



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO

“Análisis comparativo de un método alternativo
para la detección del complejo *Mycobacterium
tuberculosis* en muestras biológicas”

TESIS

Que para obtener el título de:

Biólogo

Presenta:

Bravata Alcántara Juan Carlos

Directora: M. en C. Mónica Sierra Martínez

Asesora Interno: Biol. Reynalda Roldán Pérez



México D.F. Mayo 2014



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.



**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M EN C.
MÓNICA SIERRA MARTÍNEZ**

AGRADECIMIENTOS

M. EN C. MÓNICA SIERRA MARTÍNEZ

Por todo su apoyo brindado en la parte de la realización de la tesis, además por todas sus enseñanzas durante este tiempo que llevo de conocerla.

A los miembros del jurado

M. en C. Carlos Bautista Reyes
M. en C. Mónica Sierra Martínez
Biol. Reynalda Roldán Pérez
M.C. Raúl Zavala Chavero.
M. en C. Edgar Ledesma Martínez.

Por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo

DEDICATORIA

En primer lugar a dios, que me ha brindado una vida llena de alegrías y aprendizaje, así mismo por todas las oportunidades que me ha dado.

A mi mama que siempre me ha apoyado, guiado y cuidado con mucha paciencia, gracias de todo corazón por todo su apoyo incondicional.

A mis hermanos Daniel y Jonathan que son en vida una parte esencial, así mismo les agradezco todo su cariño que me han brindado.

A mis amigos Ana Cristina, Jazbeth, Minerva, Reyna, Liliana, Oscar, Christian, que siempre han estado a mi lado, para ayudarme, escucharme, aconsejarme y en muchas ocasiones guiarme.

Gracias a la maestra Iliana, por el apoyo incondicional, así mismo por sus consejos.

INDICE

Abreviaturas.	1
Lista de figuras.	2
Resumen.	3
1. Introducción	4
1.1. Generalidades de las micobacterias	5
1.2. Clasificación de las micobacterias	5
1.2.1. Micobacterias tuberculosas	6
1.2.2. Micobacterias no tuberculosas	9
1.3. Mecanismo de infección de la TB	10
1.4. Inmunología de TB	11
1.5. Epidemiología de la TB	12
1.6. Diagnóstico de la TB	13
1.7. Métodos de detección	14
1.7.1. Basiiscopía	14
1.7.2. Cultivo	15
1.7.3. PPD	16
1.7.4. Métodos serológicos	17
1.7.5. Técnicas de biología molecular	18
1.7.5.1. PCR de punto final	18
1.7.5.2. PCR en tiempo Real	19
1.7.5.3. Microarreglos de baja densidad	20
2. Antecedentes	22
3. Planteamiento del problema	24
4. Justificación	24
5. Hipótesis	25
6. Objetivos	25
6.1. Objetivo general	25
6.2. Objetivos particulares	25

7. Material y métodos	26
7.1. Muestras clínicas	26
7.2. Extracción de DNA bacteriano	26
7.3. Estandarización para PCR en tiempo real	27
7.4. Condiciones de amplificación	28
7.5. Evaluación para PCR de punto final	30
7.6. Microarreglos (plataforma comercial)	33
8. Resultados	36
8.1. Detección del gen constitutivo RNAsaP	36
8.2. Detección de MTBC por PCR en tiempo real	38
8.3. Detección de MNT por PCR de punto final.	39
8.4. Detección de MTBC y MNT por microarreglos de baja densidad	40
8.5. Comparación de PCR de tiempo real, punto final y microarreglos	42
8.6. Evaluación de la sensibilidad de PCR en tiempo real y los microarreglos comerciales para la detección de MTBC	43
8.7. Prueba estadística (coeficiente de Kappa)	45
9. Discusión de resultados	49
10. Conclusiones	52
11. Perspectivas	53
12. Glosario	54
13. Referencias	56



Abreviaturas

BCG: Bacillus de Calmette y Guérin

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

M. avium: Mycobacterium avium

M. bovis: Mycobacterium Bovis

M. chelonae: Mycobacterium chelonae

M. fortuitum: Mycobacterium fortuitum

MAC: Complejo Mycobacterium avium

MNT: Micobacterias no tuberculosas

MTBC: Micobacterias del complejo tuberculosis.

NK: "asesina natural" Linfocitos pertenecientes al sistema inmunitario

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PPD: Derivado Proteico Purificado

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico

SIDA: El síndrome de inmunodeficiencia adquirida

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

INF γ : Interferon alfa

IL-8: interleucina-8

UV: Radiación ultravioleta



Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación de Runyon modificada.....	6
Cuadro 2. Iniciadores para la amplificación por PCR en tiempo real para tuberculosis y el gen RNAsaP.....	28
Cuadro 3. Mezcla para la amplificación por PCR en tiempo real para tuberculosis y el gen RNAsa.....	29
Cuadro 4. Condiciones para la amplificación por PCR en tiempo real para tuberculosis y el gen RNAsaP.....	29
Cuadro 5. Iniciadores para la amplificación por PCR de punto final de las micobacterias no tuberculosas.....	30
Cuadro 6. Mezcla para la amplificación por PCR de punto final para micobacterias no tuberculosas.....	32
Cuadro 7. Condiciones para la amplificación por PCR de punto final para las micobacterias no tuberculosas.....	32
Cuadro 8. Mezcla para la amplificación por PCR de punto final para todas las micobacterias a nivel de género.....	33
Cuadro 9. Mezcla para la amplificación por PCR de punto final para complejo tuberculosis.....	34
Cuadro 10. Resultados obtenidos por las diferentes metodologías para MTBC.....	42
Cuadro 11. Resultados obtenidos por las diferentes metodologías para MNT.....	42
Cuadro 12. Valores de concordancia de los microarreglos y las metodologías propuestas.....	48



Resumen

La tuberculosis (TB), es una enfermedad causada por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Para el 2012 se reportaron 8.6 millones de casos nuevos y 1.3 millones de muertes de personas debido a este padecimiento. Aunado a esto, se ha incrementado el número de casos de micobacteriosis causados por las llamadas micobacterias no tuberculosas (MNT). En nuestro país se tienen pocos reportes acerca de la prevalencia de los principales genotipos de micobacterias que pueden estar causando TB y otras micobacteriosis producidas por MNT, sobre todo en los pacientes inmunodeficientes.

Por tanto en este trabajo se comparó un método comercial ya validado, contra dos métodos propuestos en nuestro laboratorio, para la detección e identificación a nivel molecular, del complejo MTBC y MNT en pacientes del Hospital Juárez México.

Para cumplir dicho objetivo se analizaron 74 muestras de micobacterias provenientes del InDRE y el HJM, esto con la finalidad de evaluar la sensibilidad y especificidad de las técnicas de PCR de punto final, en tiempo real y la técnica comercial de Microarreglos. Además de implementar la detección de un gen constitutivo para verificar la toma de muestra, la extracción y el PCR. Dando mayor confiabilidad para el tratamiento de las micobacterias si fuese el caso.

Los resultados mostraron que la comparación entre la metodología propuesta para la detección de MTBC por PCR en tiempo real, tiene una sensibilidad de 4 copias/ μ l con respecto a la metodología de los microarreglos de baja densidad, la cual detecta hasta 400 copias/ μ l, además por PCR en tiempo real fueron más reproducibles los resultados, con los ya reportados por el InDRE y el HJM. Para el caso de la detección de las MNT, se utilizaron las mismas muestras de micobacterias no tuberculosas, patógenas en humanos, encontrando que si hay especificidad y sensibilidad para el PCR de punto final, hasta con una sensibilidad hasta de 40 copias/ μ l, dando como resultado una reproducibilidad entre los datos a doble ciego, y los microarreglos de baja densidad. En cuestión de tiempos y costos, el PCR de punto final, así como el PCR en tiempo real, son más rápidos en tiempo y tienen menor costo en comparación de los Microarreglos.



1. Introducción

La tuberculosis (TB) es causada por un grupo de bacterias del orden Actinomycetales de la familia Mycobacteriaceae y el género *Mycobacterium* (Myces = hongo; bacterium = pequeña varilla. Este género comprende un grupo de microorganismos muy diverso y de amplia distribución en la naturaleza (micobacterias) (Tomioka, 1998).

La TB ha sido descrita como una de las enfermedades más antiguas que ha afectado a la humanidad, encontrándose vestigios de TB espinal en momias de Egipto que datan de 2,400 A.C. (Nerlich y col, 1997). Para 1702, se identificaron lesiones pulmonares o “tubérculos” como cambios consistentes y característicos en pulmones y otros órganos en los pacientes con TB, en 1720 el físico Inglés Benjamín Marten fue el primero en proponer en su publicación “A New Theory of Consumption”, que la TB pudo ser causada por “diminutas criaturas vivientes”, las cuales pueden introducirse en el cuerpo generando lesiones y los síntomas de la enfermedad. Años después la etiología de la TB fue discutida hasta el descubrimiento del bacilo tuberculoso por Robert Koch en 1852, que aunado a la mejora en las condiciones socioeconómicas y el aislamiento de pacientes tuberculosos en hospitales, representó un impacto importante en la epidemiología mundial de la TB en la primera mitad del siglo XX (Barnes, 2000).

En 1895, otro gran avance fue el descubrimiento de la radiografía de pulmón por Wilhelm-Konrad von Röntgen, herramienta importante para el seguimiento de los pacientes con TB y posteriormente, la generación de la vacuna a partir del Bacilo de Calmette y Guerin (BCG) por parte de Calmette y Guerin, la cual se distribuye ampliamente en nuestros días. En la actualidad se conoce la secuencia genómica completa de *Mycobacterium tuberculosis*, que fue publicada en Junio de 1998 por Cole y cols., de la cepa H37Rv, suceso que proporcionó una nueva dirección a las diversas técnicas de ADN (Ácido desoxirribonucleico), recombinante en la detección e identificación de micobacterias y en la identificación molecular de resistencia (Daniel, 2006).



1.1. Generalidades de las micobacterias

Las micobacterias son bacilos rectos o ligeramente curvos, aerobios, inmóviles y no esporulados, presentan ácido micólico en su pared celular que les confiere una resistencia a la solución de alcohol ácido que los diferencia del resto de las bacterias. Su pared es rígida y está compuesta de ceras complejas, glicolípidos y de la lipoarabinomanana, la cual puede contribuir al daño del hospedero. Se ha observado que algunas diferencias en la estructura de estos componentes, pueden estar relacionados con la capacidad de modular la respuesta inmune en cultivos de células mononucleares (Draper, 1998).

Las micobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (agua, alimentos y aire), pueden clasificarse en dos grupos con fines de diagnóstico: a) Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), que causan la TB en el huésped correspondiente. b) Micobacterias no tuberculosas (MNT): que comprende a todas las otras especies de micobacterias que pueden causar enfermedades pulmonares y extrapulmonares, y que no pertenecen al MTBC.

1.2. Clasificación de las micobacterias

Se han descrito más de 280 especies de micobacterias, 25 de las cuales han sido identificadas como agentes infecciosos frecuentes para el humano (Tsukamura, 1983).

En 1950, Timpe y Runyon propusieron una clasificación para el género *Mycobacterium* en tres grupos, que se basó en la velocidad de crecimiento (rápido o lento, según sea superior o inferior a una semana, respectivamente), producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno, escotocromógeno) y características coloniales (Tomioka, 1998).

La clasificación fue modificada de la original de Runyon e incluye miembros del género *Mycobacterium* de importancia clínica en humanos (tabla 1). Además, existen especies saprófitas que pertenecen a las MNT, y que pueden actuar como patógenos oportunistas y causar enfermedad pulmonar o infecciones en otras localizaciones anatómicas. Las especies de *Mycobacterium* más comúnmente encontradas a nivel mundial son *M. avium*, *M. fortuitum* y *M. chelonae* (Cassidy y col, 2009).



Cuadro 1. Clasificación de Runyon modificada

CLASIFICACION RUNYON	DESCRIPCION	CRECIMIENTO	PRODUCCION DE PIGMENTO	ESPECIE
I	Fotocromógenas	Lento	Amarillo- naranja. Producción de pigmento en presencia de luz.	<i>M. asiaticum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>
II	Escotocromógenas	Lento	Amarillo-naranja Producción de pigmento sin exposición a la luz.	<i>M. flavescens</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i>
III	No cromógenas	Lento	Sin pigmento	<i>M. africanum</i> <i>M. avium</i> <i>M. bovis</i> <i>M. gastri</i> <i>M. genavense</i> <i>M. haemophilum</i>
IV	Rápido crecimiento	Rápido crecimiento (produce colonias maduras ≤ 7 días)	Sin pigmento	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i>

Clasificación de micobacterias. Tomado de Infecciones respiratorias por micobacterias ambientales. Arch Bronconeumolde, García y col., 2005

1.2.1. Micobacterias tuberculosas

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* comprende micobacterias de crecimiento lento causantes de tuberculosis en animales y humanos, difíciles de diferenciar por métodos bacteriológicos convencionales. Este grupo incluye la especie *M. tuberculosis* causante de TB en humanos; *M. bovis* que infecta principalmente el ganado bovino, pero también causa TB en humanos; (Dankner y col, 2000) *M. bovis* BCG, el derivado atenuado de la cepa de *M. bovis* comúnmente utilizado como vacuna contra *M. tuberculosis*; *M. africanum*, causante de TB humana en el continente africano, y *M. cannetti*, una subespecie de *M. tuberculosis* reportada en TB humana (*M. caprae* y *M. microti* que infectan al ganado caprino y a pequeños roedores, respectivamente, y *M. pinnipedi* es la especie que causa TB en pinnípedos). Los miembros del complejo muestran entre un 85-100% de similitud entre sus ADN y un 99% entre sus secuencias del rRNA (Ácido ribonucleico ribosómico) 16S (Muller y col, 2014).



