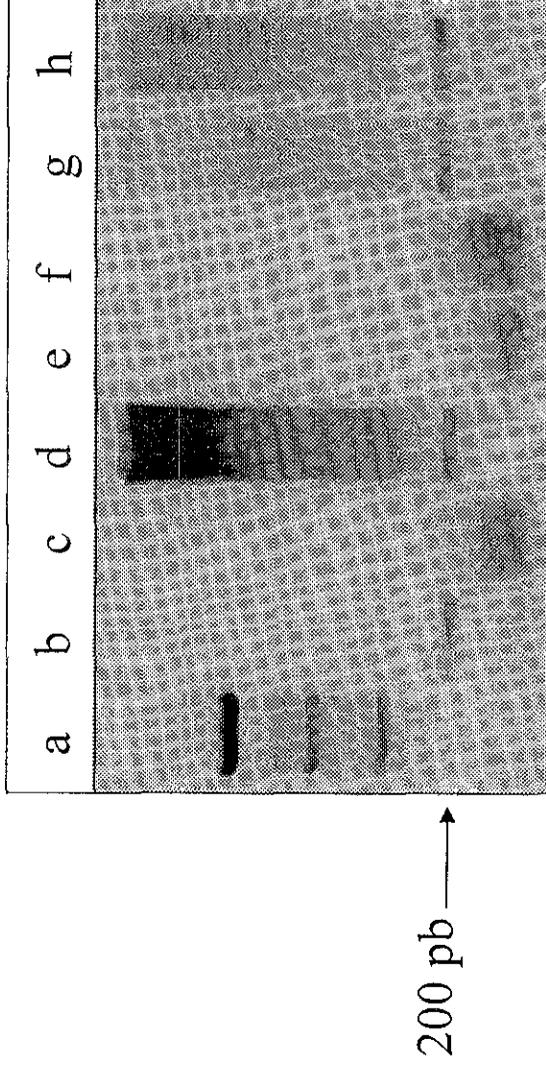
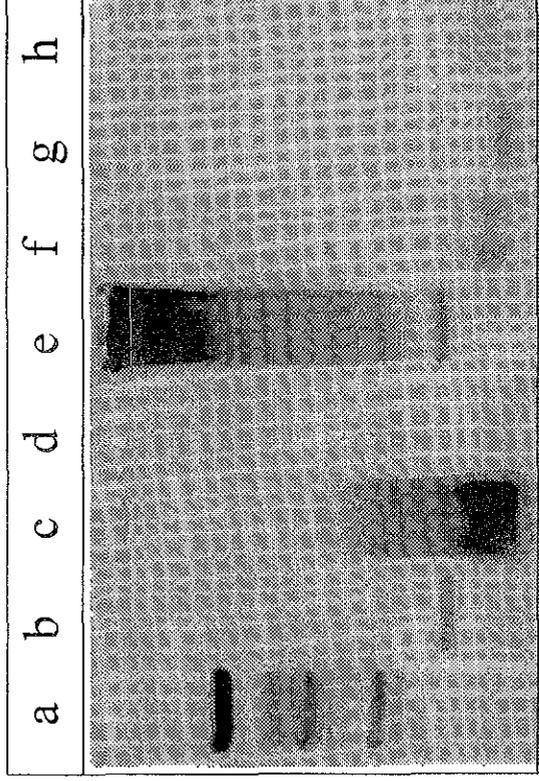


IMAGEN 14 Electroforesis de productos de PCR anidada, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb) e) Paciente 2-03
- b) Control Positivo f) Paciente 3-11
- c) Control Negativo g) Paciente 4-12
- d) Paciente 1-02 h) Paciente 5-13

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



200 pb →

IMAGEN 15 Electroforesis de los productos de PCR anidada, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb) e) Paciente 7-24
- b) Control Positivo f) Paciente 8-25
- c) Control Negativo g) Paciente 10-28
- d) Paciente 6-22 h) Paciente 12-31

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

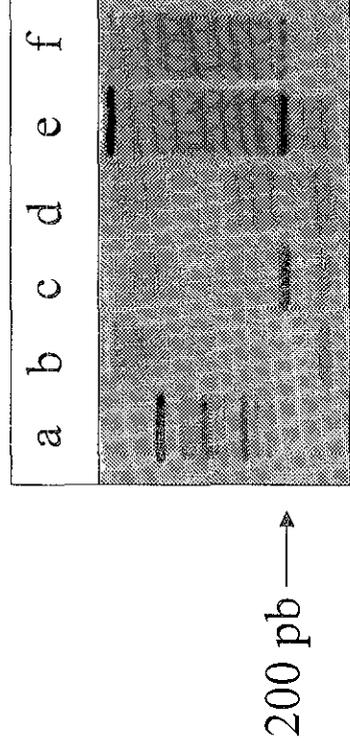


IMAGEN 16 Electroforesis de los productos de PCR anidada en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control negativo
- c) Control Positivo
- d) Paciente 9-27
- e) Paciente 15-39
- f) Paciente 26-56

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS
DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

