

5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN rpoB DE Mycobacterium tuberculosis CON EL MÉTODO DE POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA COMBINADO CON LA REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR-SSCP)

2083 T

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUÍMICA FARMACEUTICA BIÓLOGA PRESENTA: CATALINA ARENAS HUERTERO



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA



MÉXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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


Jurado Asignado

Presidente **MARIA DEL CARMEN CORTES DEQUIR**
Vocal **MAITE ASTIGARRAGA ZAVALA**
Secretario **JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE**
1er sup. **MIREYA RODRIGUEZ PENAGOS**
2do sup. **ELPIDIO GARCÍA RAMIREZ**

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio de Microbiología Clínica
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"
Tel: 5573-1200; 5573-3333. Ext. 2172, 2173 y 2230.
Váscp de Quiroga 15. Tlalpan 14 000 México D.F.


M. en C. Judith Miriam Bobadilla del Valle


Med. Infec. Alfredo Ponce de León
Supervisor Técnico


Catalina Arenas Huertero
Sustentante

A mi madre Catalina Huertero Cedeño quién me enseñó lo mas valioso de esta vida " v i v i r " y con quién me hubiera gustado compartir esta etapa, la cual la inicié sin ella... pero la llevo en el corazón.

A la persona más importante de mi vida: mi padre Alfredo Arenas Olmos por el apoyo en todo momento ya sea fácil o difícil, sin él no hubiera llegado hasta aquí.

A mis hermanos por apoyarme en los tiempos difíciles...recuerdas Francisco? por su compañía y amistad; a todos mis hermanos: Lina, Susi, Luisa, Alfredo, Francisco, Cynthia y Luis.

A mis sobrinos: José Luis, Isaí, Lluvia, Alfredo, Anita, Chema y Erik. Por poner chispa a mi vida.

Agradecimientos

A CONACYT () por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

A todo el laboratorio de Microbiología Clínica por brindarme su amistad, apoyo, enseñanzas y por su buen humor.

A mis profesores Miriam Bobadilla, Dr. José Sifuentes, Dr. Alfredo Ponce y a Consuelo Ontiveros por su apoyo y enseñanza.

A Ernesto, Kenia, Mari Cruz, Chely, Areli, Tomasa, Barbarita, Ana Bell, Lula, Lulú, Ana Lí, Andrea, Anita, Gris, Ana Bertha y al personal administrativo y de intendencia por facilitarme siempre mi permanencia ahí.

A mis amigos: Francisco, Elizabeth, Kenia, Emma, Miguel Ángel y Carlos por su paciencia, apoyo, amistad y por soportar mi carácter.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Taxonomía y cultivo	3
Identificación	5
Pruebas de sensibilidad	6
Resistencia a rifampicina	12
Polimorfismo conformacional de cadena sencilla combinado con la reacción de la polimerasa en cadena	13
OBJETIVOS	19
HIPOTEIS	19
MATERIAL Y METODOS	20
Aislados clínicos	20
Obtención de DNA	20
Análisis de PCR-SSCP	22
Análisis de PCR-SSCP radiactivo	25
Análisis estadístico	26
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	42

I N T R O D U C C I O N

Actualmente la infección por tuberculosis ha surgido como un problema de salud pública. En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la declaró como un estado de emergencia en el ámbito mundial.³⁴ La incidencia de la tuberculosis aumentó a 8.8 millones de casos por año y se espera que se incremente a 10.2 millones de casos para el año 2000 y a 11.9 millones para el año 2005. De estos casos, el 95% se presenta en países en vías de desarrollo, y afecta principalmente a personas entre 15 y 50 años. El cinco por ciento restante ocurre en países desarrollados y de éstos, el 80% afecta a personas mayores de 50 años. Por otra parte, con el incremento de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se ha incrementado el riesgo de infección y resistencia de la tuberculosis, así como en el control de la enfermedad.³⁵

Las causas más importantes del aumento de la tuberculosis en el mundo son: 1) abandono de los programas de control, 2) apego pobre al manejo instituido, 3) diagnóstico tardío y tratamiento inadecuado de la enfermedad, 4) migración, y 5) co-infección con VIH.²⁴

A cincuenta años del descubrimiento de fármacos antituberculosos, y a 25 años de establecer terapias eficaces, las curvas de incidencia y mortalidad ascendieron al final del siglo XX.³⁴ Esto se debe principalmente a la multi - resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* la cual se ha

manifestado tanto en países desarrollados como en aquellos con pocos recursos. Es vital para el control de la enfermedad realizar el diagnóstico claro de la misma y determinar el grado de resistencia de las cepas aisladas a los agentes antituberculosos.

En México, a través de un estudio epidemiológico realizado en 1997, se encontraron tres estados con mayor prevalencia de la enfermedad (Baja California, Oaxaca y Sinaloa). En este estudio se observó un número creciente de cepas de *M. tuberculosis* resistente y multi - resistente. Así mismo, se encontró que la resistencia primaria a los antibióticos de primera línea: estreptomicina (STR), isoniazida (INH), rifampicina (RIF) o etambutol (EMB) fue del 12% y la resistencia adquirida fue de 50%.¹ Estos resultados, reflejan alarmante tasa de resistencia primaria, la falla del programa de control de la enfermedad, el poco apego y/o abandono a la terapia antimicrobiana, además de otros aspectos intrínsecos a este problema como son el rezago económico en la salud y la educación entre otros.

ANTECEDENTES

Las micobacterias taxonómicamente se agrupan de la siguiente forma:

Reino: Monera

División: Bacteria

Orden: Actinomicetales

Familia: *Mycobacteriaceae*

Género: *Mycobacterium*

Mycobacterium es el único género de la familia *Mycobacteriaceae*. Sin embargo, está constituida por 30 especies, las cuales se caracterizan por ser bacilos ácido - alcohol resistentes, aerobios estrictos, no móviles y no esporulados.

El diagnóstico presuntivo de la tuberculosis pulmonar recomendado por la OMS se realiza con la baciloscopia. Es un método sencillo, rápido y barato, sin embargo; para poder observar bacilos ácido alcohol resistente en la baciloscopia es necesario que la muestra contenga $\geq 5,000$ bacilos/mL. El

diagnóstico definitivo de la tuberculosis se hace con el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* de las muestras clínicas; debido a su largo tiempo de replicación (18 - 24 horas), el crecimiento de la bacteria tarda hasta 8 semanas en medios de cultivo convencionales. Los medios de cultivo sólidos convencionales incluyen Cohen Lowenstein Jensen (LJ), agar Cohen Middlebrook 7H10/7H11. Los medios de cultivo líquidos son Middlebrook 7H9 y caldo Dubos. En la actualidad se cuenta con medios de cultivo en los cuales se recupera en menos tiempo *M. tuberculosis*.⁴¹

Estos medios de cultivo se utilizan en forma semi - automatizada y en sistemas automatizados. Los medios que se utilizan en forma semi - automatizada son: el caldo 12B, el cual tiene ácido palmítico marcado con ¹⁴C y permite la detección de la micobacteria en cultivos tempranos por la producción de ¹⁴CO₂, el cual es detectado en el equipo BACTEC TB 460. En este sistema se ha podido observar el crecimiento de las micobacterias en 14 días en promedio. Existen otros sistemas automatizados, como el colorimétrico (Bact-Alert) y el fluorométrico (MGIT) los cuales también se caracterizan por una sensibilidad parecida a la del método radiométrico que es del 90%.^{30,41}

El uso de este tipo de medios de cultivo ofrece como principales ventajas la detección más rápida del crecimiento, comparado con el tiempo de crecimiento en medios sólidos convencionales.³⁰

La identificación de micobacterias se realiza inicialmente con la observación de las características macroscópicas del cultivo; desarrollo de colonias, tiempo de crecimiento, producción de pigmento y la producción de pigmento por exposición a la luz. Dependiendo de las características macroscópicas, se seleccionan las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación de especie. Las pruebas utilizadas para la identificación de *M. tuberculosis* son: la producción de niacina, la reducción de nitratos, presencia de las enzimas catalasa semi - cuantitativa y termoestable, arilsulfatasa y pirazinamidasas.^{30,38}

La identificación de *M. tuberculosis* con pruebas bioquímicas convencionales, requiere por lo menos de 2 a 3 semanas más, después de su aislamiento con crecimiento abundantemente en medios sólido y/o líquido.