Los bacilos tuberculosos del complejo MTBC (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedi*, *M. africanum* y *M. cannetti*.), son bastoncillos rectos o ligeramente curvos con extremos redondeados, aunque en medios artificiales se ven formas cocoides y filamentosas con morfología variable (Figura 1). Estos microorganismos varían en ancho de 0.2 a 0.5 μm y en longitud de 1 a 4 μm . Son aerobios estrictos, lo cual explica su predilección de afectar a tejidos muy oxigenados como el lóbulo superior del pulmón y el riñón, además son inmóviles, no esporulan, y pueden formar cápsulas y resistencia a la decoloración alcohol-ácida cuando son teñidos con fucsina básica fenicada (tinción de Ziehl-Neelsen). Con la tinción, los bacilos se ven de color rojo sobre un fondo azul (Taylor y col, 2003).

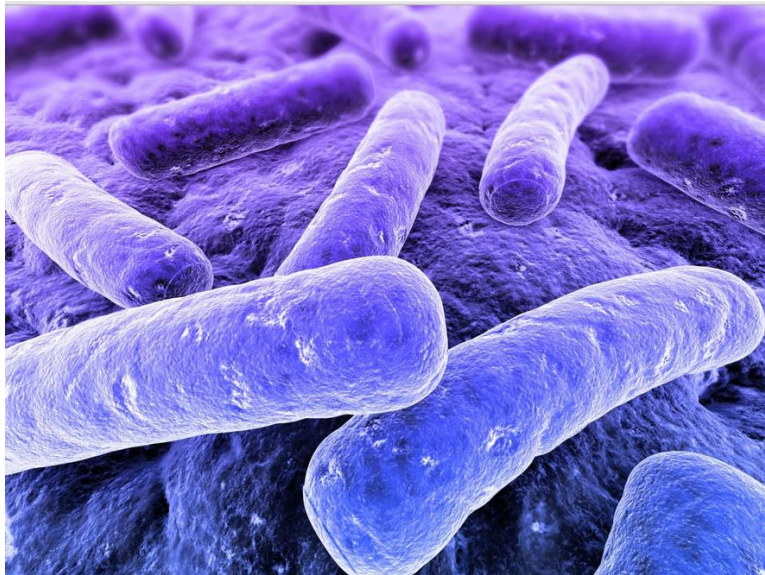


Figura 1. Representación de los bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* también llamado Bacilo de Koch. Tomado de <http://www.iladiba.com.co/econtent/VerImp.asp?ID=4086&IDCompany=11>

Estas micobacterias, obtienen su energía de la oxidación de diversos compuestos sencillos de carbono. La especie de *M. tuberculosis* prolifera con lentitud (tiene un tiempo de duplicación de 18 horas), contrastando con la mayoría de las bacterias, que pueden duplicar su número en una o más horas. Debido a que su multiplicación es lenta, los cultivos de muestras biológicas deben conservarse durante períodos de 6 a 8 semanas de incubación antes de registrarlos como negativos.

Un componente que reviste gran importancia en la bacteria de *M. tuberculosis* y las micobacterias en general, es la pared celular, rica en complejos lipídicos. Los más importantes son ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena larga), ceras y fosfátidos, que están en su mayoría unidos a proteínas y polisacáridos (Vecchiola, 2010).

El alto porcentaje de lípidos presente en la pared celular, aproximadamente el 60% de su peso seco, es una propiedad distintiva de estos microorganismos que condiciona la casi totalidad de los hechos que ocurren frente a una infección por este agente.

Dicha cubierta, de característica impermeable, determina su gran resistencia a la coloración (frente a colorantes básicos), a la actividad bactericida del complemento y a la digestión intracelular por macrófagos. Esta riqueza de lípidos puede explicar también algunas otras características propias de las micobacterias como, el carácter hidrófobo de los bacilos, y la resistencia a la desecación, propiedad importante para la transmisión, ya que permite la sobrevivencia del bacilo en esputo expectorado seco. Otra estructura importante de las micobacterias es la membrana plasmática (figura. 2), la cual está compuesta por algunos elementos distintivos como el lipopolisacárido, lipoarabinomano-lipomanano y el fosfatidilinositol manosa (Russelln y col., 2002, Gorocica y col., 2005).

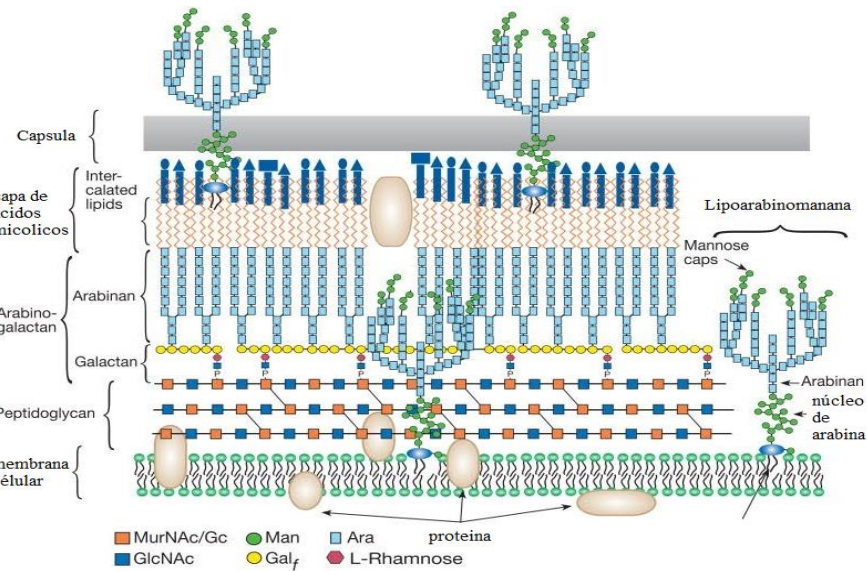


Figura 2. Composición de la membrana de la micobacteria la cual está compuesta por tres capas.
Tomado y modificado al español de: <http://www.springerimages.com/Images/>



Si bien, los bacilos tuberculosos pueden crecer en un medio sintético simple, con glicerol u otros componentes como única fuente de carbono y sales amoníacas como fuente de nitrógeno, requieren de asparagina o mezclas de aminoácidos para estimular el inicio del crecimiento e incrementar su velocidad. Por otra parte son muy sensibles a la inhibición por ácidos grasos de cadenas largas, aunque pueden ser estimulados por éstos cuando se incorporan al medio en concentraciones muy bajas. Puede obtenerse una concentración satisfactoria añadiendo al medio albúmina de suero, que liga los ácidos grasos con una afinidad suficiente para mantener su concentración libre a niveles óptimos para el crecimiento (Gorocica y col, 2005).

1.2.2. Micobacterias no tuberculosas

Recientemente las MNT han venido adquiriendo más relevancia en la salud pública, debido principalmente al incremento de su frecuencia como agentes causantes de graves patologías que afectan pulmones, ganglios linfáticos, piel, heridas, huesos, etc., particularmente en personas inmunocomprometidas, incluidas las que padecen del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Consecuentemente, el interés de la comunidad científica por estos microorganismos ha crecido en forma radical en los tiempos recientes, lo que ha permitido conocer diversos aspectos asociados a las patologías que ocasionan y a sus factores de virulencia, sin embargo, también debe tomarse en cuenta que ahora se dispone de técnicas más específicas y sensibles para identificar a estos microorganismos en muestras clínicas (Georgiev, 2003).

Las MNT pueden ser saprófitas, patógenas u oportunistas, entre ellas se incluyen especies de rápido y de lento crecimiento, algunas que destacan por su frecuencia y virulencia, son el complejo *Mycobacterium avium complex* (MAC), así como las especies de *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*. A diferencia de *M. tuberculosis* y *M. leprae*, éstas no son patógenos obligados, por lo cual su hábitat generalmente es el medio ambiente. Se han encontrado en el agua, el suelo y la vegetación; sin embargo, algunas pueden infectar a los animales y humano.



Entre los padecimientos causados por MNT están la neumonía, linfadenitis cervical, infecciones diseminadas asociadas a deficiencia inmunitaria de tipo celular, procedimientos estéticos, mesoterapias y lipo-esculturas, la aparición de abscesos después de una inyección (Da Mata y col., 2010), infecciones asociadas con catéteres, enfermedades cutáneas diseminadas, enfermedad pulmonar y enfermedades del sistema nervioso central que afectan especialmente a los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y a los niños (Katoch, 2004).

1.3. Mecanismo de infección de la TB

La TB es transmitida en tres formas: a) de persona a persona, por la inhalación del agente infeccioso, que se encuentra en el aire en forma de aerosoles donde sus núcleos contienen el bacilo de cualquier especie de MTBC, b) por ingestión de material contaminado, usualmente leche (*M. Bovis*) y, finalmente c) por inoculación directa que ocurre en trabajadores del sector salud principalmente.

Existen cuatro factores que determinan la transmisión de MTBC: 1) el número de organismos que son expelidos en el aire, 2) la concentración de organismos en el aire determinada por el volumen del espacio y su ventilación, 3) la magnitud de tiempo a la que se encuentra expuesta la persona al aire contaminado y 4) el estado inmune del individuo expuesto. Las personas con VIH (Virus de la inmunodeficiencia humana) y otras con alteraciones en la inmunidad celular son más susceptibles a desarrollar esta enfermedad si son infectados. Sin embargo, no tienen mayor riesgo de transmitir *Mycobacterium tuberculosis* (Controllers y col., 2005)

La infección de la enfermedad ocurre en tres etapas: inicial (infección primaria), latencia y enfermedad postprimaria. En la infección inicial, los bacilos invaden el tejido, generalmente las zonas medias y bajas de los pulmones, multiplicándose entre 3 a 6 semanas y originando una pequeña lesión inflamatoria (Styblo, 1980). Los bacilos entran posteriormente en el sistema linfático y son transportados a los ganglios linfáticos hiliares más próximos, donde también provocan lesiones inflamatorias, donde ingresan en la sangre y se diseminan hacia otras partes del cuerpo.



La enfermedad se reactiva (postprimaria), es decir cuando el bacilo ingresa por primera vez al organismo que en general ocurre en edades tempranas (primoinfección), éste se reproduce y elimina lentamente, por lo que resulta poco infeccioso; cuando se reactiva, el bacilo se reproduce con mayor intensidad y se elimina en gran cantidad, además suele desarrollarse después de un periodo de latencia y se origina a partir de los sitios de diseminación hematogena, donde se conserva latente por tiempo indefinido o durante muchos años, y cuando sobreviene un momento de debilitamiento puede ser secundaria a disminución de la inmunidad corporal (Davis y col, 2009).

Aunque la reactivación puede ocurrir en cualquiera de las lesiones focales, es más frecuente en los lóbulos superiores o en el vértice de los lóbulos inferiores del pulmón, donde se forman abscesos y cavidades tuberculosas (Karnak y col, 2002).

1.4. Inmunología de la TB

En la tuberculosis la defensa inicial pulmonar contra la infección está dada por los macrófagos alveolares gracias a su actividad fagocítica, los linfocitos T activados a través de sus células CD4+ y las células NK (asesina natural) activadas y sus citoquinas (IFN γ) (Interferón alfa) y quimiocinas (IL-8) (interleucina-8). Estas últimas sirven, ambas, para atraer y activar otras células inflamatorias efectoras. Una quimiocina importante en la interacción huésped patógeno es la interleucina-8 (IL-8) (figura 3) (Colakoglu, 2004).

Los macrófagos, gracias a su gran tamaño y vida media larga (meses), constituyen el hábitat de muchas bacterias intracelulares y a su vez funcionan como células efectoras principales en la defensa frente a la infección micobacteriana (Gupta y col., 2012).

El proceso de respuesta inmune incluye:

1. Contacto del bacilo e ingreso a través de los receptores del complemento CR1, CR3, CR4, de la manosa (MR) y de otros componentes de la superficie.
2. Fagocitosis del bacilo por el macrófago alveolar con producción de una vacuola o fagosoma, donde se aloja el bacilo,
3. Internalización de la bacteria.

4. Finalmente inhibición de su crecimiento o destrucción.

La entrada del *M. tuberculosis* se hace utilizando receptores específicos del macrófago independiente de los receptores Fc, con el fin de evitar el disparo de los estallidos oxidativos antimicrobianos.

La interacción entre el bacilo y la célula fagocítica está mediada además por una glicoproteína de la pared del *M. tuberculosis*, el Lipoarabinomanana (LAM). Esta impide la acción de las citoquinas producidas por los macrófagos (Flynn y col., 2003).

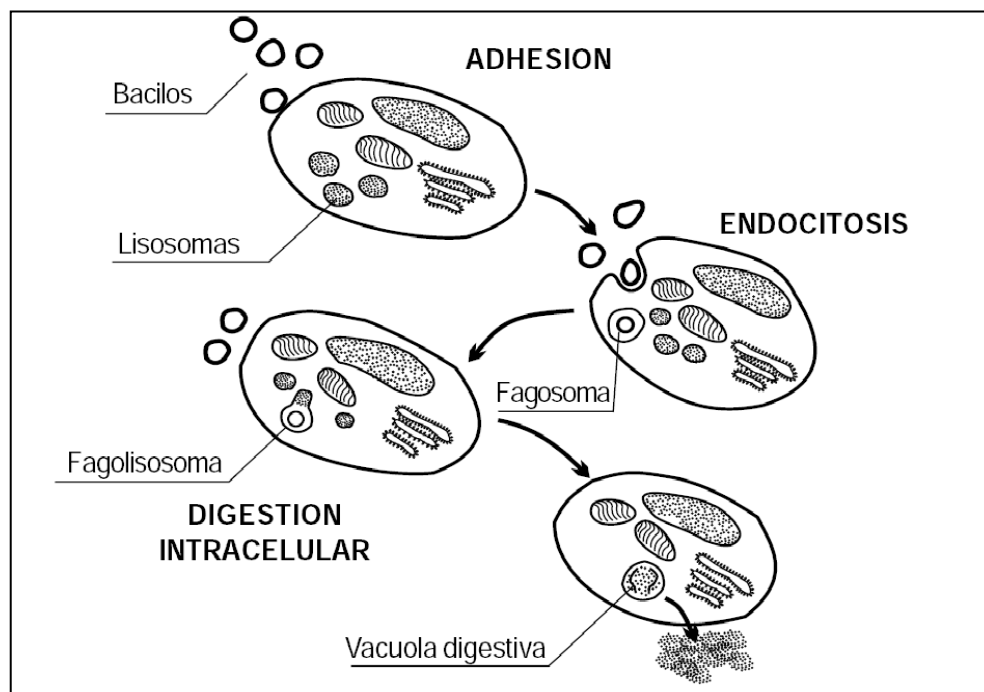


Figura 3. Fagocitosis del *M. tuberculosis* por el macrófago, tomado de http://www.bgb-biogen.com/tuberculosis/pagina_155.php

1.5. Epidemiología de la TB

Aunque la TB es un problema de salud de reciente reaparición en los países desarrollados, nunca ha dejado de serlo en los países subdesarrollados, donde se presentan en un 95% de los casos con TB, de los cuales el 98% son defunciones.