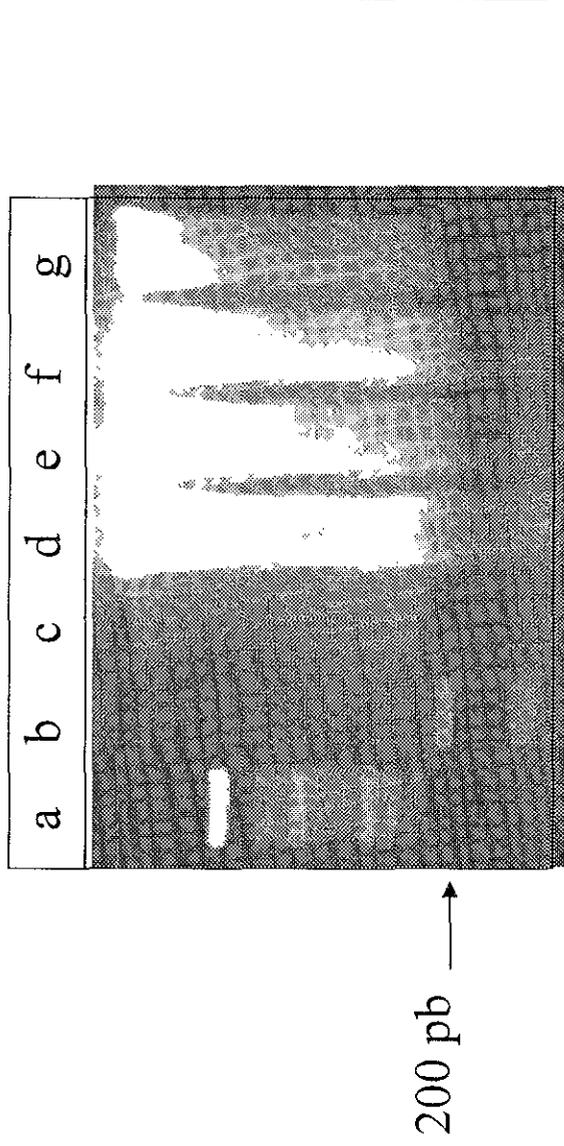


IMAGEN 17 Electroforesis de productos de PCR anidada, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- A) Marcadores Moleculares (100pb) e) Paciente 13-33
- b) Control Positivo f) Paciente 14-37
- c) Control negativo g) Paciente 19-49
- d) Paciente 11-30

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

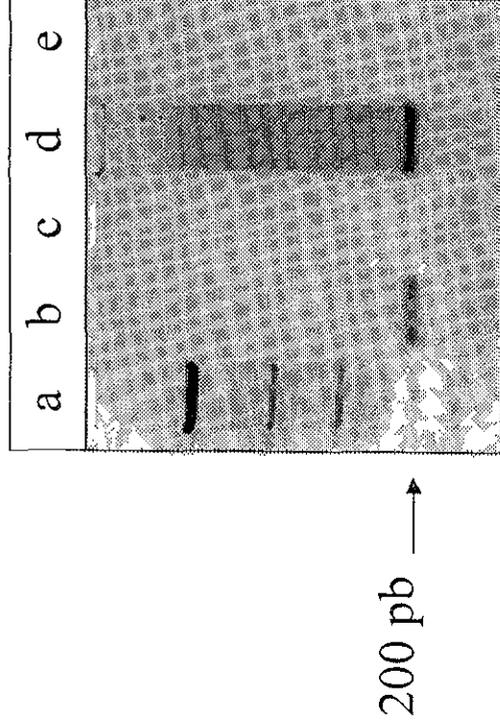


IMAGEN 18 Electroforesis de productos de PCR anidada, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control Negativo
- d) Paciente 16-42
- e) Paciente 17-46

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

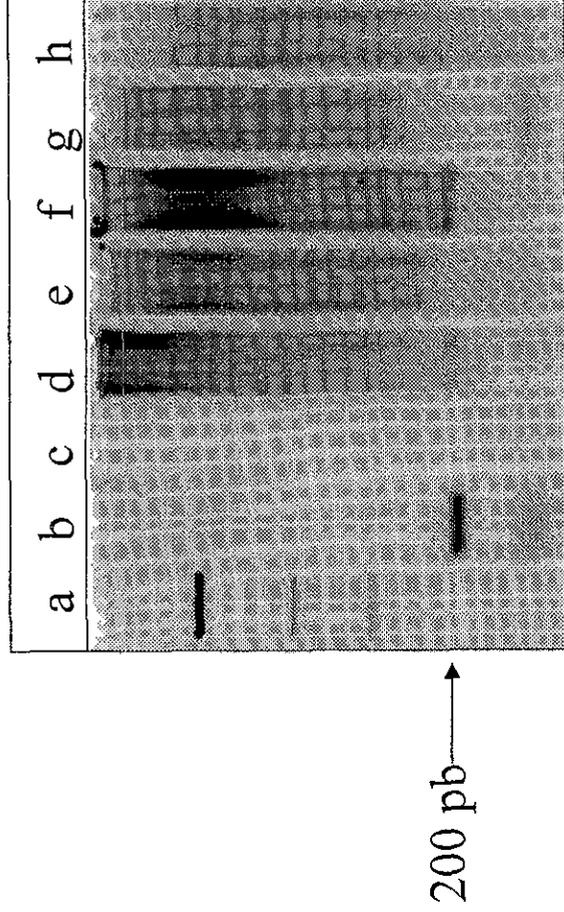


IMAGEN 19 Electroforesis de productos de PCR anidada, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb) e) Paciente 20-50
- b) Control Positivo f) Paciente 24-54
- c) Control Negativo g) Paciente 27-57
- d) Paciente 18-48 h) Paciente 28-59

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

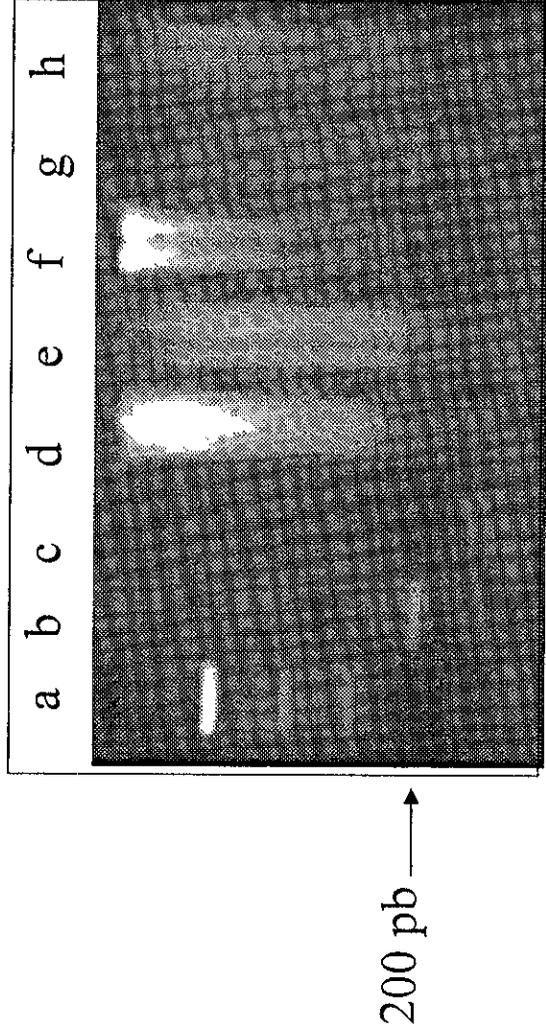


IMAGEN 20 Electroforesis de productos de PCR anidada, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Molecular (100pb) e) Paciente 22-52
- b) Control Positivo f) Paciente 23-53
- c) Control Negativo g) Paciente 25-55
- d) Paciente 21-51 h) Paciente 29-63