El método radiométrico ofrece una alternativa para la identificación del complejo *M. tuberculosis* en 3-5 días después del crecimiento con una especificidad del 98%. La prueba consiste en poner en contacto a la micobacteria con p-nitro- α -acetil-amino- β -hidroxy-propiofenona (NAP), que es un intermediario del cloranfenicol y es capaz de inhibir a *M. tuberculosis*, pero no a otras micobacterias.³⁸

Actualmente, con el conocimiento de técnicas de biología molecular se puede identificar el complejo *M. tuberculosis* en forma rápida y específica. Estas técnicas se encuentran de manera comercial, lo que

ayuda a mejorar el control de calidad durante el proceso de identificación. Entre los principales sistemas moleculares de identificación se encuentran las sondas de DNA que reconocen secuencias de RNA ribosomal específicas para el complejo *M. tuberculosis* y de otras especies de micobacterias.³⁰ La principal desventaja es el costo porque son productos de importación.

Existen otros métodos específicos utilizados para la identificación del complejo *M. tuberculosis*. Estos métodos son: cromatografía gas líquido (GLC) y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC); estas técnicas permiten identificar específicamente los diferentes ácidos micólicos presentes en la pared celular, que son exclusivos de cada especie del microorganismo. Los inconvenientes de estos métodos son: personal especializado para la realización de la prueba, el costo alto del equipo y los reactivos que son de importación.³⁸

Después de que se ha hecho la identificación es necesario hacer las pruebas de sensibilidad a antibióticos para que el paciente pueda recibir el tratamiento apropiado.

El fenómeno de la resistencia en *M. tuberculosis* surge desde el momento en que se empiezan a utilizar fármacos con actividad antimicobacteriana. La probabilidad de que una cepa de *M. tuberculosis* tenga mutaciones espontáneas de resistencia a INH es de 10^{-8} y a RIF es de 10^{-7} . Sin embargo, cuando las bacterias están en presencia del

antibiótico la resistencia se genera en un solo paso, el tratamiento inicial se comienza con INH y RF, si el paciente abandona el tratamiento es probable que *M. tuberculosis* genere resistencia.²

Los métodos aceptados para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en micobacteriología son:

1. Método de las proporciones
2. Método rango de resistencia
3. Método de concentración absoluta

Estos métodos pueden ser utilizados de forma directa o indirecta. El método directo consiste en que las muestras con baciloscopia positiva se digiera y descontamine . La muestra digerida y descontaminada se inocula en medios de cultivo con el antibiótico a probar y en medios de cultivo sin antibiótico como control.

El método indirecto consiste en aislar el microorganismo y posteriormente un inóculo cuantificado se siembra en medios de cultivo con antibiótico y sin antibiótico como control.

1. Método de las proporciones. Este método fue descrito inicialmente por la OMS; sin embargo, ha sido modificado por el Control Diseases Center (CDC), estos métodos son utilizados como el estándar de oro en el mundo.

El método de las proporciones modificado, utiliza discos impregnados con el antibiótico en el medio 7H11, este medio permite un desarrollo mejor de las cepas multi - resistentes; los resultados de sensibilidad se obtienen en tres semanas.

2. Método rango de resistencia. Este método se realiza en medio LJ sin harina de papa. El rango de resistencia está definido como el cociente de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del aislado clínico, y la CIM de una cepa control sensible (H37 Rv) al antibiótico de prueba. La prueba de susceptibilidad de la cepa problema y la control se realiza al mismo tiempo. La inclusión de la cepa de referencia en cada experimento es para el control de calidad y para estandarizar los resultados permitiendo así algunas variaciones en la prueba. Esto hace al método muy preciso pero también más caro ya que se requiere de muchos tubos con medio de cultivo para probar cada cepa.

3. Método de la concentración absoluta. Este fue descrito por la OMS. Se utiliza medio LJ sin harina de papa y con 0.75% de glicerol. El antibiótico se agrega al medio antes de que coagule. El crecimiento de 20 o más colonias en presencia de las concentraciones probadas, indica resistencia. La concentración de antibiótico a probar, debe ser establecida por cada laboratorio. La suspensión bacteriana debe ser ajustada a una

concentración óptica equivalente a mg/mL de peso seco y una dilución de 1:5 la cual debe contener $2 \times 10^{5-6}$ bacterias/mL.

Los medios con antibiótico y los controles sin antibióticos, se incuban a 37 °C durante 4 semanas y de 5-6 semanas si el crecimiento es insuficiente en la primera lectura.

4.- Método radiométrico.

Los métodos de sensibilidad en medios sólidos y mediante los métodos convencionales requieren de largos periodos de incubación. Debido a la necesidad de utilizar métodos rápidos en micobacteriología, se comenzaron a probar técnicas radiométricas (método radiométrico automatizado (BACTEC); con el cual se obtienen resultados cualitativos en relación a la concentración crítica y cuantitativamente en base a la CIM. El índice de crecimiento registrado por el instrumento, es directamente proporcional al número de unidades formadoras de colonias/mL.(manual Bactec).³⁰ De acuerdo a las recomendaciones del fabricante, una vez inoculado el vial control y los viales que contienen el antibiótico a probar, se deben incubar de 4 a 12 días para poder interpretar los resultados mediante una diferencia de crecimiento en el control comparada con la diferencia del crecimiento en el vial con antibióticos. Considerando una cepa como sensible cuando la diferencia entre el vial con antibiótico es menor a la diferencia con el vial control y resistente cuando la diferencia del vial con antibiótico es mayor que la diferencia del vial control.³⁰

5. Prueba E. La prueba E es un método preciso de CIM y se ha utilizado para la determinación de susceptibilidad en muchos organismos de crecimiento fastidioso, incluyendo a las micobacterias de crecimiento rápido. La prueba se basa en la dilución del antibiótico y la difusión de éste en un medio sólido. Consiste de una tira reactiva la cual está impregnada en concentraciones crecientes del antibiótico a probar; ésta se pone en contacto con la superficie de un medio sólido previamente inoculado con una determinada concentración del microorganismo, la prueba se puede leer después de 5-10 días de incubación. En la tira reactiva se puede leer la concentración a la cual se inhibe el microorganismo. Recientemente se hizo un estudio en donde se probaron cepas de *M. tuberculosis* a los antibióticos de primera línea con el método radiométrico y la prueba E y tuvieron una concordancia de 95% entre ambos métodos, es reproducible y puede utilizarse como un método alternativo para pruebas de susceptibilidad a antibióticos en aislados clínicos de *M. tuberculosis*.⁴⁸ Sin embargo este método solo se ha probado en investigación y todavía no se ha probado en el laboratorio clínico.

6. Método de la luciferasa. Recientemente se ha descrito un sistema que puede ser utilizado con eficiencia para las pruebas de susceptibilidad antimicobacteriana; esta técnica se basa en la infección de las micobacterias por un fago que contiene el gen reportero de la luciferasa. Este sistema disminuye el tiempo requerido para el diagnóstico y la

susceptibilidad de *M. tuberculosis*. Este fago infecta específicamente *M. tuberculosis* que es capaz de transcribir el gen (FFlux) el cual codifica la enzima productora de luz; la luciferasa de *Photinus pyralis*. La luciferasa actúa sobre su sustrato "luciferina" el cual es expresado bajo un promotor constitutivo; y necesita la presencia de ATP, la luz es detectada cuantitativamente en unidades relativas de luz utilizando en un luminómetro.