Para el 2012 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hubo 8.6 millones de nuevos casos y 1.3 millones de personas fallecieron de tuberculosis, y más del 95% de las muertes tienen lugar en los países de ingresos bajos y medianos (OMS, 2013).

Entre las causas del resurgimiento de la TB, se encuentra el aumento de la resistencia del bacilo a uno o más de los medicamentos usados para su control, así como el aumento del número de pacientes infectados con VIH (Cortes-Torres y col, 2013).

La tendencia social de la TB ha sido usualmente desigual (medidas a través del impacto por edad, sexo y grupos étnicos); sin embargo, su asociación con regiones y poblaciones de bajo nivel socioeconómico se ha mantenido sin cambio alguno. Así, aunque la enfermedad no puede presentarse de modo significativo en la población en general, persiste y está se ve aumentada en ancianos viviendo en asilos, personas desamparadas y sin hogar, personas retenidas en instituciones correccionales y con diabetes mellitus, así como aquellos infectados con el VIH (Young y col, 2014).

En América Latina, México ocupa el tercer lugar en cuanto a la incidencia con casos de TB pulmonar. Actualmente el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), ha reportado hasta la semana 14 del 2014 (3322 casos) de TB pulmonar, donde se observa la tasa de incidencia nacional de casos de TB pulmonar en 2001 fue de 16.16 casos por cada 100 000 habitantes y para el 2010 de 14.19 casos por cada 100 000 habitantes, lo que evidencia su contención, pero relativamente poco impacto en su reducción (Sinave, 2014).

Los estados que tiene mayor incidencia de casos de TB pulmonar para el 2013 fueron Baja California con 78, Veracruz 63, Nuevo León 59 y Sinaloa 42. El grupo donde se presenta más frecuentemente la TB en todas sus formas es de 25-44 años de edad, siendo el género masculino más afectado y para enero del 2014, se han reportado 563 casos de TB pulmonar (Sinave, 2013).

1.6. Diagnóstico de la TB

Es de suma importancia la disponibilidad de pruebas diagnósticas, operativas y confiables para la detección oportuna que permita iniciar el control del padecimiento. Por tal motivo, la confirmación de la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* se lleva a cabo mediante



herramientas de diagnóstico como son principalmente la baciloscopia o cultivo, técnicas serológicas como ELISA, la prueba cutánea de la tuberculina derivado proteico purificado (por sus siglas en inglés PPD), entre otras, pero existen dificultades para la detección de la bacteria a partir de estos métodos, entre ellos se encuentra la sensibilidad, especificidad y el tiempo de procesamiento, así como falsos positivos, o falsos negativos (Catanzaro y col., 2000).

En la actualidad, se han desarrollado técnicas moleculares que permiten la amplificación de ADN específico, por medio de secuencias de inserción IS6110 que son específicas de la bacteria y se emplean para la detección de MTBC, entre ellas se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final o tiempo real. De manera comercial, se puede encontrar la metodología por microarreglos de baja densidad. Tanto el PCR como los microarreglos son muy sensibles, específicos y se emplean en menor tiempo, comparado con las técnicas clásicas, para detección de la TB (Anochie y col, 2012).

1.7. Métodos de detección

1.7.1. Baciloscopia

Una de las pruebas para el diagnóstico de la TB ha sido el examen microscópico, la “baciloscopia” con la tinción microbiológica de Ziehl-Neelsen (figura 4), esta técnica presenta varias ventajas tales como la sencillez, reproducibilidad en cualquier medio, rapidez, bajo costo.

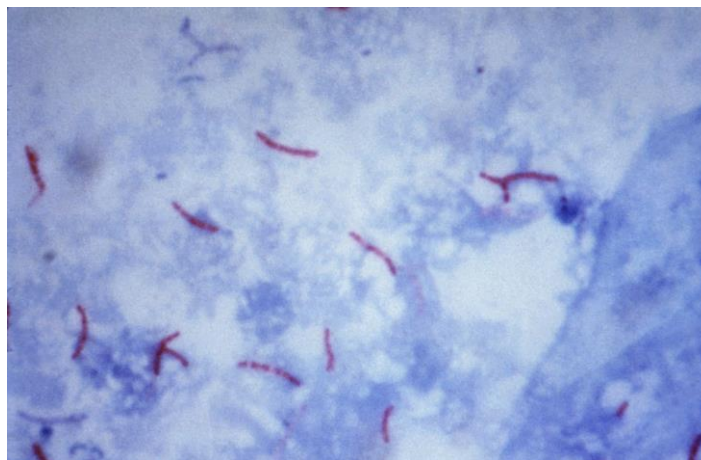


Figura4. Basiloscopia. Visualización con el uso de la tinción de Ziehl Neelsen.
Resultado de bacilos en caso de prueba positiva (presencia de BAARs)



La tinción consiste en la fijación de la fucsina sometiendo a calor la muestra cubierta con el colorante, se elimina el colorante con agua, se agrega alcohol-ácido, se enjuaga y se aplica el colorante de contraste azul de metileno, se enjuaga y se deja escurrir en forma vertical hasta secar. Esta técnica diagnóstica a los enfermos con TB que son bacilíferos, (fuente de diseminación de la enfermedad). Se han venido observando grandes limitaciones, ya que deben existir entre cinco mil y diez mil bacilos ácido-alcohol resistentes por mililitro de expectoración, para que exista un 50% de probabilidad de ser detectado, con esto se puede considerar que a estos pacientes se les establezca un diagnóstico con otros criterios tales como clínico, histopatológico, epidemiológico, radiológico e inmunológico. La ausencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en una muestra clínica no descarta el diagnóstico de TB (Martinez y col., 2006).

1.7.2. Cultivo

El cultivo de micobacterias, es el único método que permite dar un diagnóstico certero mediante la observación del bacilo (Agarwal y col., 2005) (figura 5). Es el único completamente válido para dar seguimiento y proporcionar la curación del paciente tuberculoso, motivo por el cual es considerado el estándar de oro en el diagnóstico de la TB. Los resultados del cultivo dependen en gran medida de los pasos previos a este, que son la digestión y descontaminación de residuos orgánicos que le permitirán al bacilo de Koch poder desarrollarse en el medio de cultivo sólido, sin embargo, si estos procesos no se llevan de manera adecuada, puede afectar la viabilidad de las micobacterias presentes en la muestra y dar lugar a falsos cultivos negativos debido a un exceso de descontaminación. Los cultivos son mucho más sensibles que la baciloscopía, pudiendo detectar una cantidad tan pequeña de bacterias, basta con que existan más de 10 bacilos por mililitro en muestras digeridas o concentradas, para que sea positivo. El aislamiento en cultivo puro es necesario para poder identificar correctamente las cepas aisladas, y los medios de cultivo tradicionales que hasta la actualidad se han empleado para diagnóstico son Löwenstein-Jensen, o el agar 7H10 y 7H11 de Middlebrook. El mayor inconveniente del cultivo convencional se deriva de la lenta capacidad de división de la *M. tuberculosis*.



Este proceso que incluye la recepción de la muestra y la entrega del resultado, es superior a 4-6 semanas en los medios sólidos convencionales, tiempo excesivamente elevado para esperar un diagnóstico de certeza. Algunas mycobacterias, muchas de ellas asociadas con el SIDA. La incubación de los medios sembrados en una atmósfera enriquecida con un 5-10% de CO₂ favorece el crecimiento de *M. Tuberculosis* (Naveen y col., 2012).



Figura 5. Cultivo de colonias positivas para tuberculosis. Tomado de Agarwal y col., 2005.

1.7.3. PPD

Esta técnica es de poco valor diagnóstico, la prueba consiste en una reacción cutánea de hipersensibilidad que indica la existencia de infección por TB previa, más no la enfermedad. Este procedimiento se lleva a cabo con un derivado proteico etanólico purificado (PPD) de *M. tuberculosis*. Esta debe administrarse de forma intradérmica (figura 6), aplicando en la cara anterior del brazo 0.1ml de tuberculina que se lee midiendo el diámetro transversal de la zona de induración entre las 48 y 72 horas. En la cual se ha recomendado que la prueba se considere positiva a partir de 5 mm; cabe mencionar que puede dar positiva si el paciente ha tenido contacto con otras mycobacterias no tuberculosas (Pilszczek y col., 2008).

Si bien la prueba tuberculina ha sido utilizada como instrumento básico para la detección de MTBC, ha demostrado pobre especificidad como consecuencia de las reacciones cruzadas que presenta con la vacuna BCG (Dámaso y col., 2009).



Figura 6. Aplicación para la prueba de la tuberculina.

1.7.4. Métodos serológicos

Uno de los métodos de diagnóstico para la TB mayormente empleada es el ensayo inmune ligado a enzima (ELISA). Mediante ésta metodología es posible identificar anticuerpos circulantes específicos contra antígenos de *Mycobacterium* y, de esta manera, indicar una infección. Este sistema genera resultados en cuestión de horas y las sensibilidades oscilan entre 95 al 98%, mientras las especificidades como entre el 85 al 92%, dependiendo del antígeno empleado. Pose ventajas adicionales, ya que evalúa el nivel de respuesta inmune ante la infección bacteriana, es decir, identifica cuándo se presentan bacterias vivas y muertas en el huésped, es más fácil de estandarizar y necesita menos reactivos y equipamiento. Esta técnica ofrecería el mayor potencial para la realización de pruebas serológicas rápidas y podría ser de gran valor cuando sea difícil obtener muestras de esputo, como sucede en el caso de los niños y en pacientes con tuberculosis extrapulmonar (Sant'Anna y col., 2001).

Aún con estas ventajas, las técnicas de inmunodiagnóstico tienen la desventaja de presentar variaciones dependiendo del antígeno empleado, arroja falsos positivos por mal manejo de los reactivos o contaminación de la muestra, y se necesita personal altamente capacitado y equipo especializado para la lectura de las muestras, por lo regular caro, lo cual limita su empleo en países pobres (Liao y col., 2009).



1.7.5. Técnicas de biología molecular.

Durante la última década se han desarrollado una serie de técnicas de Biología Molecular que permiten la amplificación de secuencias de ADN y ARN específicas de *M. tuberculosis*. Esta tecnología ha logrado solucionar, al menos en parte, los principales problemas inherentes a las técnicas microbiológicas convencionales, permitiendo establecer diagnósticos rápidos entre 2 y 8 horas, y mejorar la sensibilidad de las técnicas clásicas. Esto es particularmente importante en las muestras clínicas de origen extrapulmonar en las que el inóculo micobacteriano es habitualmente bajo (Zhuravlev y col., 2010).

1.7.5.1. PCR de punto final.

La metodología de PCR de punto final es altamente sensibilidad y confiable en un 99% de los casos y bajo condiciones experimentales óptimas, permite la amplificación de más de un billón de copias de la secuencia deseada a partir de una sola copia del ADN original (Figura 7).

Partiendo de este principio, la PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

- 1) Desnaturalización de la cadena doble de ADN.
- 2) Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras.
- 3) Extensión, a partir del templado de ADN y de los cebadores. La síntesis de la nueva hebra se lleva a cabo mediante la ADN polimerasa (*TaqADN polimerasa*) (Bej y col, 1991).

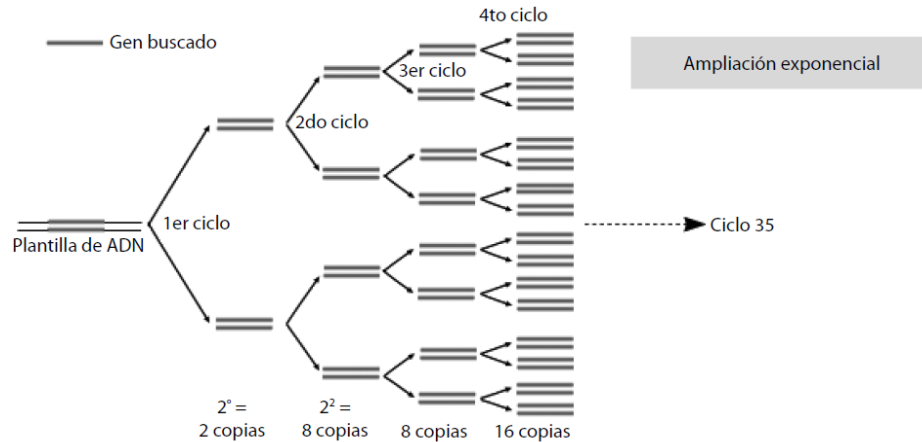


Figura 7. Pasos del desarrollo para la PCR. Tomado de Vierstraete, 2001.

La detección del producto de la reacción en cadena de la polimerasa se realiza normalmente mediante el corrido electroforético dependiendo del tamaño de la amplificación y la resolución deseada se utilizará diferentes medios (agarosa ó poliacrilamida) a distintas concentraciones. La posterior visualización se puede realizar con bromuro de etidio y se evalúa en luz UV (Radiación ultravioleta), tinción de plata, fluorescencia, radioactividad. La electroforesis en general, permite la separación de las moléculas como consecuencia de su diferencia de movilidad en un campo eléctrico. Por lo tanto, el parámetro esencial es la diferencia de carga eléctrica de las moléculas así como el tamaño, cabe mencionar que la carga depende del pH del medio. La PCR, se emplea en la identificación de *M. Tuberculosis*, e incluye: 1) Amplificar con cebadores apropiados y detectar después a la *M. tuberculosis*, en específico, mediante electroforesis y bromuro de etidio (Lima y col., 2008).