PCR ANIDADAESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

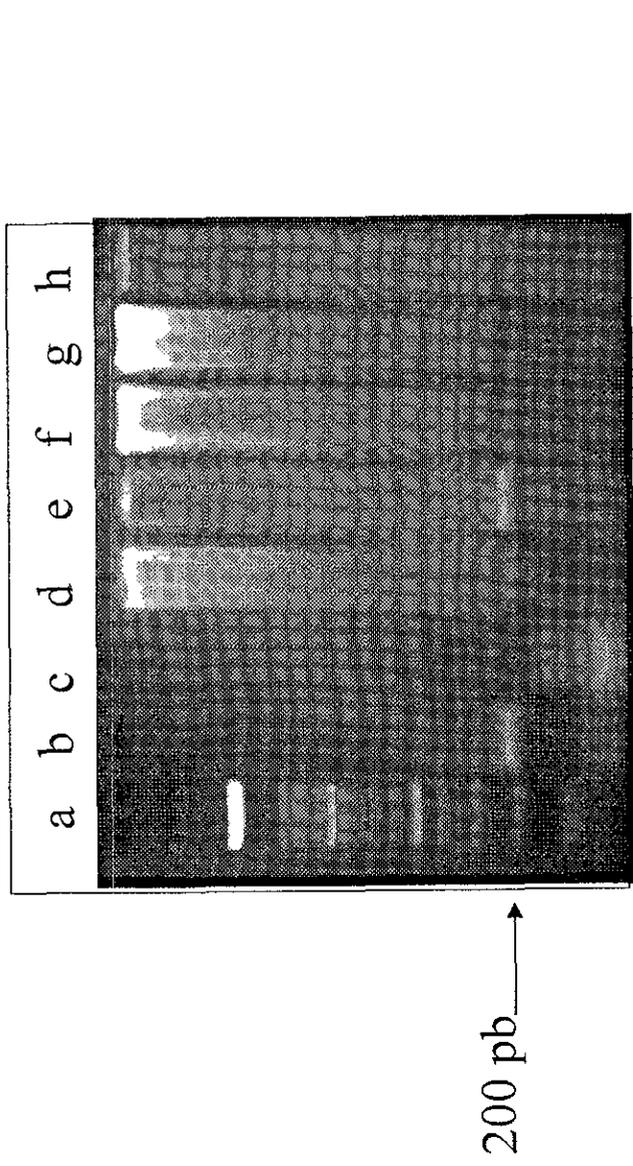
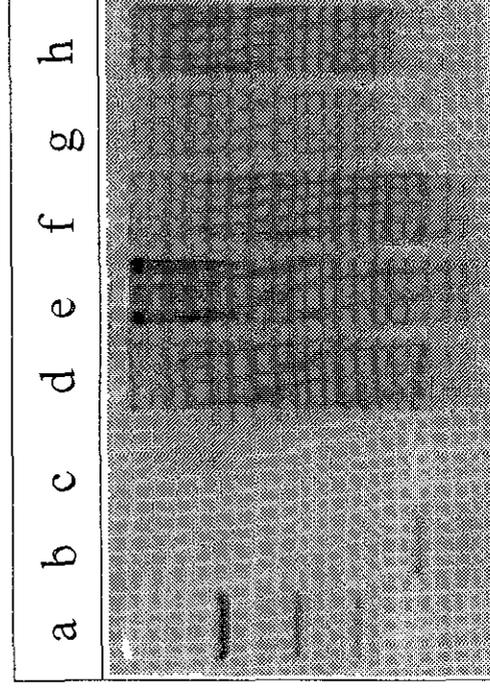


IMAGEN 21 Electroforesis de productos de PCR anidada, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control Negativo
- d) Paciente 30-64
- e) Paciente 31-65
- f) Paciente 32-66
- g) Paciente 33-67
- h) Paciente 34-68

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA



200 pb →

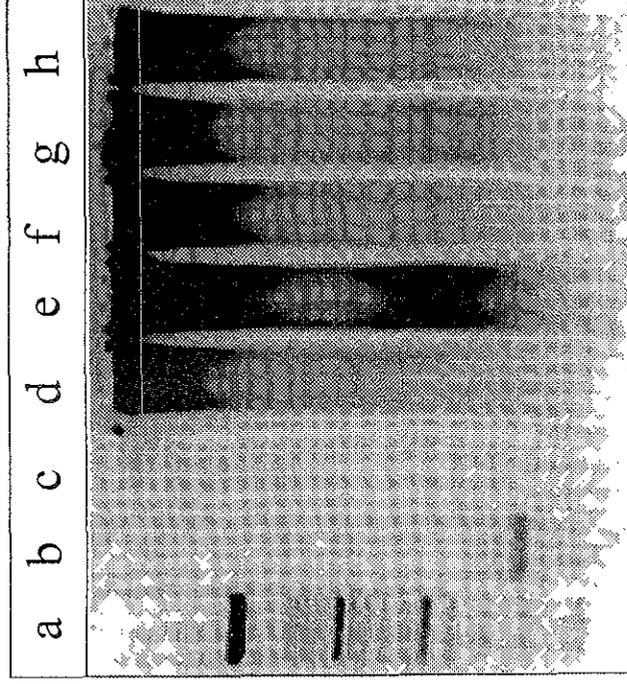
IMAGEN 22 Electroforesis de los productos de PCR anidada, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control Negativo
- d) Paciente 35-69
- e) Paciente 36-70
- f) Paciente 37-71
- g) Paciente 38-72
- h) Paciente 39-73