En las pruebas de susceptibilidad para las *M. tuberculosis* por medio de la producción de la luciferasa; las micobacterias se incuban con diferentes antibióticos a concentraciones críticas en ensayos independientes y por tiempos ya estandarizados. Posteriormente los cultivos en presencia del antibiótico, se infectan con el fago reportero; y a las 3 horas se mide la actividad de la luciferasa; si la cepa es sensible a esa concentración de antibiótico no hay producción de luz. Esta metodología tiene las siguientes ventajas: se obtienen resultados en corto tiempo, es de bajo costo, es muy reproducible y detecta organismos vivos.^{4,36}

7. Método de azul de alamar. Esta metodología se basa en la utilización del azul de alamar que es un colorante vital. El azul de alamar es un colorante indicador de oxidación-reducción, la forma oxidada es de color azul y no fluoresce; las micobacterias viables y metabólicamente activas generan en cultivo micro-ambientes generando el cambio de color de este reactivo; por el contrario las micobacterias no viables o metabólicamente inactivas como las células susceptibles a los antibióticos probados, no

generan cambio de color del indicador. Esta metodología presenta ventajas ya que se encuentra disponible comercialmente, no es tóxico para el usuario, es soluble en agua, se puede esterilizar sin perder sus propiedades. Utiliza la técnica de determinación por CIM recomendado por la NCCLS, puede realizarse la lectura de manera visual. Actualmente se esta evaluando la reproducibilidad de los resultados y su correlación con el método de las proporciones, para los antibióticos de primera línea.¹¹

La INH y la RIF son los antibióticos primarios utilizados contra las cepas susceptibles de *M. tuberculosis*. El control de la resistencia a estos antibióticos depende del establecimiento de programas de tratamiento estrictamente observado y del entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la adquisición de la resistencia.

La rifampicina fue incluida en el régimen terapéutico antituberculoso en los años 70s. Las bases genéticas de resistencia a este antibiótico fueron descritas inicialmente en *E. coli*,⁶ *M. leprae*⁷ y *M. smegmatis*.⁸ La rifampicina actúa inhibiendo la transcripción en los pasos de inicio y elongación de la síntesis de la cadena de mRNA. La utilización de compuestos quiméricos de nucleótidos unidos a rifampicina y el uso de técnicas de "cross-linking" han ayudado a encontrar el sitio de unión de la rifampicina con la RNA polimerasa. La holoenzima RNA polimerasa de los organismos procariontes, está formada por 4 subunidades ($\alpha_2\beta\beta'$) y un factor de iniciación σ .^{8,22,26} Se ha demostrado que la rifampicina interacciona con la subunidad β .^{22,25,32,40}

En *E. coli* se ha estudiado el mecanismo de resistencia a rifampicina. Los resultados han demostrado que este mecanismo está relacionado con mutaciones en el gen *rpoB*.^{6,14} el cual codifica a la subunidad β de la RNA polimerasa. Las mutaciones en este gen producen una disminución en la afinidad entre el sitio de unión de la rifampicina y la RNA polimerasa.

En *M. tuberculosis*, la resistencia a rifampicina está asociada con un gran número de mutaciones, localizadas en una región de 69 a 81 nucleótidos (codones 507-533) del gen *rpoB*.⁹

Las mutaciones encontradas han sido de tipo puntual; deleciones y/o inserciones y en algunas cepas se han observado combinaciones de mutaciones.

3,9,20,31

La detección rápida de este tipo de mutaciones, y su consecuencia fenotípica, pueden ser un factor importante en el manejo de los pacientes con tuberculosis. Por ello, en los últimos años el método de polimorfismo conformacional de cadena sencilla combinado con la reacción de la polimerasa en cadena (PCR-SSCP), se ha utilizado para detectar mutaciones en el gen *rpoB*.

El PCR-SSCP se utilizó por primera vez para identificar variabilidad alélica en el locus de HLA-DQA.^{14,33} Además de utilizarse para detectar mutaciones en genes eucariontes responsables de varias enfermedades;²¹ como en el gen p53 en pacientes con linfoma no Hodgkin's,¹⁹ gen de la insulina humana,²³ gen ras en cáncer de pulmón,⁴³ así como en la detección de mutaciones en un grupo de pacientes con anemia tipo Fanconi^{28,33,42,46} entre muchos otros estudios relacionados. En genes de procariontes uno de los primeros trabajos fue realizado por Kanazawa, cuando estudió las mutaciones presentes en el gen de F1-ATPasa en *E. coli*,¹⁶ en el gen *rpoB*,^{33,34} y *katG* de Mtb, entre otros.⁴⁶

El PCR-SSCP se basa en la movilidad electroforética que presenta un fragmento de DNA de cadena sencilla de acuerdo con la secuencia nucleotídica y la conformación que ésta pueda formar. Cualquier cambio en dicha secuencia afectará el plegamiento o la conformación de la cadena y este cambio se puede detectar en la movilidad electroforética.^{23,33,42.} El fragmento de DNA por analizar a partir de DNA genómico o DNA complementario (cDNA), se amplifica por PCR, el producto de amplificación se desnaturaliza y es sometido a electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.¹⁶

La reproducibilidad del PCR-SSCP, depende de las condiciones de electroforesis (fuerza iónica y voltaje),^{15,42}. temperatura, concentración de poliacrilamida y el tamaño del fragmento que se va analizar.^{15,16} En fragmentos con una longitud de 200 pares de bases la detección de mutaciones es >90%; este porcentaje disminuye a <80% cuando los fragmentos analizados son mayores o iguales a 400 pb.^{16,19}

Porcentaje de poliacrilamida. Esta variable influye en la resolución de las bandas del fragmento que se analiza, en la siguiente tabla se indican algunas concentraciones de poliacrilamida utilizada de acuerdo con la longitud del fragmento que se analiza.

PORCENTAJE DE POLIACRILAMIDA RECOMENDADA

% Poliacrilamida	DNA doble cadena	DNA cadena sencilla
3.5	100-1000 pb	750-2000 pb
5.0	75-500 pb	200-1000 pb
8.0	50-400 pb	50-400 pb
12.0	35-250 pb	
15	20-150 pb	

Concentración del DNA. En otros trabajos se ha descrito la importancia de la concentración de DNA, ya que la excesiva concentración del producto de amplificación promueve la conformación de doble cadena de DNA (renaturalización), la cual podría influir en el corrimiento electroforético complicando el análisis de los resultados.¹⁶

Amortiguador de carga para electroforesis. Este tipo de amortiguadores previene la excesiva renaturalización de las cadenas de DNA, lo cual es de ayuda para mantener a los productos de amplificación como cadena sencilla para su posterior electroforesis y análisis del PCR-SSCP.¹⁶ En la mayoría de los trabajos se proponen un amortiguador de dodecil sulfato de sodio 0.1%, EDTA/NaOH 10 Mm/20 Mm; formamida 90%, EDTA 10Mm, azul de bromofenol 0.25%, xilenciano! 0.25% o la presencia de Ficoll, hidroxido de metilmercurio 15%.