1.7.5.2. PCR en tiempo Real.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, también conocida como Real Time PCR (RT-PCR) muestra la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre (figura 8). Los datos son colectados a lo largo del proceso de PCR y no al final como se realizaba antes. El PCR usa moléculas de un reportero fluorescente para monitorear la amplificación de productos durante cada ciclo de reacción. Esta técnica

combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo y evita tener que preparar geles de electroforesis para detectar los productos amplificados.

Su simplicidad, especificidad y sensibilidad junto con su potencial como técnica en aplicaciones futuras y la evolución hacia nuevos conocimientos de la química, además de la confiabilidad en la instrumentación y protocolos mejorados, han hecho del PCR una tecnología altamente competitiva para la detección de ADN (Kubista y col., 2006).

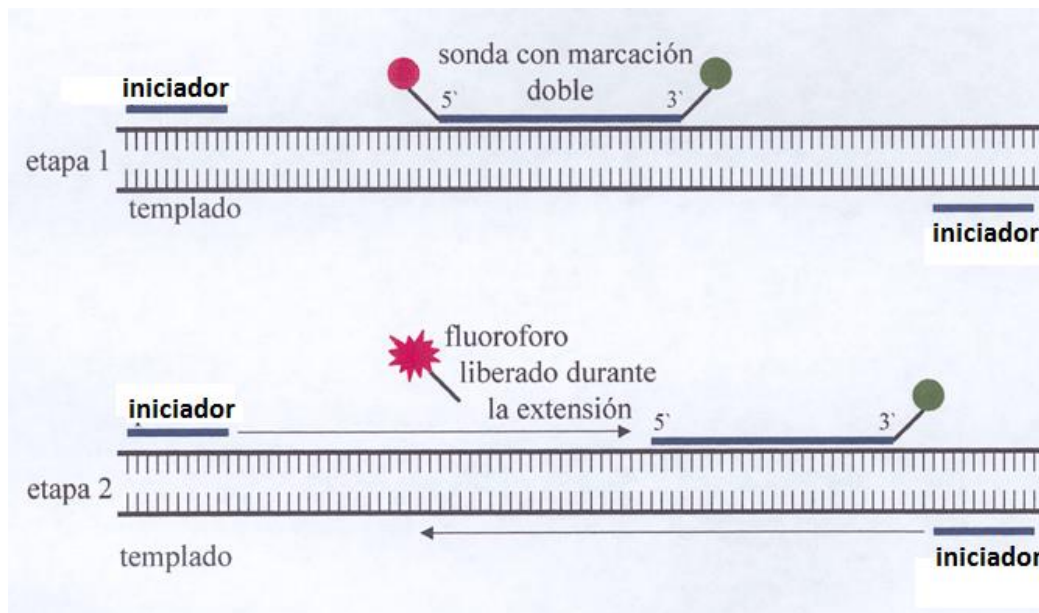


Figura 8. Amplificación por medio de fluorescencia para PCR en tiempo real.
Tomado de Corvalan, 2012.

1.7.5.3. Microarreglos de baja densidad de una marca comercial para la detección de micobacterias.

Los microarrays o biochips son formatos en los que el producto amplificado por PCR se va a hibridar con sondas que se encuentran inmovilizadas en un soporte de sílice o vidrio. Su principal ventaja es que permite incorporar un mayor número de sondas que los ensayos de sondas en línea. Por lo tanto, con un notable incremento en la capacidad, tanto para la identificación de especies. En la actualidad, existen disponibles modelos comercializados o que pueden diseñarse a medida según el objeto de estudio. La sensibilidad y especificidad



para la detección de mutaciones de resistencia sobre aislados ha sido buena, sin embargo no se conoce su rendimiento sobre muestras clínicas.

Aunque se trata de una tecnología de costo elevado, existen modalidades de microarrays denominados de “baja densidad” mucho más económicos, que requieren una infraestructura mínima y por lo tanto más fácil de introducir en la rutina diagnóstica, permitiendo analizar la presencia o ausencia microorganismos de interés médico, como la detección de micobacterias.



2. Antecedentes

Las secuencias de inserción (IS) en el bacilo tuberculoso, son elementos genéticos que no codifican marcadores fenotípicos, pero si codifican para su propia transposición; las IS son pequeñas secuencias de 200 a 1 500 pb.

IS6110 es una secuencia repetitiva de la familia IS, se encuentra con muy pocas excepciones en todos los miembros del grupo de *Mycobacterium tuberculosis* y está aparentemente restringido a este grupo de microorganismos. Esta secuencia, que tiene 1335 pb, se encuentra más o menos aleatoriamente distribuida alrededor del genoma (figura 9), su número va desde 0 a 30 (Cole y col., 1998).

En los últimos años se viene haciendo estudios para acortar el tiempo de diagnóstico de tuberculosis. Se han evaluado diversos métodos, desde ELISA (Chan y col., 2000) hasta las distintas pruebas moleculares disponibles. Babu, en el año 2001 hizo una evaluación de PCR para detectar TB en líquido pleural, encontrando una sensibilidad de 70% y una especificidad de 100%, en este estudio se hizo además una comparación con otras herramientas diagnósticas para TB tales como la tinción BAAR y el test de adenosina deaminasa (ADA) (Nagesh y col., 2001).

También en el año 2001, Boruh pretende desarrollar una prueba simple, rápida y sensible para diagnosticar TB a partir de diversas muestras clínicas tales como esputo, aspirado bronquial, orina, líquido cefalorraquídeo. Boruh usó las secuencias de inserción IS6110 y la secuencia IS990. Se encontró una sensibilidad y especificidad de 96,5% y 95,3 % (Borun y col, 2001).

Otro estudio realizado por Hasaneen el año 2003 presenta la técnica de PCR como un método rápido de diagnóstico en biopsias pleurales antes de haber recibido el tratamiento convencional de embebido en parafina. Hasaneen encontró una sensibilidad de 90% y una especificidad de 100% para PCR. En este estudio se recomendaba el uso de PCR para diagnóstico de TB en combinación con otros métodos tales como cultivo y examen histopatológico (Hasaneen y col, 2003).

Park y col., en el año 2003 hicieron una comparación entre PCR y características histopatológicas en especímenes embebidos en parafina. Park encontró gran variación de sensibilidad y especificidad de acuerdo a las diversas condiciones histopatológicas. Al compararlo con el diagnóstico clínico, él observó que el PCR tenía una sensibilidad y especificidad de 78% y 88% respectivamente (Park y col, 2003).

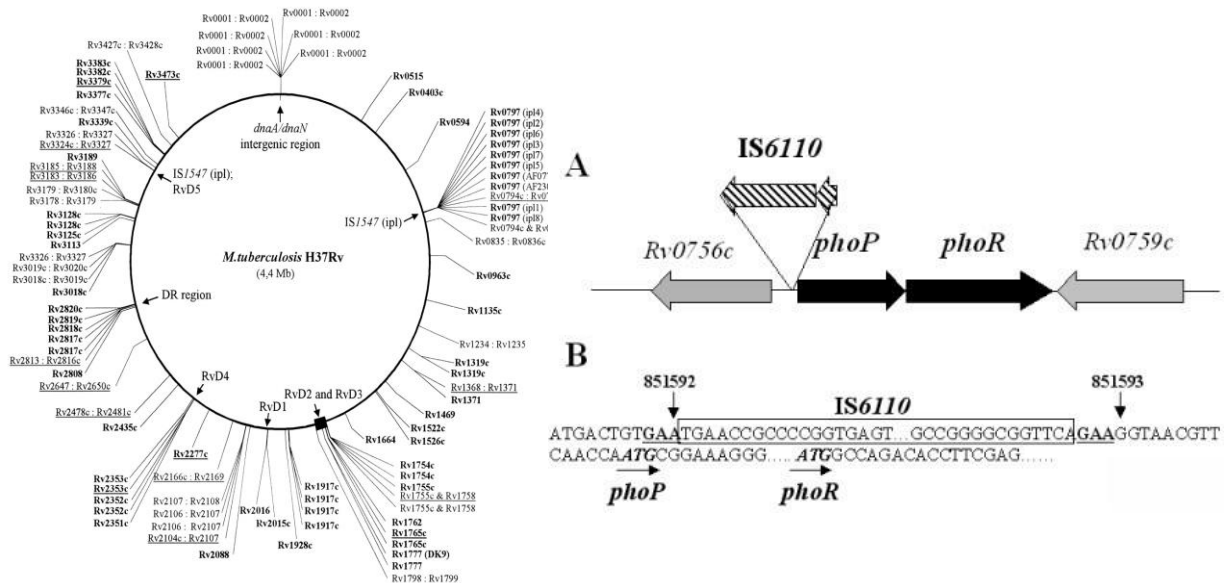


Figura 9. Genoma de la cepa H37Rv para *Mycobacterium tuberculosis* y sus diferentes regiones. Tomado de Supply y col., 2000

Por otro lado, para el caso de las MNT, detectaron por que han empezado a tomar importancia debido al tipo de infecciones que pueden llegar a causar, no solo en pacientes inmunosuprimidos, sino también en personas inmunocompetentes. Se estima que un 12% de la población inmunocompetente, sufre de alguna infección por MNT. Las especies que más se reportan son: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, y *M. fortuitum*, entre otras. La frecuencia de aislamiento varía entre un 0.1- 17% dependiendo del país. Las enfermedades más comunes que causan son: cistitis, infecciones en hígado, riñón, pulmón, piel, nódulos linfoides, entre otros (Field y col., 2006).



3. Planteamiento del problema.

La TB a nivel mundial se encuentra dentro de las enfermedades bacterianas causantes del 90% de las defunciones en el mundo. En México se reportó 1,759 casos de muertes a causa de esta enfermedad en el 2011, debido a esto y aunado a la resistencia que presenta a medicamentos, se debe realizar el diagnóstico oportuno de las micobacterias.

En el Hospital Juárez de México se cuenta con una prueba de diagnóstico basada en microarreglos de baja densidad, que permiten la detección del complejo MTBC y MNT de manera simultánea, sin embargo muestra poca sensibilidad y por ello se presentan falsos negativos, siendo que estos pacientes tienen cuadro clínico de tuberculosis, además de tener un costo elevado comparado con otras metodologías, lo que repercute directamente en los pacientes que acuden al servicio de diagnóstico molecular, ya que son de bajos recursos, siendo inaccesible el diagnóstico con esta técnica. Por esta razón es importante realizar métodos de diagnóstico de Biología Molecular de bajo costo y mayor sensibilidad.

4. Justificación

En el hospital Juárez de México en el servicio de Genética y diagnóstico molecular en el 2012, se evaluó externamente la eficacia de los microarreglos, dando como resultado, muestras positivas, que por el Microarreglo fueron reportadas como negativas, debido a esto y a la importancia del diagnóstico oportuno, se decidió implementar técnicas como el PCR en tiempo real y de punto final, las cuales puedan identificar a micobacterias frecuentes en la población mexicana, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, y de tal manera se puedan entregar rápidamente y oportunamente el resultado, para su adecuado tratamiento, considerando un precio accesible, para los pacientes vulnerables que acuden a dicho Hospital.



5. Hipótesis

Las metodologías de PCR en tiempo real y PCR de punto final, son más sensibles, específicas y económicas para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* y las micobacterias no tuberculosas en población mexicana, en comparación de los microarreglos de baja densidad (chipron).

6. Objetivos

6.2. Objetivo general.

- Comparar y proponer un método alternativo de alta sensibilidad, especificidad, y de bajo costo, que entregue un resultado en un menor tiempo para la detección de *MTBC*.

6.3. Objetivo específicos.

- Comparar las metodologías de PCR de punto final, tiempo real y microarreglos en muestras positivas para micobacterias del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y del Hospital Juárez de México (HJM).
- Evaluar la sensibilidad y especificidad, de estos métodos para la detección de micobacterias.
- Evaluar cuál es el método más económico para la identificación del *MTBC*.



7. Material y métodos.

7.1. Muestras clínicas

Se emplearon 74 muestras de pacientes tanto del Hospital Juárez de México, así como del INDRE, (tanto negativas como positivas) y se evaluaron todas a doble ciego. Estas fueron obtenidas de expectoración, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido sinovial, sangre, y orina.

7.2. Extracción de DNA bacteriano.

Para en el caso de las muestras líquidas (del Hospital Juárez de México) se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min para concentrar el paquete celular, para las expectoraciones se le agregó N-acetilcisteína, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, posteriormente se tomaron 200 µl para el proceso de extracción.

La extracción del DNA bacteriano se realizó con el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit® (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) realizando los siguientes pasos:

- a. Antes de iniciar con la extracción ADN de las micobacterias se preparó la zona de trabajo y se irradió con luz ultravioleta el material necesario para la extracción.
- b. A las muestras (líquido cefalorraquídeo o pleural, líquido sinovial, sangre, expectoración y orina) se agregaron 200µl en un tubo eppendorf nuevo, en el caso de biopsias, se agregó aproximadamente 25-50mg de tejido a un tubo nuevo.
- c. Se adicionó 200µl de buffer de lisis y 40µl de la proteinasa k, a cada tubo con muestra líquida o biopsia, se mezcló e incubó durante 30-50 min a 55°C. Posteriormente se agregaron 200µl Binding Buffer, se mezcló e incubó durante 10 min a 70°C.
- d. Inmediatamente después se adicionaron 100µl de isopropanol y se homogenizó la mezcla. Posteriormente se colocó la mezcla a una columna de sílica nueva.
- e. Después se centrifugó la columna con la mezcla a 9000 rpm y se desechó el tubo colector, se colocó un tubo colector nuevo y se agregaron 500µl Inhibitor Removal Buffer a la columna, nuevamente se procedió a centrifugar a 9000 rpm por 1 min.