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

IMAGEN 23 Electroforesis de productos de PCR anidadada, en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

200 pb →



- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control Positivo
- c) Control negativo
- d) Paciente 40-76
- e) paciente 41-77
- f) Paciente 42-78
- g) Paciente 43-79
- h) Paciente 39-73

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE
LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA

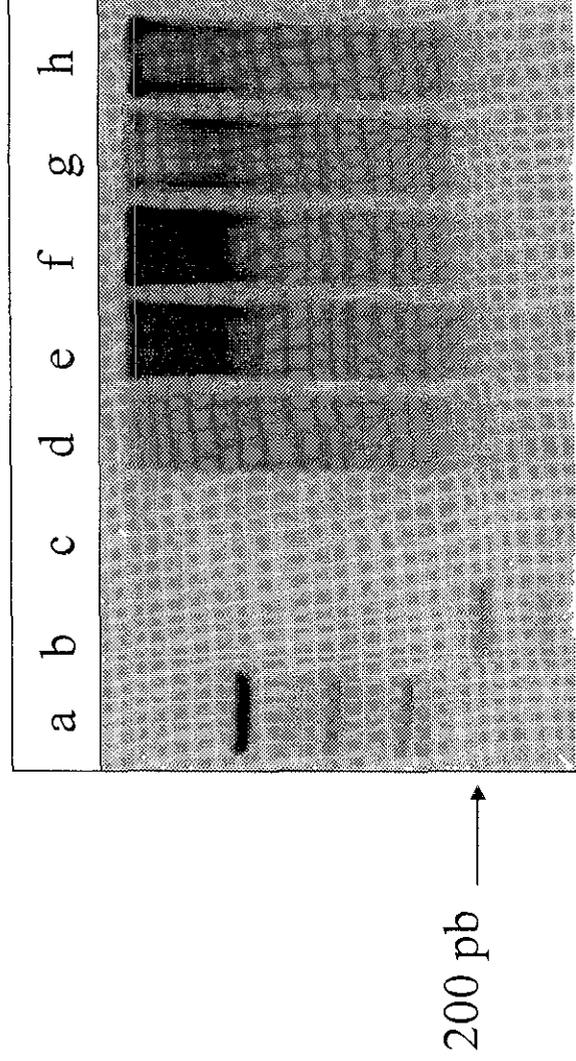
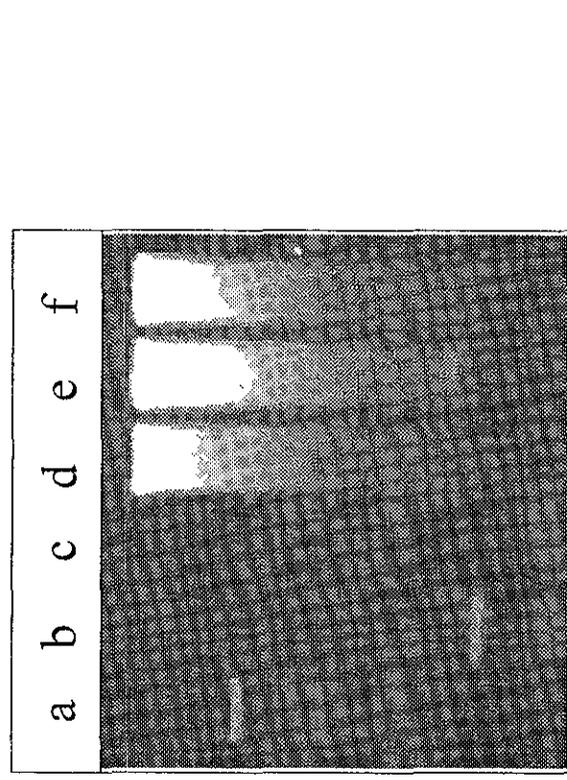


IMAGEN 24 Electroforesis de productos de PCR anidada en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb) e) Paciente 44-80
- b) Control Positivo f) Paciente 45-81
- c) Control Negativo g) Paciente 46-85
- d) Paciente 41-77 h) Paciente 47-86

PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA DE MUESTRAS DE
LCR CON PROBABLE TUBERCULOSIS MENINGEA



200 pb →

IMAGEN 25 Electroforesis de productos de PCR anidada en gel de
agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Control positivo
- c) Control negativo
- d) Paciente 44-80
- e) Paciente 45-81
- f) Paciente 48-87