Soluciones amortiguadoras. El tipo de solución amortiguadora y la concentración de la misma influye en la claridad de las bandas. En trabajos previos se han realizado ensayos con diferentes amortiguadores y concentraciones; estos amortiguadores son: TBE (Tris-Boratos, EDTA), TAE (Tris-Acetato, EDTA) y TGE (Tris-Glicina, EDTA), se han reportado los mejores resultados con el amortiguador TBE y a una concentración de una solución estándar de 0.25 a 1.5 X.¹⁸

Temperatura de electroforesis. Esta condición influye directamente en la movilidad de las bandas durante la electroforesis; a bajas temperaturas la conformación de los fragmentos es mas compacta, además de disminuir la renaturalización de las cadenas sencillas.³³ La realización del ensayo a una temperatura determinada permite obtener resultados reproducibles.^{16,18}

Voltaje. En la realización del PCCS-RPC, se propone electroforesis con bajo voltaje para obtener una buena separación de las bandas.¹⁶

La sensibilidad del método no se ha podido determinar de manera fisicoquímica, debido a la interacción de la secuencia nucleotídica aledaña (secuencia nativa) con la mutación; algunos trabajos han relacionado el polimorfismo presentado con la mutación encontrada en el gen,⁶ sin embargo, estos intentos no han tenido buenos resultados. La metodología no es capaz de detectar el tipo de mutación, ya que se han encontrado fragmentos con mutaciones silenciosas y polimorfismos diferentes con respecto a los controles los cuales no presentan mutaciones.³

La metodología inicialmente utilizaba radiactividad para detectar el polimorfismo,^{3,12,14,39,43,44,45,46,47,50} sin embargo, actualmente se ha utilizado tinción con plata para la detección de ácidos nucleicos.^{18,24,28} Esta metodología presenta ventajas ya que es un procedimiento rápido,

presenta menos riesgo para el usuario y tiene alta sensibilidad comparado con otros métodos.^{13,27}

El primer estudio en donde se utilizó esta metodología para encontrar mutaciones en el gen *rpoB* de *M. tuberculosis*, fue analizando un fragmento de 157 pb, el cual se ubica en una región de índice alto de mutaciones entre los codones 511-533; los resultados en este estudio, mostraron una relación directa entre el polimorfismo observado por PCR-SSCP y la resistencia fenotípica de los aislados y las mutaciones, éstas últimas, fueron confirmadas por secuencia nucleotídica.⁴⁴

En el laboratorio, se determinó la susceptibilidad a drogas de 46 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina, 35 fueron resistentes por concentración absoluta a 2 µg/mL y 11 fueron sensibles. Las cepas resistentes se probaron a diferentes concentraciones de antibióticos (2-2048 µg/mL) para determinar su concentración inhibitoria mínima (CIM).

El propósito de este trabajo fue detectar mutaciones en el gen *rpoB* con el PCR-SSCP, y correlacionarlas con la CIM de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina. Para contestar estas pregunta, amplificamos un fragmento de 157 pares de bases y analizamos el PCR-SSCP en geles con diferentes concentraciones de poliacrilamida sin desnaturalizante, diferentes condiciones de temperatura, voltaje y fuerza iónica. El polimorfismo se detectó con tinción con plata.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la existencia de mutaciones en una región del gen *rpoB* involucradas en la resistencia a rifampicina con el método de polimorfismo conformacional de cadena sencilla combinado con la reacción de la polimerasa en cadena (PCR-SSCP) en aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar las condiciones óptimas para el análisis del PCR-SSCP, con un método no radiactivo.

Comparar la sensibilidad del método no radiactivo con respecto al método radiactivo.

H I P O T E S I S

La técnica de PCR-SSCP es capaz de detectar polimorfismo en la región hipervariable de 157 pb del gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

AI SLADOS CLÍNICOS

Se analizaron 35 aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina y 11 aislados sensibles. La cepa *M. tuberculosis* H37 Rv fue utilizada como cepa control sensible. Las pruebas de sensibilidad se realizaron con el método radiométrico (BACTEC TB 460 Becton Dickinson, México,D.F.) según recomendaciones del fabricante.

OBTENCIÓN DE DNA

Las cepas de *M.tuberculosis*, fueron cultivadas en medio Löwenstein Jensen a 37 °C durante 2-3 semanas. Las bacterias se transfirieron a tubos de microcentrifuga con solución amortiguadora TE (Tris- HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 Mm). Las bacterias se inactivaron en un baño seco a 80 °C, 20 minutos. Los tubos se centrifugaron a 10 000 X g, 5 minutos. El paquete celular se resuspendió en 400 µL de amortiguador TE. A todos los tubos se les adicionó 50µL de lisozima (10 mg/mL). se agitaron y se incubaron a 37 °C, toda la noche. Posteriormente, se agregaron 75 µL de una mezcla de

proteínasa K/dodecilo sulfato de sodio (20 µg/mL, SDS 10%), los tubos se agitaron y se incubaron a 65 °C, 10 minutos. Después de la incubación se adicionaron 100 µL de una solución de CTAB precalentado a 65 °C (bromuro de acetil-trimetil-amonio 10%) y 100 µL de NaCl 5M. Los tubos se agitaron y se incubaron a 56 °C, 10 minutos. El DNA se extrajo con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (25:1). Los tubos se agitaron y se centrifugaron a 10 000 X g, 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo de microcentrífuga limpio. El DNA se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol. Los tubos se incubaron a -20 °C, 30 minutos y se centrifugaron a 10 000 X g, 15 minutos, se decantó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1mL de etanol frío al 70 %. Los tubos se centrifugaron 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se dejó secar al aire 10 minutos. El DNA fue resuspendido en 30 µL de TE y fue almacenado hasta su uso a -40 °C.³⁹

ANALISIS DEL POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA PCR-SSCP.

1. Condiciones de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Se utilizó la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para la amplificación de un fragmento de 157 pares de bases. Cada reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L; $MgCl_2$ 1.5 mM; mezcla de dCTP, dATP, dGTP y dTTP (Gibco BRL, NY, EUA) 100 mM; oligonucleótidos TR8 (5'-TGCACGTCGCGGACCTCCA) y el TR9 (5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT) 10 pM; 1 U de *Taq* polimerasa (Gibco BRL, NY, EUA); 2 μ L de DNA (10 ng/ml) de cada cepa. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MJ Research Inc. PTC-100), el programa consistió de un ciclo a 94°C 5 minutos; 40 ciclos: 94°C 45 segundos; 55°C 45 segundos; 72°C 45 segundos y un ciclo a 72 °C 8 minutos. En cada lote de muestras amplificadas se utilizó un control positivo con DNA de la cepa control *M.tuberculosis* H37 Rv y un control negativo de reactivos.

2. Preparación de las muestras.

Los productos amplificados, se diluyeron 1:5 con una solución amortiguadora de EDTA 10 mM, SDS 0.1%. Del amplicón diluido se tomaron 3.0 μ L y se mezclaron con 3 μ L de amortiguador de carga (80% formamida,

50mM Tris-Boratos-EDTA pH 8.3, 0.1% de Xilencianol y 0.1% de azul de bromofenol); posteriormente, los tubos se colocaron en un baño de agua a 94°C durante 2 minutos para desnaturalizar y luego se colocaron en hielo 5 min.

3. Preparación de los geles de acrilamida

Se preparó poliacrilamida:bisacrilamida (30.8). Los geles se prepararon a concentraciones finales de poliacrilamida de 6, 7.5, 10 y 12% sin desnaturalizante. El tamaño de los geles fue de 14 x 10 cm x 1.5 mm.

4. Condiciones de voltaje y fuerza iónica

Para cada concentración de acrilamida se probaron diferentes voltajes. Para cada voltaje un tiempo determinado. Todas las condiciones están resumidas en la tabla 1. Se probó el efecto de la fuerza iónica en la electroforesis con el amortiguador TBE 1X (trizma-base 90 mM, ac. bórico 90 mM y EDTA 2.7 mM) y 0.5X (trizma-base 45 mM, ac. bórico 45 mM y EDTA 1.35 mM).