- f. Se cambió el tubo colector y a la columna donde estaba la muestra se le agregó 500µl Wash Buffer, se centrifugó 9000 r.p.m por 1 min, y se desechó el tubo colector.
- g. Posteriormente se cambió el tubo colector y a la columna se le agregó 500µl Wash Buffer y se centrifugó a 13000 rpm por 3 min. Se volvió a desechar el tubo colector.
- h. Debidamente identificado se colocó el filtro de la columna en un tubo eppendor nuevo y se procedió a diluir el DNA total y el bacteriano.
- i. Se agregó a la columna 80µl del buffer de elusión precalentado a 70°C. Se centrifugó a 9000 rpm por 3 min y se desechó el filtro de la columna.
- j. Se cuantificó el ADN y se observó su integridad en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.
- k. Finalmente se almaceno el ADN a - 20°C para conservar el material genético hasta su análisis.

7.3. Estandarización para PCR en tiempo real.

Diseño de los iniciadores y sonda específica para el complejo de MTBC, así como la evaluación del gen constitutivo RNAsaP.

Para la PCR en tiempo real se realizó el diseño de los iniciadores, así como la estandarización de las condiciones de amplificación, primero para MTBC, con su respectiva región homologa, para esto se empleó la base de datos del genoma de la bacteria de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, donde se localizó la región de inserción IS6110 y a partir de esto, se diseñaron los iniciadores y la sonda con la ayuda del programa con dirección electrónica Primer3Plus, estos amplifican las secuencias homologas entre los integrantes del MTBC. Después se sintetizaron los iniciadores específicos ya reportados de un gen constitutivo que codifica para la RNAsaP, con la finalidad de validar la toma de muestra, el proceso de extracción y la PCR de la muestra. Ambos pares de iniciadores se verificaron por medio del programa “BLAST” <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Para preparar la mezcla de la PCR en tiempo real dúplex se empleó TaqMan® Universal PCR (Branchburg, NJ), partiendo que los iniciadores para la detección de MTBC y



RNAsaP todo se estandarizó a una concentración de 10 pmoles y la sonda a 20 pmoles. Tal como se muestra en el cuadro 2.

7.4. Condiciones de amplificación para PCR en tiempo Real.

Se realizó la amplificación del MTBC a partir de las extracciones de ADN de las 66 muestras ya procesadas en el HJM y del INDRE, por medio del PCR en tiempo real. Para el caso del MTBC y del gen constitutivo se amplificaron con sus respectivos oligos y sonda* marcadas con diferentes flouoroforos para poder diferenciar en una misma reacción y ver el resultado para ambos casos. Todo esto se hizo en el equipo Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (USA).

Cuadro 2. Iniciadores para la amplificación por PCR en tiempo real para tuberculosis y el gen RNAsaP.

Iniciador	Secuencia	Producto (pb)	Especie
forward	5'- ACCTAACCGGCTGTGGGTAGC - 3'	131 bp	MTBC
Sonda	JOE - CTCACCTATGTGTCGACCTGGG		
reverse	5'- AGGTGGCCATCGTGGAAGC - 3'		
forward	5'- CCAAGTGTGAGGGCTGAAAAG - 3'	80 bp	RNaseP
Sonda	FAM-CCCCAGTCTCTGTCAGCACTCCCTTC		
reverse	5' TGTTGTGGCTGATGAACTATAAAAGG -3'		

Paso para realizar el PCR de tiempo Real.

1. Se esterilizó todo el material necesario para el PCR de tiempo real.
2. Dependiendo del número de muestras se preparó la reacción, agregando los iniciadores y la sonda para el complejo *MTBC*, así como los iniciadores para el gen RNAsaP con su respectiva sonda. (Cuadro 3)
3. Las condiciones de amplificado fueron tal como se muestra en la (cuadro 4).



Cuadro 3. Mezcla para la amplificación por PCR en tiempo real para tuberculosis y el gen RNAsaP

Detección del complejo <i>MTBC</i> y gen constitutivo RNAsaP por PCR en Tiempo real	
Reactivo	Volumen de reactivo por reacción
TaqMan® Universal PCR	N x 12.5 µL
Mezcla de iniciadores F, R y Sonda (JOE) TaqMan para MTBC	N x 3 µL
Mezcla de iniciadores F, R y Sonda (FAM) TaqMan para RNAsaP	N x 3 µL
H ₂ O	N x 1.5 µL
Volumen final por tubo	20 µL X rx
DNA total	5 µL
Volumen total	25 µL

El volumen final para una reacción de-PCR fue de 25 µL.

Cuadro 4. Condiciones para la amplificación por PCR en tiempo real para tuberculosis y el gen RNAsaP.

Ciclos PCR en tiempo real para la amplificación	
95°C por 10 minutos	
40 Ciclos	95°C por 15 segundos
	58°C por 1 minuto (JOE)



7.5. Evaluación para PCR de punto final.

Para el caso del PCR de punto final se utilizaron los iniciadores y las condiciones que amplifican a las MNT de acuerdo a lo reportado por (Pérez y col 2008).

Se realizó la amplificación a partir de la región de rRNA 16S, la cual es una región que se usa para clasificar taxonómicamente a las bacterias MNT más prevalentes en la población mexicana, por medio de un PCR múltiplex para detectar *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscesus*, *M. gordonae* y los iniciadores son los siguientes, dependiendo del producto de PCR se determina la especie (figura 10). Cuando la banda es de 1000 pb se realizó otro PCR multiplex con otros iniciadores para detectar, *M. avium* o *M. intracellulare*. (Cuadro 5).

Cuadro 5. Iniciadores para la amplificación por PCR de punto final de las micobacterias no tuberculosas.

Iniciador	Secuencia	Producto (pb)	Especie
Rac 1	5' TCGATGATCACCGAGAACGTGTTC-3'	900	<i>M. avium</i>
Mycav-R	5' ACCAGAAGACATGCGTCTTG 3'		
Mycint-F	5' CCTTTAGGCGCATGTCTTTA 3'	176	<i>M. intracellulare</i>
Rac 8	5' - CACTGGTGCCTCCCGTAGG- 3'		

Rac 1	5' TCGATGATCACCGAGAACGTGTTC-3'	1100	<i>M. fortuitum</i>
		1200	<i>M. chelonae</i>
Rac 8	5' - CACTGGTGCCTCCCGTAGG- 3'	1300	<i>M. abscesus</i>
G1	5' CCCTACGCAGACTGACAGCAA-3'	407	<i>M. gordonae</i>
G2	5' - :AGCCACCGACGAACCCC- 3'		

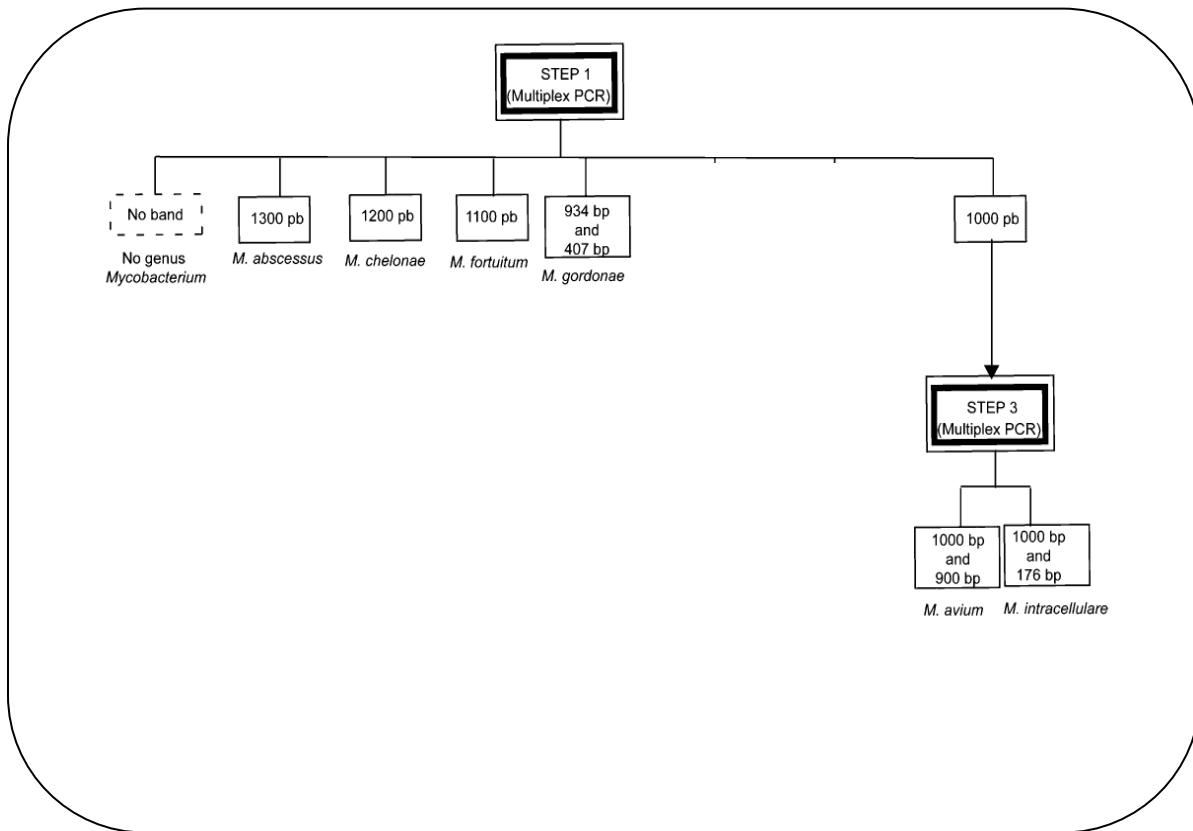


Figura 10. Pesos moleculares esperados para la detección de las micobacterias no tuberculosas, más frecuentes en población mexicana.

El termociclador empleado fue SEETTMAMP (USA). El procedimiento fue el siguiente:

1. Se esterilizó todo el material necesario para el PCR punto final.
2. Dependiendo del número de muestras se preparó la reacción (Cuadro 6).
3. Se pusieron las condiciones en el termociclador (cuadro 7)



Cuadro 6. Mezcla para la amplificación por PCR de punto final para micobacterias no tuberculosas.

Micobacterias no tuberculosas.	
Reactivo	Volumen de reactivo por reacción
AccuPrime™ SuperMix II	N x 12.5 µL
RAC 1	N x 1 µL
RAC 8	N x 1 µL
G1	N x 1 µL
G2	N x 1 µL
H2O	N x 3.5 µL
DNA TOTAL	5 µL
Volumen total	25 µL

El volumen final para una reacción de-PCR fue de 25 µL.

Cuadro 7. Condiciones para la amplificación por PCR de punto final para las micobacterias no tuberculosas.

Ciclos PCR de punto final para la amplificación	
95°C por 2 minutos	
40 Ciclos	95°C por 30 segundos
	55°C por 1 minuto
	72°C por 2 minutos
72°C por 2 minutos	
4 °C ----- ∞	



7.6. Microarreglos (plataforma comercial).

Se realizó el PCR de punto final, a partir de las extracciones de ADN de las 74 muestras ya procesadas del HJM y del INDRE con las condiciones mencionadas en el kit, tanto para el género de *Mycobacterium*, donde se encuentran las MNT y el MTBC (iniciador A), y para el MTCB (iniciador B).

El termociclador empleado fue SEETMAMP. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se esterilizó todo el material necesario para el PCR punto final.
2. Dependiendo del número de muestras se preparó 2 reacciones, una para el género de micobacterias (iniciador A) y la otra para MTBC (Iniciador B). (cuadro 8)
3. Se emplearon las condiciones de amplificación ya establecidas del kit de los microarreglos. (Cuadro 9)

Cuadro 8. Mezcla para la amplificación por PCR de punto final para todas las micobacterias a nivel de género.

Detección del genero Myt (MNT Y MTCB)	
Reactivo	Volumen por reacción
AccuPrime TM SuperMix II	N x 12.5 µL
Iniciador A (Myt)	N x 0.5 µL
H ₂ O	N x 7 µL
Volumen final por tubo	20 µL X rx
DNA total	5 µL
Volumen total	25 µL



Cuadro 9. Mezcla para la amplificación por PCR de punto final para complejo tuberculosis.

Detección del MTCB	
Reactivo	Volumen por reacción
AccuPrime™ SuperMix II	N x 12.5 µL
Iniciador B (MTBC)	N x 0.5 µL
H ₂ O	N x 7 µL
Volumen final por tubo	20 µL X rx
DNA total	5 µL
Volumen total	25 µL

Se realizaron tres pasos para obtener los resultados de Microarreglos:

a) Hibridación

- Se preparó la solución de hibridación, y se colocaron 220µl de buffer de hibridación, posteriormente se agregaron 20µl de solución moduladora en un tubo eppendor de 600µl, de allí se tomaron 24µl de la mezcla y se colocaron en un tubo eppendor de PCR por muestra. A cada tubo con la mezcla se le agrego 5µl del producto del iniciador A más 5µl del B.
- De la mezcla de hibridación, se tomó 30µl y se agregó al microarreglo (capacidad para 6 muestras, un control positivo y negativo). se colocaron en los pozos correspondientes del microarreglo, y posteriormente se colocó en una cámara húmeda. Se dejó hibridar durante 30 min a 37 C en un baño maría.
- Se preparó un litro de solución de lavado, la cual se empleó para realizar los lavados para el chip.



- Después de incubar el chip se sacó del baño y se procedió a realizar, el lavado en tres recipientes distintos con solución de lavado, después se le dio un spin de 3 minutos al chip.

b) Marcaje

- Se preparó la solución de marcaje con 270 μ l de buffer de dilución, más 30 μ l de solución moduladora y 2 μ l de marcador. Se le agregó a cada pozo del chip 30 μ l de la mezcla y se incubó por 5min a temperatura ambiente.
- Se realizaron tres lavados y se le dio un spin al chip.

c) Revelado

- Se agregó 30 μ l de solución reveladora a cada pozo del chip, se incubó durante 3 min, y posteriormente se realizaron los tres lavados y el spin de tres minutos.
- Por último se visualizó el chip con el Scanner PF3650u y la ayuda de la computadora, donde se hizo el análisis, donde se pudo identificar el género *Mycobacterium*, y las especies del MTB o MNT, si la muestra fuera positiva.