SENSIBILIDAD DE LA PCR MULTIPLE

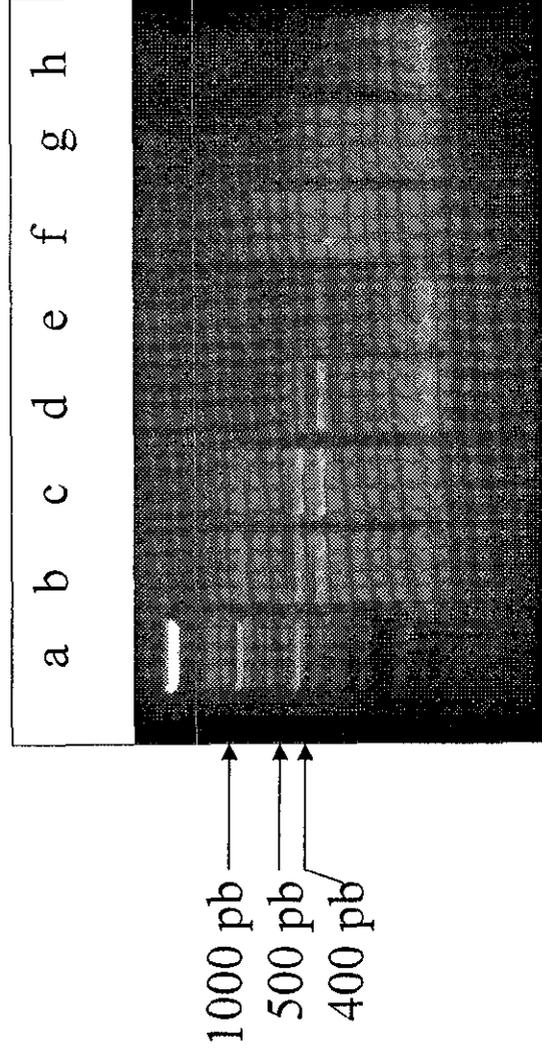


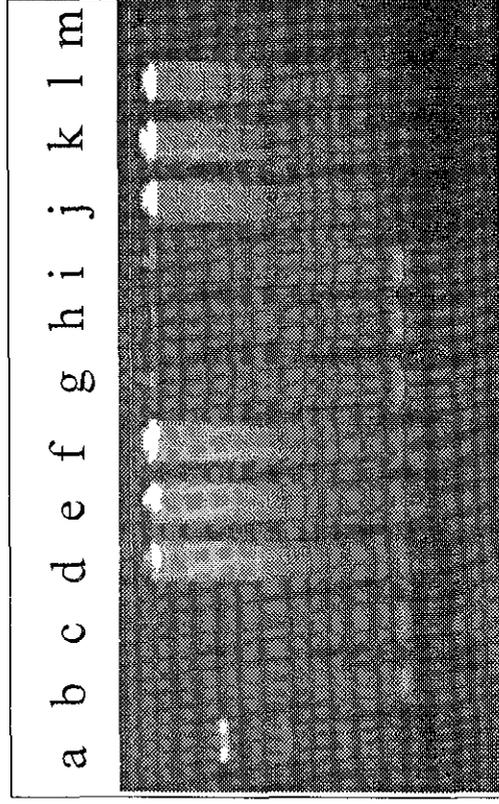
IMAGEN 27 Electroforesis de productos de PCR múltiple en gel de agarosa al 2% teñido con ETBR (0.5ug/ml).

- a) Marcadores Moleculares (100pb) e) 100 pg de ADN de *M. tuberculosis*
b) 100 ng de ADN de *M. tuberculosis* f) 10 pg de ADN de *M. tuberculosis*
c) 10 ng de ADN de *M. tuberculosis* g) 1 pg de ADN de *M. tuberculosis*
d) 1 ng de ADN de *M. tuberculosis* h) Control Negativo

SENSIBILIDAD DE LA PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA

IMAGEN 28

Electroforesis de productos de PCR anidada en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml)



- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) 100 ng de ADN de *M. tuberculosis*
- c) 10 ng de ADN de *M. tuberculosis*
- d) 1 ng de ADN de *M. tuberculosis*
- e) 100 pg de ADN de *M. tuberculosis*
- f) 10 pg de ADN de *M. tuberculosis*
- g) 1 pg de ADN de *M. tuberculosis*
- h) 100 fg de ADN de *M. tuberculosis*

- I) 10 fg de ADN de *M. tuberculosis*
- j) 1 fg de ADN de *M. tuberculosis*
- k) 100 ag de ADN de *M. tuberculosis*
- l) 10 ag de ADN de *M. tuberculosis*
- m) Control Negativo

XIII.7 SENSIBILIDAD EN PCR MULTIPLE

Cantidad mínima de ADN de <i>M. Tuberculosis</i> , para lograr amplificación.	Amplificación de la secuencia de inserción IS6110	Amplificación del antígeno alfa	Amplificación del gen <i>mtp 40</i>	Número teórico de micobacterias (3,41-43)
10ng	Si	Si	Si	2 000 000
1ng	No	Si	Si	200 000
0.1ng	No	No	Si	20 000

XIII.8 SENSIBILIDAD DE LA PCR ANIDADA

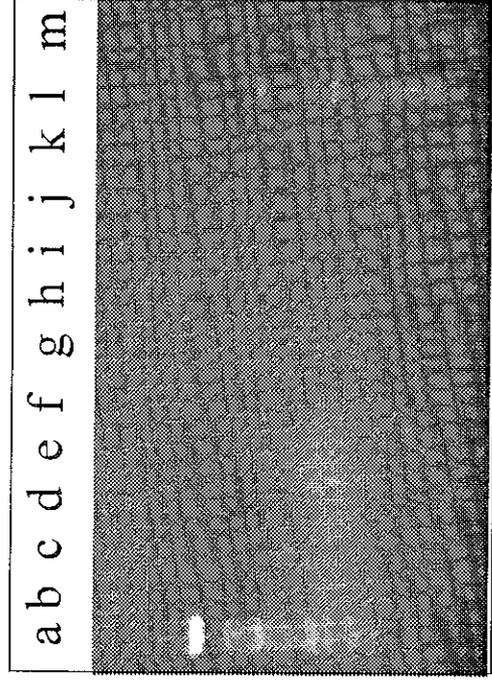
Cantidad mínima de ADN de <i>M. Tuberculosis</i> , para lograr amplificación	Amplificación interna del gen <i>mtp 40</i>	Número teórico de micobacterias (3,41-43)
0.01pg	Si	2

XIII.9 ESPECIFICIDAD PARA PCR MULTIPLE Y PCR ANIDADA

Se analizaron 10 muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo de pacientes con diagnóstico confirmado de otra etiología diferente a tuberculosis meningea, sometiéndolas a la prueba de PCR múltiple y posteriormente a PCR anidada, obteniéndose los siguientes resultados:

PACIENTE	DIAGNOSTICO CLINICO	PCR MULTIPLE	PCR ANIDADA
L-01	Neurocisticercosis Subaracnoidea y del IV ventrículo	Negativo	Negativo
L-02	Astrocitoma	Negativo	Negativo
L-03	Meningioma del tentorio	Negativo	Negativo
L-04	Aneurisma de Arteria Concomitante Posterior	Negativo	Negativo
L-05	Hidrocefalia	Negativo	Negativo
L-06	Meningioma del tentorio	Negativo	Negativo
L-07	Neurocisticercosis del IV ventrículo	Negativo	Negativo
L-08	Neurocisticercosis del IV ventrículo	Negativo	Negativo
L-09	Hemorragia Subaracnoidea	Negativo	Negativo
L-10	Meningioma del tentorio	Negativo	Negativo