5. Condiciones de desnaturalización del producto amplificado.

Se probó el efecto del tiempo de desnaturalización del DNA con calor para detectar su influencia en la movilidad electroforética. Los productos

amplificados y diluidos de la cepa control se desnaturalizaron 2, 5 y 10 minutos en un baño de agua a 94°C y luego se colocaron en hielo 5 minutos. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 7.5 % y la electroforesis se corrió a 200 V, 3 minutos y luego a 40 V, 2 horas, en amortiguador TBE 0.5X.

6. Revelado del polimorfismo conformacional de cadena sencilla.

A. Tinción con plata

Después de la electroforesis, los geles fueron colocados en solución de fijación (etanol al 10% y ácido acético al 0.5%), 10 minutos, después se pasaron a solución de nitrato de plata (nitrato de plata 0.2%, etanol al 10% y ácido acético al 0.5%), durante 5 minutos y luego a una solución alcalina (hidróxido de sodio al 3% y formaldehído 0.11%) durante 5-10 minutos. Finalmente, los geles se colocaron en solución ácida (ácido acético al 5 %), 5 minutos. Los geles se lavaron con agua destilada y se secaron con papel celofán.

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA PCR-SSCP radiactivo

1. Condiciones de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Se utilizó la PCR para amplificar un fragmento de 157 pares de bases de cada cepa. Cada reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L, conteniendo $MgCl_2$ 1.5 mM; dATP, dGTP, dTTP (Gibco BRL, NY, USA), 500 mM y 0.5 μ L (5 μ Ci) de [α - 32 P]dCTP (Amersham), oligonucleótidos TR8 Y TR9 10 pM; 2 μ L de DNA (10 ng/ml) de cada cepa y 1 U *Taq* polimerasa (Gibco BRL NY, EUA). La amplificación se llevó acabo con el mismo programa de amplificación utilizado para el método no radiactivo.

2. Preparación de las muestras

Los productos de amplificación marcados con [α - 32 P]dCTP fueron preparados como los productos amplificados por el método no radiactivo.

3. Preparación de los geles de acrilamida

Los geles de poliacrilamida se prepararon a concentración final de 12%. El tamaño de los geles fue de 20cm x 40 cm x 0.2 mm.

4. Condiciones de voltaje y fuerza iónica

Los geles fueron corridos en electroforesis a 6 W 12 horas, en una cámara de secuencia (Gibco BRL, NY, USA) con un amortiguador de Tris-boratos 1X (trizma-base 90 mM, ac. bórico 90 mM y EDTA 2.7 mM).

5. Autorradiograma

Cuando la electroforesis terminó, los geles se pasaron a papel watman # 3 y se secaron en un secador de geles (Bio-Rad, modelo 583, México, D.F.) a 80 °C, 1 hora. Posteriormente se expusieron en un cassette (Kodak, BioMax E7017, México, D.F.) con una película de rayos X.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calculó la sensibilidad, especificidad y eficiencia de la metodología con tablas de contingencia de 2X2 y la regla de Bayes.³⁷

RESULTADOS

El PCR-SSCP es una metodología poco sensible. No fue posible detectar mutaciones en el gene *rpoB* de todos los 35 aislados de *M.tuberculosis* resistentes a rifampicina.

Se observó que 24 aislados (68.6%) mostraron el mismo PCR-SSCP que la cepa control sensible. Once aislados resistentes (31.4%) mostraron polimorfismo. En este último grupo, se presentaron 4 polimorfismos, nosotros los llamamos en forma arbitraria SSCP1, SSCP2, SSCP3 y SSCP4. En el SSCP1 se agruparon cuatro aislados. Todos ellos tuvieron diferente CIM (256, 1024, 2048 μ /mL). En el SSCP2 se agruparon tres aislados, con diferente CIM (256 y 2048 μ g/mL). En el SSCP3 tres aislados con CIM 2,8 y 2048 μ g/mL. En el SSCP4 un aislado con CIM de 128 μ /mL (Fig 1). No hubo correlación entre la CIM y el PCR-SSCP (Tabla 3). Las once cepas que fueron sensibles ninguna presentó mutación (Fig.2). Todas tuvieron el mismo PCR-SSCP que la cepa control sensible.

Con el método radiactivo se obtuvieron los mismos resultados que con la tinción con plata. Cuando comparamos el PCR-SSCP solo hubo diferencia en una cepa que presentó diferente PCR-SSCP por el método radiactivo.

Reproducibilidad

La reproducibilidad del método fue 100 %. Los fragmentos de 157 pares de bases de cada cepa, se amplificaron tres veces por PCR. Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis cinco veces en cada una de las concentraciones de poliacrilamida probadas. Así mismo, en cada gel, se utilizó un producto amplificado de la cepa control junto a cada producto amplificado de cada cepa probada (Fig. 1,2,3)

Análisis del PCR-SSCP con las condiciones de poliacrilamida, voltaje y fuerza iónica probadas

El polimorfismo conformacional de cadena sencilla presentó la mejor resolución en geles al 12% de poliacrilamida. El voltaje utilizado en este ensayo fue de 200 V, 10 minutos y después a 40 V 16 horas, en amortiguador TBE 0.5X. En los geles de poliacrilamida al 6% se observaron dos bandas difusas, en los geles de poliacrilamida al 7% se observaron dos bandas con mejor nitidez. Sin embargo hubo diferencia en el polimorfismo de los productos amplificados y resueltos en geles de poliacrilamida al 10% con respecto a los de 12%. (Fig.3) (Tabla2). En los geles de poliacrilamida al 10% se observaron tres bandas las cuales tuvieron mejor resolución en

12%. En los geles revelados por el método radiactivo se observaron tres bandas. (Fig. 3).

Sensibilidad del PCR-SSCP

La sensibilidad del PCR-SSCP con tinción con plata fue de 31.5%, la especificidad fue de 100%, y la eficiencia de la metodología fue de 47.8%.

La sensibilidad del PCR-SSCP con el método radiactivo fue de 34.2%, la especificidad de 100% y la eficiencia fue de 50%.

DISCUSIÓN

El PCR-SSCP es un método que ha tenido muy buenos resultados para la detección de mutaciones de tipo transversiones o transiciones, inserciones y deleciones en genes de células de eucariontes, responsables de varias enfermedades de tipo genético en humanos ^{14,15,16,19,23,43,47}

En estos trabajos se ha descrito que para mejorar la sensibilidad y reproducibilidad del método, es necesario controlar variables como el porcentaje de poliacrilamida en los geles, voltaje, fuerza iónica y el tamaño del fragmento que se quiere analizar ^{15,19,42}

Con el propósito de que esta metodología pudiera predecir mutaciones que confieren resistencia a rifampicina en las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en nuestro laboratorio, primero optimizamos las condiciones del PCR-SSCP para determinar con cuales se podían obtener los mejores resultados. Probamos tres concentraciones de poliacrilamida (6, 7 y 12%), así como diferentes voltajes y fuerza iónica para la electroforesis. Para decidir cuales serían las condiciones apropiadas para analizar todas nuestras cepas, tomamos en cuenta la definición y resolución de las bandas que produjeran polimorfismo y reproducibilidad. Nuestros resultados demuestran que las condiciones óptimas son con geles de poliacrilamida al 12% y un voltaje inicial de 200 volts 10 minutos y 40 volts 16 horas. Con

estas condiciones pudimos observar polimorfismo en 11/35 cepas, en tanto que, en los geles de 7% solo se observaron 9/35.

En trabajos previos en donde se detectan mutaciones con PCR-SSCP, los autores han utilizado matrices de poliacrilamida comercializadas, y solo informan la concentración final, no sabemos realmente si tienen otros componentes además de la poliacrilamida y el amortiguador, pero creemos que a pesar de que nosotros estamos utilizando poliacrilamida preparada en el laboratorio las condiciones del trabajo son parecidas.^{3,10,24,39,44,45.}

En los primeros trabajos de PCR-SSCP, se utilizaban oligonucleótidos marcados con ³²P para observar los resultados en un autorradiograma. Se sabe que la radiactividad hace que el método sea muy sensible, sin embargo, es un riesgo para el usuario utilizarla. Por estas razones, nosotros decidimos utilizar para el revelado del PCR-SSCP la tinción con plata, la cual ya se ha difundido como un método de revelado de ácidos nucleicos muy sensible,^{26,27} en lugar del bromuro de etidio.