8. Resultados.

8.1. Detección del gen constitutivo RNAsaP detección del gen constitutivo RNAsaP

Primero se evaluó la presencia del gen constitutivo RNAsaP por PCR en tiempo real, el cual se encuentra presente en casi todas las células del humano, con esto se asegura la presencia o ausencia de ADN en las muestras (figura 11). Los resultados mostraron que hubo amplificación por fluorescencia de la sonda marcada con FAM de las 74 muestras, las cuales posteriormente, fueron empleadas para realizar las metodologías de microarreglos de baja densidad (chipron), PCR en tiempo real, y PCR de punto final.

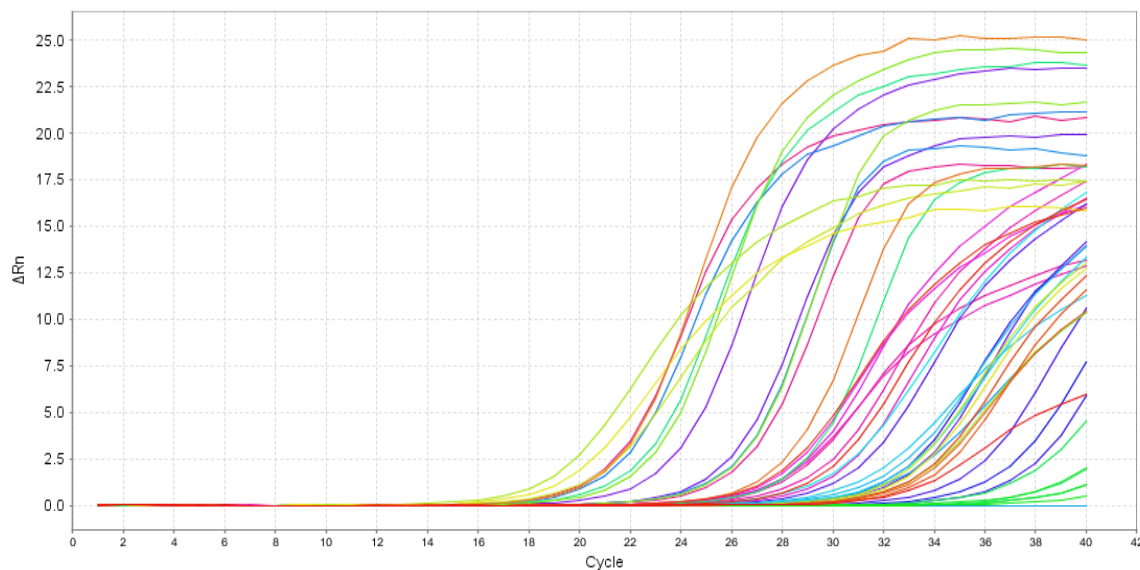


Figura 11. Detección por PCR en tiempo Real de la fluorescencia del gen RNAsaP.

Posteriormente se evaluaron las 74 muestras por ambos métodos (microarreglos y PCR en tiempo real), y además se decidió evaluar al mismo tiempo las MNT (PCR punto final).

Las muestra reportadas previamente y las evaluadas al doble ciego fueron comparadas por la técnica de microarreglos de baja densidad, así como por las metodologías de PCR en tiempo Real para detectar MTBC y por PCR de punto final para MNT, donde de las 74 muestras, que se reportaron en el InDRE y el HJM, 20 fueron positivas para MTBC (figura 12), y 6 muestras para diferentes especies del MNT (figura 13).



Detección de MTBC

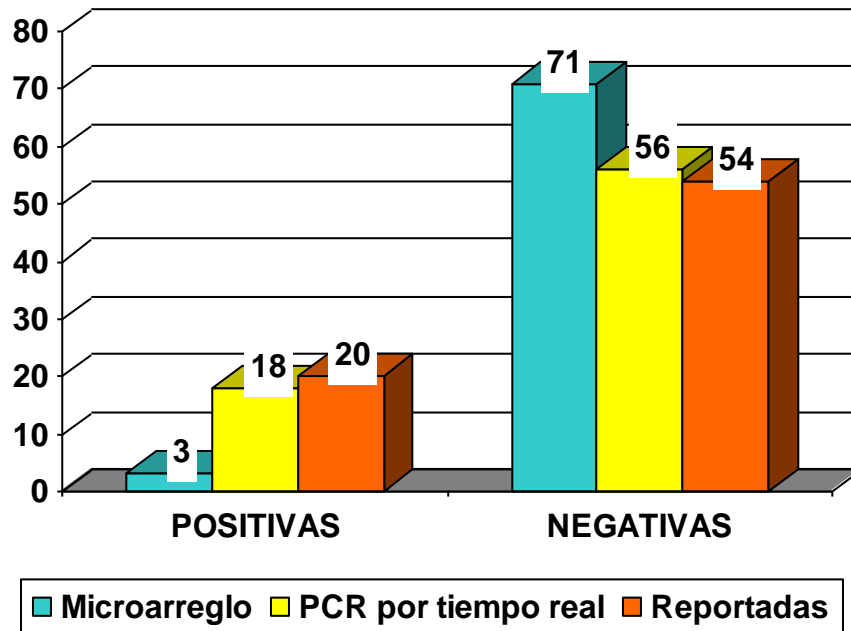


Figura 11. Muestras a doble ciego comparadas con los resultados encontrados por las metodologías de Microarreglos de baja densidad (chipron) y por PCR en tiempo real, para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 12. Muestras a doble ciego comparadas con los resultados encontrados por las metodologías de...

8.2. D

Detección de MTBC por PCR en tiempo real.

Usando la secuencia de inserción IS6110, y tomando como referencia un valor de ct entre 25-36 ciclos, se amplificaron por PCR en tiempo real, las 74 muestras al doble ciego, dando como resultado la fluorescencia de la sonda marcada con JOE de 18 muestras positivas para MTBC. (Figura 14).

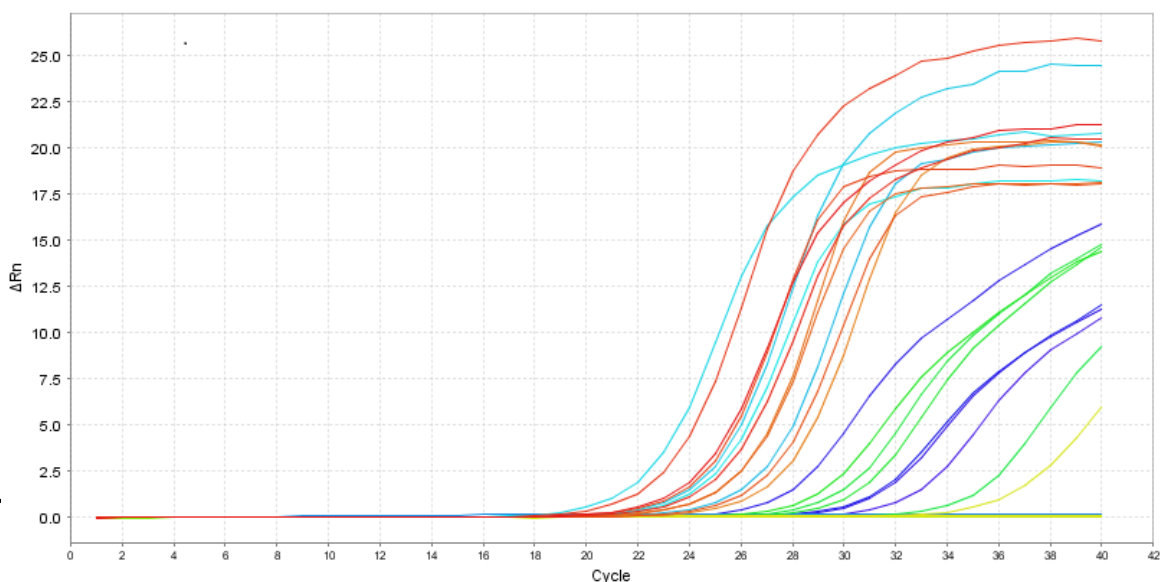
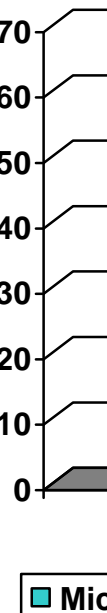


Figura 14. Detección por PCR en tiempo Real de la fluorescencia de MTBC.



■ Mic

8.3. Detección de MNT por PCR de punto final.

Para el caso de las micobacterias no tuberculosas, se evaluó por PCR de punto final la amplificación de la región rRNA 16S, la cual permite la identificación de género y especies bacterianas. Dando como resultado la presencia 6 muestras positivas para diferentes MNT de las 74 muestras a doble ciego ya reportadas (figura 15).

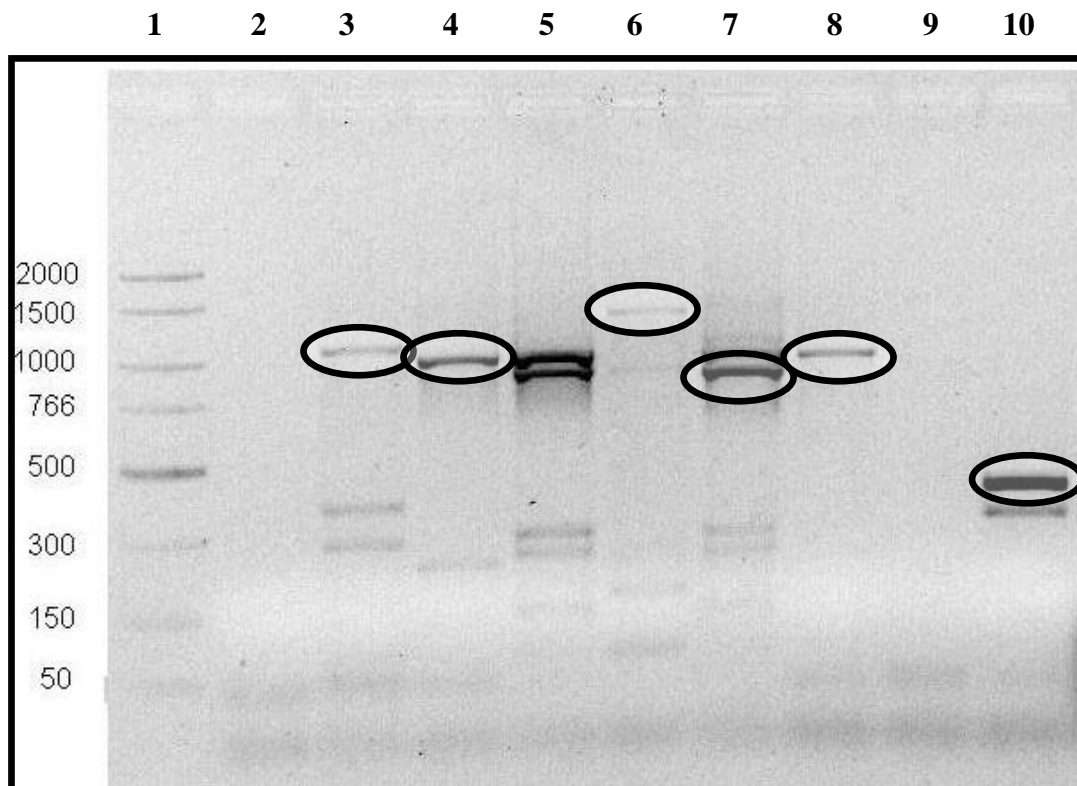


Figura 15. Electroforesis de MNT mediante la región rRNA 16S por PCR de punto final. **Carril 1** (marcador de peso molecular de 50pb a 2000 pb). **Carril 2** (Control negativo). **Carril 3** (*Mycobacterium fortuitum* - 1100 pb). **Carril 4** (*Mycobacterium intracellulare* - 1000 pb). **Carril 5** (*Mycobacterium tuberculosis* - 934 o 1031) pb). **Carril 6** (*Mycobacterium abscesus* - 1300 pb). **Carril 7** (*Mycobacterium kansasii* - 934 pb). **Carril 8** (*Mycobacterium Avium* - 1000 pb). **Carril 9** (*Mycobacterium Bovis* - 934 pb) y **Carril 10** (*Mycobacterium gordonae* - 934 o 407 pb).

8.4. Detección de MTBC y MNT por microarreglos de baja densidad (chipron)

Para el caso de los microarreglos comerciales de baja densidad, se amplificaron las 74 muestras, con los iniciadores incluidos en kit. Para la detección del género *Mycobacterium* se usó el iniciador A y para el complejo tuberculosis el iniciador B, posteriormente los productos de PCR se hibridaron, marcaron y por último se escanearon, con el software MYCO Direct 1.7 que incluye el kit, esto es para ver la distribución de los puntos de hibridación de cada uno de los chips de cada muestra.

Dependiendo de la amplificación e hibridación el software del Microarreglo ubica y localiza con la plantilla (figura. 16) las micobacterias, dando como resultado 3 muestras positivas para MTBC (figura 17), y 5 muestras positivas para el caso de las MNT (figura 18 y 19).