ESPECIFICIDAD DE LA PCR MULTIPLE PARA MUESTRAS DE LCR



1000 pb →
 500 pb →
 400 pb →

IMAGEN
29. Electroforesis de productos de PCR múltiple en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5 ug/ml)

- a) Marcadores Moleculares (100pb)
- b) Paciente L-01
- c) Paciente L-02
- d) Paciente L-03
- e) Paciente L-04
- f) Paciente L-05
- g) Paciente L-06
- h) Paciente L-07
- i) Paciente L-08
- j) Paciente L-09
- k) Paciente L-10
- l) Control Positivo
- m) Control Negativo

ESPECIFICIDAD DE LA PCR ANIDADADA ESPECIE ESPECIFICA
PARA MUESTRAS DE LCR.

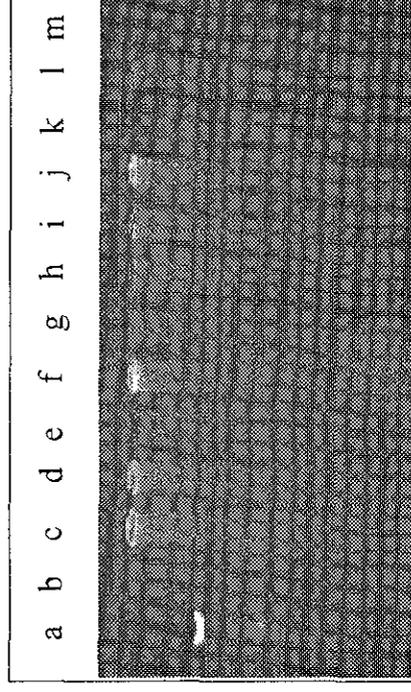


IMAGEN 30 Electroforesis de productos de PCR anidada en gel de agarosa al 2%, teñido con ETBR (0.5ug/ml)

- | | |
|-----------------------------------|---------------------|
| a) Marcadores Moleculares (100pb) | j) Paciente L-08 |
| b) Control Positivo | f) Paciente L-04 |
| c) Paciente L-01 | g) Paciente L-05 |
| d) Paciente L-02 | h) Paciente L-06 |
| e) Paciente L-03 | l) Paciente L-07 |
| | k) Paciente L-09 |
| | m) Control Negativo |

XIV. DISCUSION DE RESULTADOS

Se lograron establecer los parámetros de tiempos, concentraciones y temperaturas de las reacciones de amplificación tanto para la PCR múltiple como para la PCR anidada, cabe mencionar que bajo tales condiciones se obtuvieron los mejores resultados de amplificación para ambas metodologías.

La PCR múltiple aplicada en éste estudio permitió la amplificación simultánea del gen *mtp 40* especie-específico de *M. tuberculosis*, del elemento de inserción IS6110 y del gen del antígeno alfa, con bandas de longitudes de 396 pb, 984 pb y 506 pb respectivamente, en una cepa tipo de *Mycobacterium tuberculosis* aislada de pulmón humano, utilizada como control positivo a lo largo de este estudio. Por lo que en una sola determinación puede identificarse a *Mycobacterium tuberculosis* y distinguirse de *Mycobacterium bovis* y de otras micobacterias no tuberculosas, dado que el gen que codifica para la proteína denominada *mtp 40* solamente se encuentra en *M. tuberculosis* y no en otras especies de micobacterias.

Se procesaron en el estudio 48 especímenes clínicos de líquido cefalorraquídeo, de pacientes independientes, que tenían altas probabilidades de presentar tuberculosis meníngea.

Mediante la prueba de PCR múltiple se esperaba identificar cualquier micobacteria que estuviese presente en los especímenes clínicos de tales líquidos cefalorraquídeos procesados en este estudio, sin embargo no fue así, dado que se obtuvieron resultados indeterminados para 8 pacientes y negativos para 40, por lo que fue necesario utilizar adicionalmente la PCR anidada en los 48 casos. Dado que ésta última incrementó la

sensibilidad del sistema PCR múltiple fue posible encontrar en 23 LCR la presencia de ADN de *Mycobacterium tuberculosis*.

Tal incremento en la sensibilidad del sistema PCR múltiple mediante la PCR anidada fue indispensable, dado que se considera que en especímenes clínicos de tipo extrapulmonar, tales como el líquido cefalorraquídeo, los bacilos generalmente están en escasas cantidades o bien no se encuentran, de acuerdo con lo publicado por algunos autores (26,27,41)

El límite de detección en éste estudio para la prueba PCR múltiple fue de 100 pg de ADN de *M. tuberculosis*, mientras que la sensibilidad de la PCR anidada fue mayor, dado que hubo amplificación hasta en 10 fg de ADN de *M. tuberculosis*, lo cual correspondería teóricamente a 2 micobacterias, de acuerdo con lo publicado por algunos autores (3,42,43,44) A diferencia de 1pg de ADN encontrado para PCR por Del Portillo y col (45)

Con lo anterior se demostró la alta sensibilidad de la prueba PCR anidada.

Para conocer la especificidad del sistema PCR múltiple, se procesaron 10 especímenes clínicos de LCR, cuyo diagnóstico había sido previamente realizado, reportando etiologías diferentes a micobacterias. Los resultados fueron negativos para los 10 casos.

Posterior a ello se sometieron las 10 muestras previamente amplificadas por PCR múltiple a la prueba PCR anidada, obteniéndose resultados negativos para los 10 casos.

Con esto se confirmó la alta especificidad (100%) de las pruebas de PCR múltiple y PCR anidada.

De los 48 especímenes clínicos de LCR se sembraron 30 de ellos en medio de Lowenstein-Jensen y después de 15 días de incubación hubo crecimiento en la muestra 16-42, y después de 30 días de incubación hubo crecimiento en las muestras 10-28 y

38-72, cabe mencionar que dichas muestras habían revelado resultados positivos por la prueba de PCR anidada.