Nuestros resultados con la tinción con plata fueron excelentes, se pudieron observar las bandas bien definidas y el polimorfismo. Sin embargo, solo se observó polimorfismo en 11/35 cepas resistentes. Estos resultados generan mucha controversia ya que los primeros investigadores que probaron esta metodología para la detección de resistencia a rifampicina, actualmente la están utilizando para detectar mutaciones en otros genes que confieren resistencia a otros antibióticos y han informado muy buenos

resultados.⁴⁶ Por estas razones se decidió realizar los ensayos con radiactividad, para demostrar si el problema era de sensibilidad y no del método, pero obtuvimos discrepancia en un solo aislado, y sólo se aumentó ligeramente la sensibilidad de 31.4% a 34.2%, por lo tanto no fue problema del método de revelado.

La reproducibilidad de los ensayos fue 100%, en el presente trabajo, fue calculado con base a la realización de los ensayos por triplicado de un mismo producto de PCR de cada cepa, en cada gel de poliacrilamida. Con esta reproducibilidad, se demostró que las variables inherentes a la metodología fueron controladas y que nuestros resultados son muy confiables.

Otro resultado interesante en este trabajo, fue que no se observó polimorfismo en las once cepas sensibles, es decir, todas tuvieron PCR-SSCP idéntico a la cepa control H37 Rv. Este resultado fue igual con las dos técnicas de revelado (figura1) y la especificidad fue del 100%.

Si bien este resultado es importante porque la metodología puede predecir en forma segura los aislados sensibles a rifampicina, la baja sensibilidad obtenida para los aislados resistentes, evitaría que la prueba fuera utilizada como método inicial y rápido para el escrutinio de las cepas resistente a rifampicina.

Las cepas que presentaron polimorfismo, mostraron cuatro patrones diferentes. No pudimos correlacionar la CIM con el polimorfismo, porque las cepas agrupadas en cada polimorfismo tuvieron diferente CIM.

En resumen, podemos concluir que el polimorfismo conformacional de cadena sencilla es un método poco sensible para la detección de mutaciones en cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina, a pesar de tener todas las variables del método controladas. En el presente estudio, se encontraron 24/35 (68.6%) cepas resistentes con PCR-SSCP igual a la cepa control, obteniendo sensibilidad del 31.5% la cual es muy pobre. Por otro lado, se ha reportado recientemente, la presencia de mutaciones silenciosas que pueden interferir con la detección de la resistencia a rifampicina con PCR-SSCP, por lo que la metodología tiene la posibilidad de detectar mutaciones sin mostrar un fenotipo de resistencia.³ Así mismo, en un estudio de aislados clínicos de *M. tuberculosis* de Korea⁴ se encontraron 17/67 aislados resistentes con el mismo PCR-SSCP que la cepa control. Ellos concluyen que las condiciones para la realización del PCR-SSCP que probaron no fueron las apropiadas. Creo que esta conclusión no concuerda con sus resultados, pues 50 aislados si presentaron polimorfismo, lo que demuestra que no son las condiciones sino el método que no es capaz de detectar mutaciones en todas las cepas. Podríamos especular que los aislados de *M. tuberculosis* tienen una naturaleza molecular que interfiere con el análisis del PCR-SSCP, que hace que las cepas resistentes tengan

un polimorfismo idéntico a la cepa control sensible. Pero, hasta que no tengamos la secuencia nucleotídica de nuestros aislados podremos definir claramente la presencia de mutaciones que confieren resistencia y si no existen mutaciones, especular sobre la posibilidad de que los aislados puedan tener otro mecanismo de resistencia.

Actualmente, se está haciendo la secuenciación nucleotídica del fragmento amplificado de las cepas sensibles y resistentes, para corroborar si existen mutaciones y comparar las mutaciones con los resultados del PCR-SSCP.

Finalmente, con los resultados obtenidos en este trabajo y en controversia con la mayoría de los estudios previos, a pesar de que el PCR-SSCP era un método muy prometedor para detectar resistencia, está visto que tiene limitaciones y no se debe utilizar para predecir la resistencia a rifampicina de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

CONCLUSIONES

Las condiciones que se estandarizaron para el desarrollo de la metodología fueron apropiadas para obtener reproducibilidad del 100%.

No fue posible correlacionar la CIM con el PCR-SSCP.

Los resultados obtenidos muestran que el PCR-SSCP no es una metodología capaz de detectar mutaciones en cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina. Su sensibilidad fue muy pobre.

Es importante realizar la secuencia nucleotídica de las cepas resistentes con polimorfismo idéntico al control, para explicar su comportamiento o proponer un mecanismo de resistencia diferente.

Tabla 1. Variables probadas en el análisis del PCR-SSCP^A

% Poliacrilamida	Corrida a 200 V (min.)	Corrida a 40 V (horas)
6	2	10
7	3	12
10	5	14
12	10	16
12*	10	12

^APCR-SSCP. Polimorfismo conformacional de cadena sencilla combinado con la reacción de la polimerasa en cadena .

*Esta condición experimental fue utilizada para el método radiactivo.

Tabla 2. Resultados del PCR-SSCP^A en *M.tuberculosis*. Resultados del número de PCR-SSCP observado en cada concentración de poliacrilamida y el método de revelado probado.

	CMI ^B µg/mL	Poliacrilamida 7% TINCION/PLATA	Poliacrilamida 12% TINCION/PLATA	Poliacrilamida 12% RADIATIVO
CEPA	RIF	PCR-SSCP 8/35	PCR-SSCP 10/35	PCR-SSCP 11/35
78	2	Polimorfismo	Polimorfismo	Polimorfismo
77	8	<i>Idéntico H37 Rv</i>	Polimorfismo	Polimorfismo
36	128	Polimorfismo	Polimorfismo	Polimorfismo
58	256	Polimorfismo	Polimorfismo	Polimorfismo
138	256	Polimorfismo	Polimorfismo	Polimorfismo
5068	256	Polimorfismo	Polimorfismo	Polimorfismo
151	256	<i>Idéntico H37 Rv</i>	<i>idéntico H37 Rv</i>	Polimorfismo
140	1024	Polimorfismo	Polimorfismo	Polimorfismo
46	2048	Polimorfismo	Polimorfismo	Polimorfismo
54	>2048	<i>Idéntico H37 Rv</i>	Polimorfismo	Polimorfismo
143	2048	<i>Idéntico H37 Rv</i>	Polimorfismo	Polimorfismo

^APCR-SSCP. Polimorfismo conformacional de cadena sencilla combinado con la reacción de la polimerasa en cadena.

^BCIM. Concentración inhibitoria mínima.

Tabla 3. Resultados del PCR-SSCP^A y su correlación con la concentración inhibitoria de las cepas de *M.tuberculosis* resistentes a rifampicina.