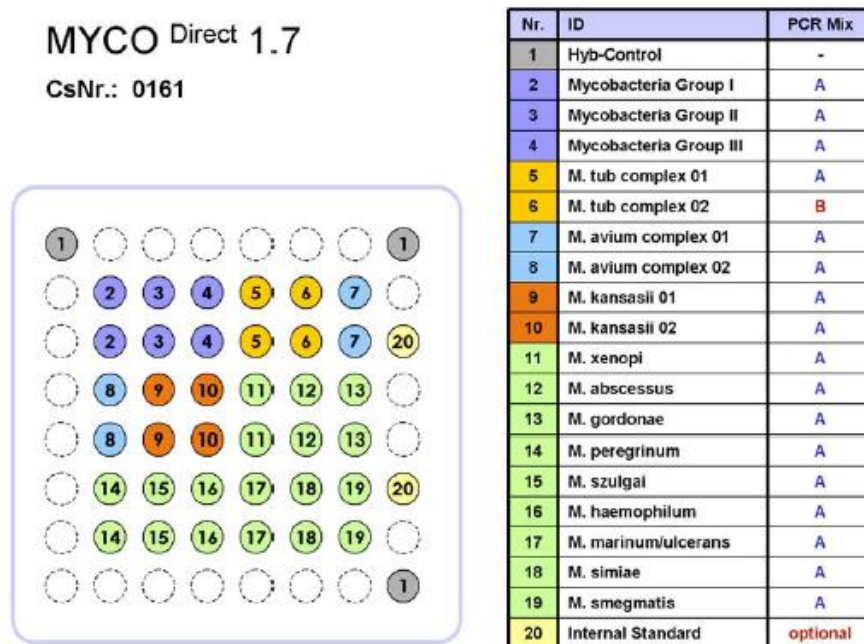


Figura 16. Plantilla para la interpretación de resultados para MTBC y MNT

✓ Detección de MTBC por microarreglos comerciales de baja densidad (chipron)

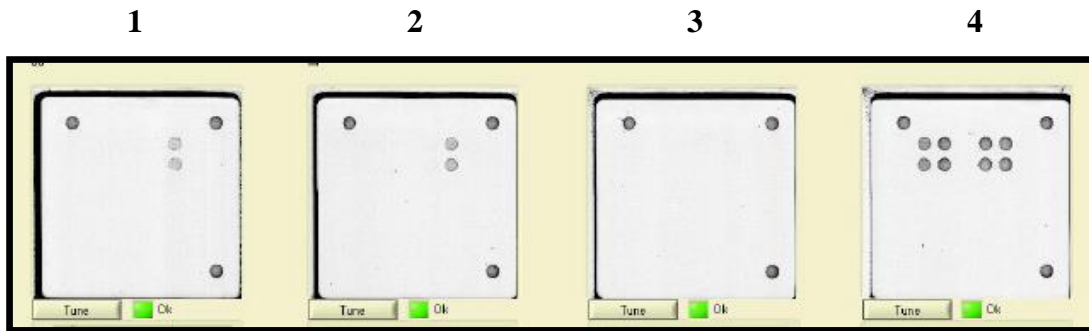


Figura 17. Hibridación de arreglos comerciales. (1 y 2) muestras positivas para MTBC; (3) Control negativo y (4) muestra positiva para MTBC.

✓ Detección de MNT por microarreglos comerciales de baja densidad (chipron).

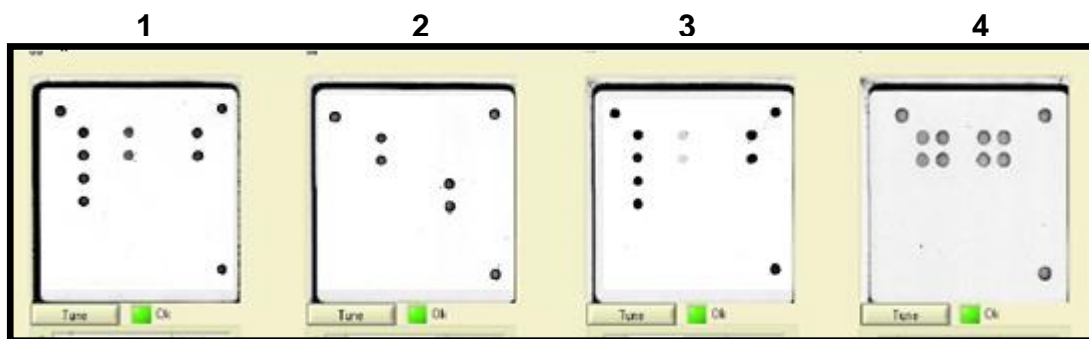


Figura 18. Hibridación de arreglos comerciales. Muestras positivas a (1) *M Intracellulare*; (2) *M. Abscesus*; (3) *M. avium* y (4) *M. tuberculosis*.

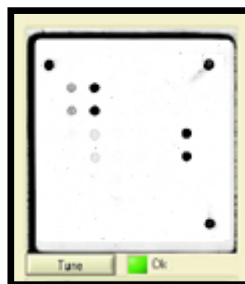


Figura 19. Hibridación de arreglo comercial. Muestra positiva a *M. Gordonae*.



8.5. Comparación de PCR en tiempo real, punto final y los microarreglos.

Las metodologías para la detección de MTBC por tiempo real, y las MNT por PCR de punto final, fueron comparadas con el Microarreglo de baja densidad (chipron) y los resultados se muestran en el (cuadro 10 y 11) respectivamente.

Cuadro 10. Resultados obtenidos por las diferentes metodologías para MTBC

COMPARACION EN LA DETECCIÓN MTBC			
	Muestras reportadas	Microarreglos para la detección de MTBC	PCR en tiempo real
Positivas	20	3	18
Negativas	54	71	56

Cuadro 11. Resultados obtenidos por las diferentes metodologías para MNT

COMPARACION ENTRE METODOS PARA LA DETECCION DE MNT			
	Muestras reportadas	Microarreglos para la detección de MNT	PCR en punto final
Positivas	6	5	6
Negativas	68	69	68



8.6. Evaluación de la sensibilidad del PCR en tiempo real y el PCR de punto final del microarreglo comercial para la detección de MTBC

El límite de detección se realizó a partir de la extracción del ADN de la cepa H37Rv de la bacteria de tuberculosis, donde se cuantificó con el nanofotómetro® Implen (Germany), dando un valor de 20.9 ng/ μ L.

Posteriormente este valor se le aplicó el cálculo de los equivalentes genómicos o número de copias por microlitro, esto con la finalidad de poder sacar posteriormente el límite de detección del método del PCR en tiempo real, dando como resultado de 4'334,734.848 copias/ μ L.

Posteriormente el ADN de la cepa de la bacteria, se amplificó por PCR en tiempo real, donde se realizaron 10 reacciones por triplicado para validar el resultado en forma de diluciones seriadas, esto es con la finalidad de encontrar el límite de detección. En total se hicieron 6 diluciones 1:10, partiendo del valor relativo inicial de 4,334,734.848 copias/ μ L y llegando hasta la dilución 1:100000 que fue 4.3 copias/ μ L (figura 20). Como resultado se observó que el PCR en tiempo real tiene límite de detección de 4.3 copias/ μ L (figura 21).

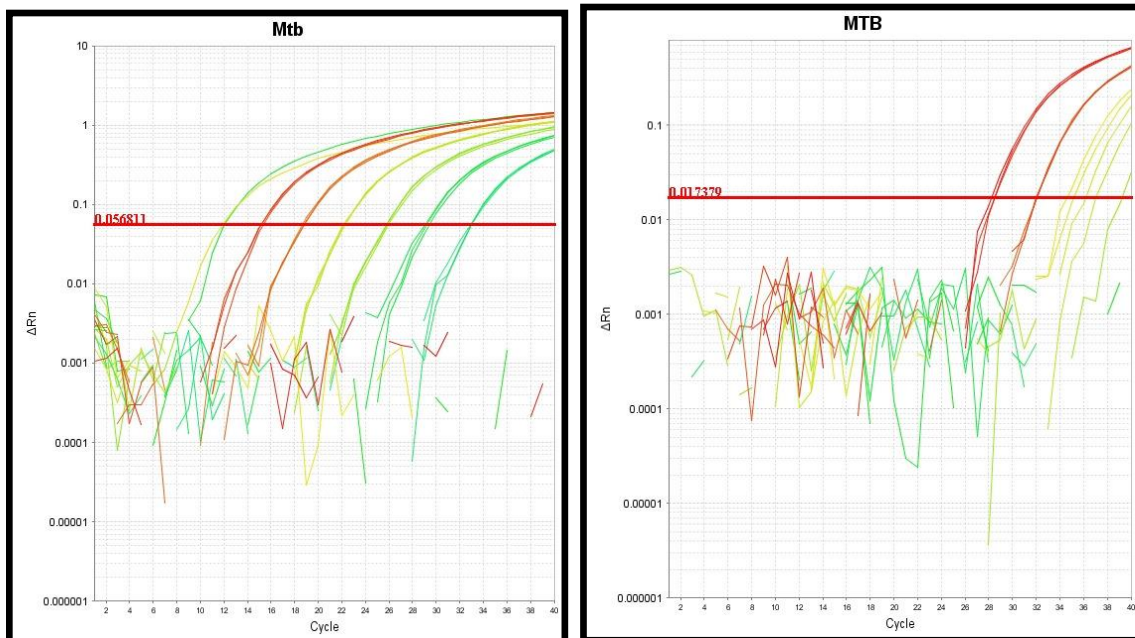


Figura 21. Diluciones seriadas por triplicado del DNA de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR por tiempo real



En el caso del microarreglo solamente se evaluó el límite de detección del PCR de punto final del iniciador B, con el ADN de la cepa H37Rv de la bacteria de tuberculosis, de la misma manera que en tiempo real, haciendo 6 diluciones seriadas de 1:10 hasta 1:1000000, para que posteriormente por electroforesis, se determinara el límite de detección, el cual mostro bandas tenues hasta la dilución 1:10000, asignándole un valor en base a las diluciones de 400 copias/ μ L (figura 22 y 23).

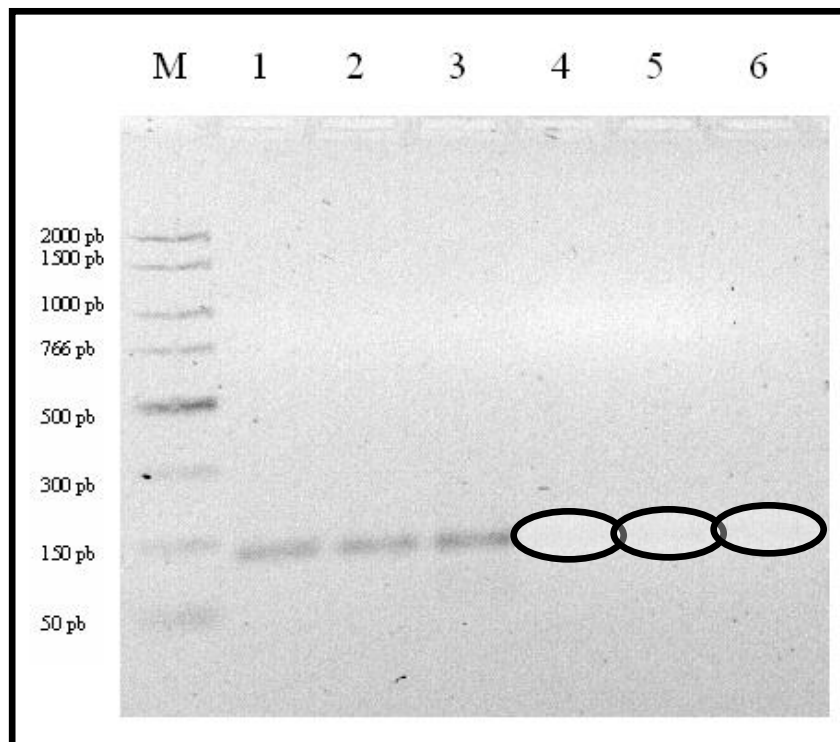


Figura 23. Electroforesis del PCR de los microarreglos del DNA de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, carril M; marcador de peso molecular de 50pb a 2000pb, Carril 1,2 y 3 dilución 1:1000 carriles 4, 5 y 6 diluciones 1:10000



8.7. Prueba estadística (coeficiente de kappa)

El coeficiente kappa refleja la concordancia inter-observador y puede ser calculado en tablas de cualquier dimensión, siempre y cuando se contrasten dos observadores. El coeficiente kappa puede tomar valores entre -1 y +1. Mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia inter-observador, por el contrario, mientras más cercano a -1, mayor es el grado de discordancia inter-observador (figura 25). Un valor de $\kappa = 0$ refleja que la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar. (Cerdeja y col, 2008)

Valoración del Índice Kappa	
Valor de k	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Débil
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 1.00	Muy buena

Figura 24. Tabla de índice de Kappa.

Aplicación del coeficiente de kappa entre los métodos evaluados.

[1] Concordancia entre Muestra reportadas - Microarreglo baja densidad (Chipron, para MTBC).

Nivel de confianza: 95.0%
Número de categorías: 2

Tabla de clasificaciones

	1	2
1	3	17
2	0	54

Acuerdo observado: 0.7703
Acuerdo esperado: 0.7111

	EE	IC (95.0%)	
	0.2048	0.1026	0.4060



[2] Concordancia entre Muestra reportadas - PCR en tiempo real, para MTBC.

Nivel de confianza: 95.0%
Número de categorías: 2

Tabla de clasificaciones

	1	2
1	18	0
2	0	54

Acuerdo observado: 1.0000
Acuerdo esperado: 0.6250

	EE	IC (95.0%)	
1.0000	0.0000	1.0000	1.0000

[3] Concordancia entre Muestra reportadas a doble ciego - Microarreglo baja densidad (Chipron) para MNT.

Nivel de confianza: 95.0%
Número de categorías: 2

Tabla de clasificaciones

	1	2
1	5	1
2	0	68

Acuerdo observado: 0.9865
Acuerdo esperado: 0.8623

	EE	IC (95.0%)	
0.0970	0.7117	1.0000	



[4] Concordancia entre Muestra a doble ciego - PCR de punto final para MNT.

Nivel de confianza: 95.0%
Número de categorías: 2

Tabla de clasificaciones

	1	2
1	6	0
2	0	68

Acuerdo observado: 1.0000
Acuerdo esperado: 0.8510

Kappa	EE	IC (95.0%)	
	0.0000	1.0000	1.0000

En base a la valoración del índice de kappa se obtuvo, primero la comparación entre el Microarreglo comercial para la detección de MTBC, presento un valor de concordancia pobre en comparación a los resultados reportados en el INDRE y el HJM.

Para el caso del valor de concordancia entre los valores reportados y el PCR en tiempo real implementado, muy buena concordancia de resultados.

Ahora para la valoración de concordancia tanto en el Microarreglo comercial como en el PCR de punto final propuesto para la detección de MNT, resultado ser también muy buena (Cuadro 12).

Cuadro 12. Valores de concordancia de los microarreglos y las metodologías propuestas.

Concordancia entre métodos	Valor de kappa
Doble ciego- Microarreglo para MTBC	0.2048
Doble ciego- PCR en tiempo real para MTBC	1.000
Doble ciego- Microarreglo para MNT	0.9019
Doble ciego- PCR de punto final para MNT	1.000



9. Discusión

Actualmente la tuberculosis ha tenido un aumento en el número y gravedad de los casos con TB en todo el mundo. Esto es debido fundamentalmente a los problemas económicos de muchos países y, por el deterioro de los programas de control sanitario, aunado a la pandemia SIDA, así como de los grandes asentamientos de poblacionales.