Posteriormente se realizó la tinción de Ziehl-Neelsen para identificar bacilos ácido-alcohol-resistentes en esos tres cultivos, sin embargo no fue posible, sólo se encontraron cocos y bacilos muy pequeños que no presentaban la característica de ser ácido-alcohol-resistentes.

Por tanto se considera que el aislamiento de la micobacteria no se logró probablemente porque el número de micobacterias presentes en LCR fue escaso y sumando a ello la baja sensibilidad que tienen tales metodologías, de acuerdo con lo publicado por algunos autores y finalmente aunando la posibilidad de la incapacidad de las pocas micobacterias para no adecuarse al medio, provocó la falta de crecimiento

Finalmente para tener mayor confiabilidad de la técnica de tinción que se estaba utilizando, se hizo una tinción de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* utilizada como control positivo a lo largo de este estudio, revelando bacilos ácido-alcohol-resistentes, por lo tanto se consideran confiables los resultados obtenidos de la tinción de Ziehl-Neelsen de los tres cultivos en cuestión

XV. CONCLUSIONES

Se logró establecer una metodología de PCR múltiple cuya rapidez y especificidad juegan papeles importantes en la oportunidad y confiabilidad de los resultados para ayudar en el diagnóstico de la tuberculosis meníngea

Así mismo, se logró establecer una metodología de PCR anidada especie-específica, para la identificación del ADN de *M. tuberculosis* en especímenes clínicos de LCR, incrementándose notablemente la sensibilidad del sistema de PCR. Por tanto, se logró la implementación de un sistema de Biología Molecular que consta de PCR múltiple y PCR anidada especie-específica para *M. tuberculosis*, cuyos parámetros de rapidez y especificidad permiten obtener resultados oportunos y confiables que pueden ayudar en el diagnóstico de la tuberculosis meníngea, y en particular la sensibilidad de la PCR anidada especie-específica que es bastante aceptable

Se logró la comparación de los resultados obtenidos por Biología Molecular de 30 especímenes clínicos de LCR, con los obtenidos por cultivo en medio de Lowestein-Jensen, así como por tinción de Ziehl-Neelsen para bacilos ácido-alcohol-resistentes para aquellos casos en los que hubo crecimiento en dicho medio

Dando como conclusión de ello, que por los métodos tradicionales no fue posible detectar a *Mycobacterium tuberculosis* en LCR al menos en este estudio, sin embargo mediante el sistema de Biología Molecular que se aplicó en este proyecto, fue posible identificar tal bacteria en 23 de los 48 casos estudiados, consumiendo un tiempo de 3 días aproximadamente el análisis de un paciente.

XVI. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

Se considera que la metodología utilizada en este estudio está diseñada no solamente para aplicarse en el diagnóstico de tuberculosis meningea, es decir trabajando con muestras clínicas de líquido cefalorraquídeo, sino que podría aplicarse a cualquier otro tipo de tuberculosis extrapulmonar dado que todas ellas son consideradas de difícil diagnóstico, como puede ser la renal, pleural, miliar, cutanea, etc.

Para lograr resultados confiables en el diagnóstico de tales casos de tuberculosis, es necesario aplicar tratamientos adecuados a las muestras biológicas, previo al aislamiento del ADN, para así lograr obtener ADN de una pureza aceptable y que finalmente pueda someterse a amplificación por PCR múltiple y PCR anidada

Aún cuando existen algunos métodos sencillos y otros relativamente rápidos para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, mismos que son aplicables a la fecha en la gran mayoría de los laboratorios de rutina, estos no ofrecen la sensibilidad y especificidad requeridas, afectando el control y cuidado de los pacientes con tuberculosis. Por tanto las muestras de esputo podrían recibir tratamientos previos al aislamiento del ADN, logrando su descontaminación y permitiendo obtener resultados más confiables y en menor tiempo, a través de metodologías de Biología Molecular

Sin duda alguna, sería un gran avance el lograr tener laboratorios de rutina con metodologías de Biología Molecular, como la descrita en este trabajo, para el diagnóstico de la tuberculosis tanto extrapulmonar como pulmonar, sin embargo se sabe que hasta el momento y por lo menos dentro de algunos años no podrá ser posible realizarlo, debido a la infraestructura y capacitación que ello implica

XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - Escobar Gutiérrez. A. Valdespino Gómez J.L. Sepúlveda Amor J. Vacunas, ciencia y salud México: Secretaría de Salud,1992 187-200.
- 2 - Sjobring, V. Mecklenburg, M. Andersen, B Miorner, H Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* J Clin. Microbiol 1990,28,2200-2204.
- 3 - Scarpellini, P Racca, S Cinque P y col Nested polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring treatment response in AIDS patients with tuberculous meningitis AIDS.1995, 9 895-900
- 4 -Butler, W R Jost, K C and Kilburn, J O Identification of micobacteria by high performance liquid chromatography. J. Clin. Microbio. 1991,29 2468-2472.
- 5 -Larsson, L Odham, G Westdahl, G and Olsson, B. Diagnosis of pulmonar tuberculosis by selected ion monitoring: improved analysis of tuberculostearate in sputum using negative ion mass spectrometry J Clin. Microbiol. 1987,25:893-896.

6 -Rouse, D A Morric, S.L Karpas, A B Probst, P.G and Chaparras, S.D. Production, characterization and species specificity of monoclonal antibodies to *Mycobacterium avium* complex protein antigens Infect.Immun. 1990;58:1445-1449

7 -Verstijnen, C.P. Schonigh, H.J.R. Kuijper, S and Bruins, J Rapid identification of cultured *Mycobacterium tuberculosis* with a panel of monoclonal antibodies in western blot and immunoflorescences. Res. Microbiol 1989;140:653-666

8 -Anargyros, P. Astill, D.S J and Lim, I.S.L. Comparison of improved BACTEC and lowstein-jensen media for culture of micobacteria from clinical isolates. J.Clin Microbiol 1990, 28:2906-2908.