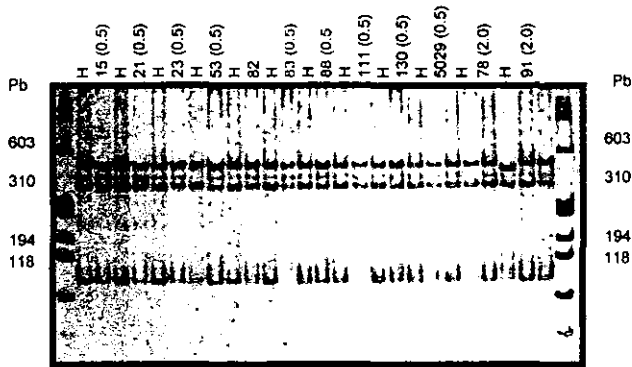
CEPA	RIFA ^B CIM ^C	POLIMORFISMO
36	128	POLIMORFISMO-1
143	2048	POLIMORFISMO-2
78	2	POLIMORFISMO-2
77	8	POLIMORFISMO-2
58	256	POLIMORFISMO-3
138	256	POLIMORFISMO-3
74	2048	POLIMORFISMO-3
5068	256	POLIMORFISMO-4
140	1024	POLIMORFISMO-4
46	2048	POLIMORFISMO-4
54	2048	POLIMORFISMO-4
151	256	SOLO POR EL METODO RADIATIVO

^APCR-SSCP. Polimorfismo conformacional de cadena sencilla combina con la reacción de la polimerasa en cadena.

^BRIFA. Rifampicina

^CCIM. Concentración inhibitoria minima.

A



B

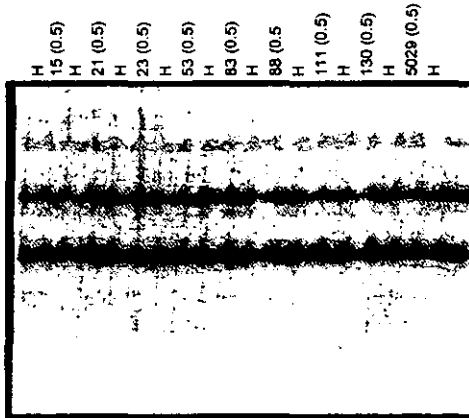


Figura 1. PCR-SSCP de las 11 cepas sensibles; en A se muestran los resultados por el método no radiactivo; los carriles 1 y 28 son marcador de peso molecular ϕ X174/Hae III. Carriles 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26 se muestra el PCR-SSCP de la cepa control H37 Rv. Carriles 1,3,5,7,9,11,13,15, 17,19,21,23,25, 27 se muestra el PCR-SSCP de las cepas de *M. tuberculosis* sensibles a rifampicina (0.5 μ g/mL) en gel de poliacrilamida al 12%, TBE 0.5X, 200V 10 minutos, 40V, 16 horas, se reveló con plata. El número de cepa se encuentra en la parte superior del carril. En B, autorradiograma donde se muestran los resultados del PCR-SSCP por el método radiactivo; en la parte superior del carril se encuentra identificado el PCR-SSCP de la cepa H37 Rv y las cepas de *M. tuberculosis* sensibles. El gel fue de poliacrilamida al 12%. se corrió en TBE 0.5X 6W 12 horas.

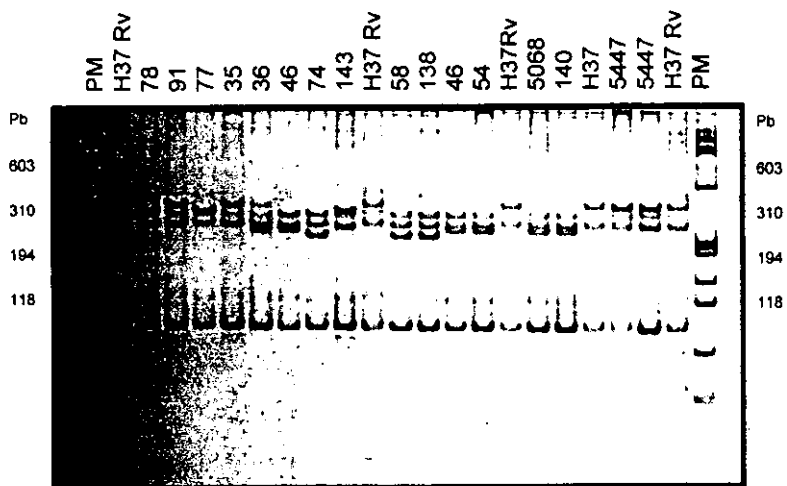


Figura 2. Resultados del PCR-SSCP de *M. tuberculosis* resistente a rifampicina. Se muestra el PCR-SSCP de una muestra representativa de las cepas de *M. tuberculosis* resistente a diferentes concentraciones de rifampicina. Carriles 1 y 23 marcador de peso molecular ϕ X174/HaeIII. Carriles 2, 11, 16, 19 y 22 muestra el PCR-SSCP de la cepa control H37 Rv. Carriles 3-10, 12-15, 16, 17, 18, 19 muestran el PCR-SSCP de cepas de *M. tuberculosis* resistente a diferentes concentraciones de rifampicina. El número de aislado se identifica en la parte superior de cada carril, el valor de CIM (μ g/mL), se encuentra entre paréntesis. El gel es de poliacrilamida al 12% y se corrió a 200V 10 minutos y a 40V 16 horas, fue revelado con plata.

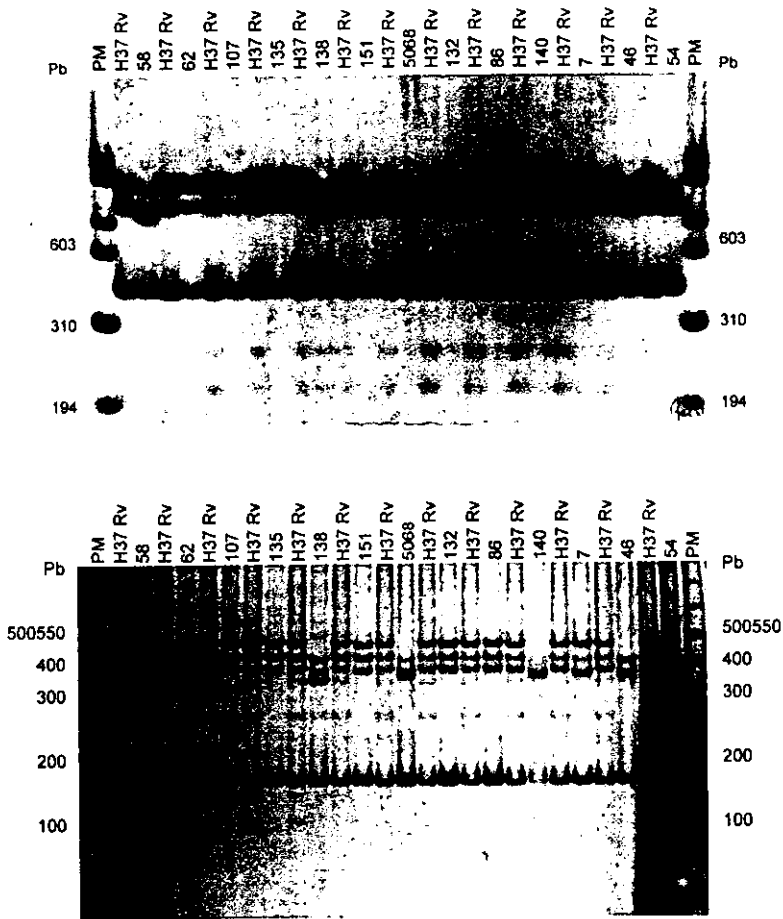


Figura 3. Resultados del PCR-SSCP de cepas de *M. tuberculosis* resistentes. En A se observa el PCR-SSCP de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a tuberculosis en gel de poliacrilamida al 7%, en TBE 0.5X, 200V 3 minutos, 40V 12 horas, tinción con plata. Carriles 1 y 28 marcador de peso molecular ϕ X174/HaeIII. Carriles 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 muestra PCR-SSCP de la cepa control H37 Rv. Carriles 3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,13,25 muestran PCR-SSCP de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina. En B se observa el PCR-SSCP en gel de poliacrilamida al 12% en TBE 0.5 X, 200V 10 minutos, 40V 16 horas, tinción con plata. El número de aislado se identifica en la parte superior de cada carril y el valor de CIM (μ g/mL), se encuentra entre paréntesis.

B I B L I O G R A F I A

1. Acosta BR, Acosta BP, et al. Population-based survey for drug resistance of tuberculosis, México 1997. *MMWR*. 1998;47: 371-375.
2. Billington OJ, McHugh TD, Gillespie SH. Physiological cost of rifampin resistance induced *in vitro* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agent Chem*. 1999:1866-1869.
3. Bum-Joon K, Seok-Yong K, Byoung-Hee P, Mi-Ae L, Il-Kyoo P, Gill-Han B, Chang-Yung C, Yoo-Hoh K. Mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-single strand conformation polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing. *J. Clin. Microb*. 1997;35: 492-494.
4. Carriere C, Riska PF, Zimhony O, Kriakov J, Bardarov S, Burns J, Chan J, Jacobs Jr. Conditionally Replicating Luciferase Reporter Phages: Improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microb*. 1997;35:3232-3239.

5. Caugant D.A, Sandven P, Eng J, Jেকে JT, Tonjum T. Detection of rifampin resistance among isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mozambique. *Microb. Drug Resis.* 1995;1: 321-326.
6. Cheng-Hsilin H, Griffith JD. Deletions of bases in one strand of duplex DNA, in contrast to single strand mismatches, produce highly kinked molecules: possible relevance to the folding of single stranded nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989;86:4833-4837.
7. De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, Machetelinckx L, Rossau R, Portaels F. Rapid detection of rifampicina resistance en sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tubercle. Lung Dis.* 1995;76: 425-430.
8. Donnabella V, Martiniuk F, Kinney D, Bacerdo M, Bonk S, Hanna B, Rom WN. Isolation of gene for the β subunit of RNA polymerase from Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and identification of new mutations. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1994;11: 639-643.
9. Drobniowski FA, Wilson S.M. The rapid diagnosis of isoniazida and rifampicina resistance in *Mycobacterium tuberculosis* a molecular story. *J. Med. Microbiol.* 1998;47: 189-196.

10. Fang Z, Doig C, Rayner A, Kenna DT, Forbes KJ. Molecular Evidence for Heterogeneity of the multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* population in Scotland (1990-1997). *J. Clin. Microb.* 1999;37:998-1003.
11. Franzblau SG, Witzing RS, McLaughlin J, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *J. Clin. Microb.* 1998;36:362-366.
12. Gaidano G, Ballerini P, Gong J.Z, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Margrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R. *p53* mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88: 5413-5417.
13. Goldman D, Sedman SA, Ebert M.H. Ultrasensitive strain proteins in polyacrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science.* 1981;211: 1437-1438.
14. Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:7652-7656.

15. Hongyo T, Kurooka M, Taniguchi E, Iuchi K, Nkajima Y, Aozasa K, Nomura T. Frequent *p53* mutations at dipyridine sites in patients with pythorax-associated Lymphoma. *Cancer Res.* 1998;58:1105-1107.
16. Hayashi K. PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *GATA* 1992;9: 73-79.
17. Hetherington SV. Molecular basis of rifampicin resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicro. Agents. Chemother.* 1995;39:2164-2166.
18. Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM. Cold SSCP: a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic. Acids Res.* 1993;21: 3637-3642.
19. Hayashi K, Yandell D.W. How sensitive is PCR-SSCP?. *Hum. Mut.* 1993;2: 338-346.
20. Honore N, Cole S. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1993;37: 414-418.

21. Johnson JL, Similarity Analysis of DNAs. Methods for general and molecular bacteriology. Gerhardt P., Murray R.G.E. *American Society for Microbiology*. Washington, D.C. 1994:660p.
22. Jun Jin D, Gross CA. Mapping and Sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicina resistance. *J. Mol. Biol* 1998;202: 45-58.
23. Kishimoto M, Sakura H, Hayashi K, Akanuma Y, Yazaki Y, Kasuga M, Kadowaki T. Detection of mutations in the human insulin gene by single strand conformation polymorphisms. *J. Clin. Invest. Metabol.* 1992;74: 1027-1031.
24. Lee H, Cho NS, Bang EH, Lee JH, Bae GH, Kim SJ, Kim JD. Molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Korea by polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism sequence analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1998;585-589.

25. Levin ME, Hatfull GF. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicina and mechanism of rifampicina resistance. *Mol. Microb.* 1993;8: 277-285.
26. Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother* 1994;38: 805-811.
27. Mitchell LG, Bodenteich A, Merrill CR. Use of silver staining to detect nucleic acids. *Methods in Molecular Biology*, vol 58: Basic DNA and RNA protocols. *Harwood A. Humana Press Inc.*, Totowa, NJ. 1996:97-103p.
28. Mohabeer A, Hiti A.L, Martin WJ. Non-radioactive single strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia "Phast System". *Nucleic. Acids Res.* 1991;19: 3154.
29. Morris S, Bai GH, Suffys P, Portillo-Gomez L, Fairchok M., Rouse D. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 1995;171: 954-960.
30. Murray. *Manual of microbiological clinical*. American Society Microbiology. 1999.

31. Musser J. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin. Microb. Revs.* 1995;8: 496-514.
32. Mustaev A, Zaychikov E, Sevenrinov K, Kashlev M, Polyakov A, Nikiforov V, Goldfarb A. Topology of the RNA polymerase active center probed by chimeric rifampicina-nucleotide compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91: 12036-12040.
33. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. USA.* 1989;86: 2766-2770.
34. Pilheu JA. Tuberculosis 2000: problems and solutions. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1998;9: 696-703.
35. Raviglione MC, Zinder DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995;273: 220-226.
36. Riska PF, Jacobs Jr. The use of Luciferase reporter phage for antibiotic-susceptibility testing of mycobacteria. (31). *Methods in molecular biology.* Vol 101: Mycobacteria protocols. Humana Press Totowa, NJ. 1998:431p.

37. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 4th ed. Duxbury Press. USA. 1995.
38. Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic Mycobacteriology laboratory. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 1994;9:61-979.
39. Scarpellini P, Braglia S, Brambilla A.M, Dalessandro M, Cichero P, Gori A, Lazzarini A. Detection of rifampin resistance by single strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system. *J. Clin. Microb.* 1997;35: 2802-2806.
40. Severinov K, Mustaev A, Severinova E, Kozlov M, Darst S.A, Goldfarb A. The β subunit Rif-cluster I is only angstroms away from the active center of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 1995;279: 29428-29432.
41. Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial Taxonomy. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 1994;8:884-901.
42. Spinardi L, Mazars R, Theillet Ch. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic. Acids Res.* 1991;19: 4009.

43. Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T. Detection of *ras* gene mutations in human lung cancers by single strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction. *Oncogene* 1990;5: 1037-1043.
44. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993;341: 647-650.
45. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, Automated Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37: 2054-2058.
46. Temesgen Z, Satoh K, Uhl JR, Kline BC, Cockerill FR. Use of polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis to detect a point mutation in the catalase peroxidase gene (*katG*) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell. Prob.* 1997;11: 59-63.

47. Verlander PC, Lin JD., Udono M.U, Zhang Q, Gibson RA. Mutation Analysis of the Fanconi anemia gene FACC. *Am. J. Genet* 1994;54:595-601.
48. Wanger A, Mills K. Testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to ethambutol, isoniazid, rifampin, and streptomycin by using Etest. *J Clin. Microb.* 1996;34:1672-1676.
49. Wayne LG. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 1994:908-914.
50. Williams D, Waguespack C, Eisenach K, Crawford J, Portaels F, Salfinger M, Nolan C, Abe C, Sticht-groh V, Gillis T.P. Characterization of rifampin resistance in pathogenic *Mycobacteria*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1994;38: 2380-2386.