9 -Kiriara, J.M Hillier, S L. and Coyle, M B Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with BACTEC radiometric systems J Clin Microbiol 1985;22:841-845

10 -Otal, Y Martin, C Vincent-Levy-Frebault, V. Thierry, D. and Cicquel, B Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological mark tuberculosis. J. Clin. Microbiol 1991;29:1252-1254

11.-Ellner, P.H. Kiehn, T.E Cammarata, R and Hosmer, M Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. J.Clin. Microbiol 1988;31:1349-1352.

12. Evans, K.D. Nakasone, A S. Sutherland, P A Maza, D M and Peterson, E.M Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-M intracellulare directly from primary BACTEC cultures by using acridinium-ester-labeled DNA probes J Clin.Microbiol.1992;30.2427-2431

13 -Lebrun, L. Espinasse, F. Poveda, J D and Vincent-Levy-Frebault, V Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of *Mycobacterium*. J Clin Microbiol 1992;31.2476-2478

14 - Kolk, A Shuitema, A Kuijper,, S and col. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system J Clin.Microbiol.1992;30 2567-2575

15 - Soini, H Skurnik, M. Liippo, K Tala, E. and Viljanen, M. Detection and identification of micobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32 kilodalton protein J Clin. Microbiol 1992;30.2025-2028

16 -Hance, A J Grandchamp, B Levy-Frebault, V. and col Detection and identification of micobacteria by amplification of micobacterial DNA Mol.Microbiol. 1989,7:843-849.

17 -Kox, L F F Jansen, H.M Kuijper, S and Kolk, A H.J Multiplex PCR assay for immediate identification of the infecting species in patients with micobacteria disease J.Clin. Microbiol 1997;35.1492-1498

18 -Hermans, P.W.M Schuitema, A.R.J. Soolingen, D.V. and col. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol.1990;28 1204-1213

19 - Herrera,, E.A and Segovia, M Evaluation of *mtp 40* genomic fragment amplification for specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimen J Clin.Microbiol 1996;34 1108-1113

20 - Portillo, P D Murillo, L.A. and Patarroyo, M E Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and it's posible use in diagnosis J Clin Microbiol.1991,29:2163-2168.

21 -Balandrano, C.S. Anzaldo, F G Peña F.G., Betancourt, M X Tuberculosis Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR 1996,18 13-52

22 - Villa, S J C Esquivel, I E and López, R Tuberculosis una Luna menguante. *Ciencia Médica* 1995;1 10-45.

23 - Brisson, A. Nguyen, S. Bonete, R. and col. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation *The Lancet*. 1991;338:364-366.

24 - Kaneko, K Onodera, O. Miyatake, T. and Tsuji S Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction (PCR) *Neurology*. 1990; 40: 1617-1618

25.- Shankar, P Manjunath, N Mahan, K. Prasad, K. Behar, M. Ahuja G Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction *Lancet*. 1991,337 5-7

26 - Lee, B W. Tan, J A M.A. Wong, S C and col. DNA amplification by the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Comparison of protocols involving three mycobacterial DNA sequences IS6110, 65 Kda antigen, and MPB64. *J. Neurol Scien*. 1994,123.173-179.

27 - Folgueira, L. Delgado, R Palenque, E. Noriega, A R Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis in AIDS patients. *Neurol* 1994,44.1336-1338

- 28.- Nguyen, L.N. Kox L.F.F Pham, L.D. Kolk A.H. The potential contribution to the diagnosis of tuberculous meningitis. Arch. Neurol 1996;53:771-776
- 29.- Pfyffer, G.E. Kissling, P. Jahh, E M Welscher, H. Salfinger, M. Weber, R Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory and respiratory specimens. J.Clin. Microbiol. 1996;34:834-841.
- 30 - Adams R.D. Maurice V. 1989. Principles of neurology. 4th Ed New York. 570-572
- 31.-Bej, A.K. Mahubani, M.H Atlas, R M Amplification of Nucleic Acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. C Rev. bioche. Mol. Biol. 1991;26:301-334.
- 32.- Horikoshi, T Danenberg, T.H.W. Stadlbauer, and col. Quantitation of thymidylate synthetase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using PCR. Cancer Research. 1992;52:108-116
- 33.- Kidd et al. 1995. Optimización en PCR capítulo 1. In PCR 2 A practical approach. (ed M.J McPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor.), pp 1-21 Oxford University Press; Great Britain

34.- Dieffenbach, C.W and Dueksler, G.S. PCR primer a laboratory manual. pp 17-21. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1995.

35.- Zimmermann, K. and Mannhalter, J.W. Review technical aspects of quantitative competitive PCR biotechniques 1996;21:268-279

36 -Kox, L F.F Rhienthong,, D. Medo, A. and col. Amore reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J.Clin Microbiol. 1994,32 672-678

37 - Morton R F Bioestadística y epidemiología. México McGraw-Hill 1990

38.-Choomazynski, P and Sacchi, N Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analy.Bioch 1987, 162: 156-159

39 -Chomezynsky, P A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotech 1993, 15 532-537

40.-Sambrook, J Fritsch, F. and Maniatis, T. 1989 Molecular cloning A laboratory manual, 2nd. Edition Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New Yprk

41.- Mazurek, G. H. Reddy, V. Murphy, D and Ansari, T. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in cerebrospinal fluid following immunomagnetic enrichment J. Clin Microbiol. 1996, 34. 450-453.

42.- Gori, A Franzetti, F. Marchetti, G Catozzi, L Corbellino, M Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by *mtp 40* Nested PCR J.Clin Microbiol.1996,34 2866-2867

43.- Hermans, W M Schutema, R J. Soolingen, D.V. and col. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction J Clin. Microbiol 1990;28 1204-1213

44.- Miyazaki, Y Koga, H. Hohno S and Kaku M. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clin Microbiol 1993, 31:2228-2232

45 - Portillo, D.P Thomas, C.M Martínez, E and col. Multiprimer PCR system for differential identification of mycobacteria in clinical samples. J Clin Microbiol 1996,34:324-328