En México en el 2013 se han reportaron 669 casos y para el primer mes del 2014, se han reportado 563 casos, esto debido a que hay grupos de población que se encuentran en condiciones vulnerables de adquirir la enfermedad, como es el caso de los migrantes, presos, indigentes, y los enfermos inmunosuprimidos o con diabetes mellitus tipo 2. Además, en los últimos diez años, la incidencia de infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas (MNT) también se ha incrementado.

Por lo tanto, el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de EUA ha sugerido, que en el caso de infecciones micobacterianas se realice el diagnóstico a nivel de especie, ya que el tratamiento de la TB es diferente del que se administra a pacientes infectados con MNT (Piersimoni y col, 2009).

La detección temprana de la especie de micobacteria que esté causando un padecimiento tendrá un impacto clínico muy importante para efectuar su tratamiento y controlar su transmisión (Grubek-Jaworska y col, 2009). Debido a lo anterior y a la poca información que se tiene en México acerca de las micobacterias más frecuentemente aisladas de pacientes, uno de los objetivos principales del presente estudio fue comparar e identificar mediante técnicas moleculares a las micobacterias que fueron aisladas de pacientes con sospecha a tuberculosis o con micobacteriosis.

Para llevar a cabo lo anterior, se compararon herramientas de biología molecular, como microarreglos de baja densidad, PCR en tiempo real, debido a un incremento de casos de TB, surge la necesidad del desarrollo de herramientas que permitan el diagnóstico rápido y eficiente de TB, en aquellos países donde el acceso a *kits* comerciales es muy difícil, como en el caso de México y en particular en la población que acude al Hospital Juárez. Además, el diagnóstico temprano es un paso crítico en el manejo y control de la enfermedad. A su



vez se ha comprobado que los métodos moleculares basados en PCR aceleran el diagnóstico. Por ejemplo El PCR con relación con las pruebas de tuberculina, cultivo e histopatológicas, demuestra un mayor grado de confiabilidad y superioridad al resultado, además de que se reduce el tiempo del diagnóstico, de manera considerable (Palomino, 2005).

Un estudio publicado por Park en Corea mostró una sensibilidad de 78% y una especificidad de 88% para PCR de punto final para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras en parafina; además, Park encontró un valor predictivo positivo de 93% y un valor predictivo negativo de 66% (Park y col, 2003).

Existe en la literatura diversos reportes que muestran la utilidad de la técnica de PCR como método de diagnóstico rápido de tuberculosis en diversos tejidos. En este estudio se analizaron las 74 muestras, de las cuales 18 fueron positivas para tuberculosis (PCR tiempo real), y dos muestras no amplificaron debido al poco ADN. La cantidad de ADN depende del tipo de muestra de donde se realizó la extracción, estas muestras se desconoce el origen, debido a que se nos proporcionaron del INDRE. Por lo tanto estas dos muestras no se consideran fallas en la detección, ya que se habían reportado inicialmente 20 positivas.

De las 74 muestras analizadas por microarreglos de baja densidad se obtuvieron solo 3 positivas de las 20 reportadas inicialmente, observándose el 15% de las muestras positivas, por lo que se considera que se estaban reportando falsos negativos, lo cual repercute en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes.

Para obtener el límite de detección de los métodos de la PCR en tiempo real y los microarreglos, se realizó una curva de diluciones seriadas por triplicado de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, encontrando que el límite de detección (valora hasta cuantas copias puede llegar a detectar el método), para la PCR en tiempo real (Crowther y col, 2000) se presentó en la dilución 1:100000, que equivale a 4 copias/ μ L. Para el microarreglo se encontró en la dilución 1:1000, que a 400 copias/ μ L, Comparando ambos métodos se encontró que la PCR en tiempo real presentó una mayor sensibilidad diagnóstica, con lo cual se puede asegurar que el método es confiable hasta la detección de 4 bacterias/ul en las



muestras analizadas, además que el tiempo de proceso de la muestra es más rápido en comparación que el microarreglo.

Una de las limitantes que se observó en la metodología de microarreglos fue el tiempo de proceso ya que se invierte más tiempos comparado con el PCR en tiempo real, esto es debido al tiempo donde se lleva a cabo la hibridación y lavado del microarreglo y además cuando se analizó los límites de detección estos son elevados (400 copia) comparado con el PCR en tiempo real (4 copias), lo cual se determina ésta la causa de no detectar las 17 muestras positivas, probablemente porque el número de copias estaba por debajo de 400, lo cual complica el tratamiento a los pacientes.

La especificidad del PCR en tiempo real y los microarreglos fue del 100%. La sensibilidad de la técnica implementada por PCR en tiempo real fue del 90%, comparada con la sensibilidad del microarreglo que fue de 15%, esto se realizó con los resultados obtenidos de la comparación con las muestras ya reportadas, en tanto que el valor predictivo positivo fue de 90% y el valor predictivo negativo fue del 100%, para PCR en tiempo real. Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos por Isik Somuncu, quienes obtuvieron una sensibilidad y especificidad de 90% y 100%, respectivamente (Johansen y col., 2004).

Por ultimo en este trabajo se encontraron 6 pacientes infectados con diferentes especies de MNT, en primer lugar se reportó una muestra positiva para *M. kansasii*, la cual es la 3^a MNT más común en EUA; y está relacionada comúnmente a infectar el pulmón (Field y col, 2006). Otra MNT que se reporto fue *M. gordonae*, esta especie se aísla muy frecuentemente del agua de la red municipal, y se reporta en raras ocasiones, siendo una enfermedad diseminada en el hombre (Field and Cowie 2006). Por otro lado, se encontró una muestra positiva a *Mycobacterium. avium*, la cual se reporta en pacientes con VIH, para esta especie, se tiene pocos reportes en nuestro país, en el cual se muestra una frecuencia del 4% en población abierta (Cortes y col, 2013). De la misma manera se reportó 3 muestras positivas para *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium intracelular* y *Mycobacterium abscesus*, ambas pueden causar enfermedad crónica pulmonar, infección de heridas postraumáticas, enfermedad cutánea diseminada principalmente en pacientes inmunodeprimidos, casi no hay casos reportados en México. A grandes rasgos esta técnica brinda la identificación de MTN patógenas mas frecuentes en humanos a partir de muestras



clínicas, ya que tiene la ventaja de no necesitar el cultivo de esta micobacterias, con lo que el diagnóstico es más rápido y oportuno.

En la evaluación del costo de ambas metodologías, se encontró que la PCR en tiempo real fue 6 veces más económica en comparación con la del microarreglos, además de que el sistema proceso es abierto, por lo que los consumibles y los reactivos pueden adquirirse con diferentes proveedores, caso contrario que con los microarreglos son distribuidores exclusivos.



10. Conclusiones

- ✓ Se detectaron por PCR en tiempo real 18 muestras positivas de 74 muestras analizadas con sospecha de MTBC y 6 para MNT por PCR de punto, de las cuales se identificaron; *M. avium*, *M. kansasii*, *M. intracelular*, *M. abscesus*, *M. fortuitum* y *M. gordonae*, siendo los métodos con mayores ventajas; el PCR en tiempo real y PCR en punto final, debido a que con la metodología de microarreglos solo detectó 3 de 20 positivas para MTBC.
- ✓ Se demostró la sensibilidad del 90% para la detección de MTBC y 100% de especificidad para la técnica de PCR en tiempo real, siendo el límite de detección una ventaja con respecto a otros métodos.
- ✓ Se determinó que de acuerdo a la alta especificidad y sensibilidad la prueba de reacción en cadena de la polimerasa PCR en tiempo real es la más económica con respecto a otros métodos e incluso donde no es posible identificar el agente etiológico de la tuberculosis ya sea por la demora en su aislamiento por cultivo o por la baja sensibilidad de los procedimientos de tinción.

11. Perspectivas

Para continuar y complementar el presente estudio, se sugiere lo siguiente:

- ✓ Realizar la resistencia a los antibióticos de primera línea a las cepas de MTBC.
- ✓ Identificar las mutaciones que dan origen a dichas resistencias.



12. Glosario

Ácido micólico: Hidroxilpidos de cadena larga y ramificada, presentes en la pared del genero *Mycobacterium*.

Actinomicetales: Son bacterias Gram-positivas. Sin embargo, varias especies tienen complejas paredes celulares que hacen la tinción de Gram inadecuada; por ejemplo, las *Mycobacteriaceae*.

Aerobios: organismos que pueden vivir o desarrollarse en presencia de oxígeno diatómico.

Asparagina: Es uno de los 20 aminoácidos codificados en el código genético.

Bacilo: Cualquier bacteria con forma de barra o vara.

Bacterias Gram-positivas: Bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram.

Células mononucleares: Células con un único núcleo redondo, como los linfocitos o los monocitos.

Citoquinas: Proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular.

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*: Grupo (taxón) de micobacterias, conformado por siete especies.

Escotocromógeno: Pigmentos carotenoides intensamente amarillos en ausencia de luz.

Esfingolípidos: Lípidos complejos que derivan del aminoalcohol insaturado.

Fagocitar: capacidad de captar microorganismos y restos celulares.

Fosfatidilinositol: Fosfolípido que contiene en su estructura uno o más inositoles modificados por adición de uno o más grupos fosfato

Fotocromógeno: Pigmentos carotenoides intensamente amarillos en presencia de luz.

Fuchina: Colorante magenta utilizado en histología, en las tinciones Gram -.

Glicolípidos: Esfingolípidos compuestos por una ceramida (esfingosina + ácido graso) y un glúcido de cadena corta.

H37Rv: Genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis*, concretamente de la cepa de laboratorio.

Interleucinas: Proteínas que actúan como mensajeros químicos a corta distancia



IS6110: Secuencias de inserción específicas para *Mycobacterium tuberculosis*.

Linfadenitis: Término que se refiere a una inflamación de los ganglios linfáticos.

Lipoarabinomanana: Compuesto que se halla anclado en la membrana citoplasmática, equivalente micobacteriano del lipopolisacárido de las Gram negativas.

Lipopolisacárido: Polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos.

Löwenstein-Jensen: Medio base, para la preparación de varios medios destinados al aislamiento, cultivo y diferenciación de micobacterias.

Macrófagos: Células del sistema inmunitario que se localizan en los tejidos.

Micobacteriosis: Las micobacteriosis son infecciones producidas por bacterias del género *Mycobacterium*.

Microarreglos: es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de ADN.

***Mycobacterium tuberculosis*:** bacteria responsable de la mayor cantidad de casos de tuberculosis.

***Mycobacterium*:** es el único género de la familia de las bacterias *Mycobacteriaceae*.

PCR de punto final: Técnica que sirve para amplificar un fragmento de ADN.

PCR de tiempo real: es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN).

Quimiocinas: proteínas de pequeño tamaño pertenecientes a una familia de las citoquinas.

Quimiotaxis: Fenómeno en el cual las bacterias y otras células de organismos uni o multicelulares dirigen sus movimientos de acuerdo con la concentración de ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.

Tuberculina: Prueba para evaluar la respuesta del paciente a la exposición de la bacteria, mediante una prueba cutánea.

Ziehl-Neelsen: Técnica de tinción diferencial rápida y económica, usada para la identificación de microorganismos patógenos.



13. Referencias.

- Agarwal, S., D. Caplivski and E. J. Bottone (2005). "Disseminated tuberculosis presenting with finger swelling in a patient with tuberculous osteomyelitis: a case report." Ann Clin Microbiol Antimicrob **4**: 18.
- Anochie, P. I., E. C. Onyeneke, A. C. Ogu, A. C. Onyeozirila, S. Aluru, N. Onyejebu, J. Zhang, L. Efere, M. A. Adetunji and J. G. Sanchez (2012). "Recent advances in the diagnosis of." Germes **2**(3): 110-120.
- Barnes, D. S. (2000). "Historical perspectives on the etiology of tuberculosis." Microbes Infect **2**(4): 431-440.
- Bej, A. K., M. H. Mahbubani and R. M. Atlas (1991). "Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications." Crit Rev Biochem Mol Biol **26**(3-4): 301-334.
- Borun, M., A. Sajduda, I. Pawlowska, J. J. McFadden and J. Dziadek (2001). "Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using insertion sequences IS6110 and IS990." Tuberculosis (Edinb) **81**(4): 271-278.
- Cassidy, P. M., K. Hedberg, A. Saulson, E. McNelly and K. L. Winthrop (2009). "Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology." Clin Infect Dis **49**(12): e124-129.
- Catanzaro, A., S. Perry, J. E. Clarridge, S. Dunbar, S. Goodnight-White, P. A. LoBue, C. Peter, G. E. Pfyffer, M. F. Sierra, R. Weber, G. Woods, G. Mathews, V. Jonas, K. Smith and P. Della-Latta (2000). "The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial." Jama **283**(5): 639-645.
- Cerda L, J. and L. Villaruel del p (2008). "Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa." Revista chilena de pediatría **79**: 54-58.
- Colakoglu, S. (2004). "[*Mycobacterium tuberculosis* virulence factors and its immune evasion mechanisms]." Mikrobiyol Bul **38**(1-2): 155-167.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S.



- Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead and B. G. Barrell (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." Nature **393**(6685): 537-544.
- Cortes-Torres, N., Y. M. J. A. Gonzalez, C. Gonzalez-Bonilla and G. Garcia-Elorriaga (2013). "Molecular analysis of mycobacteria isolated in Mexican patients with different immunodeficiencies in a tertiary care hospital." Arch Med Res **44**(7): 562-569.
 - Chan, E. D., L. Heifets and M. D. Iseman (2000). "Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review." Tuber Lung Dis **80**(3): 131-140.
 - Crowther, J. R. (2000). Validation of Diagnostic Tests for Infectious Diseases. 149: 301-345.
 - Da Mata J, O., R. Hernandez-Perez, H. Corrales, S. Cardoso-Leao and J. H. de Waard (2010). "[Follow-up on an outbreak in Venezuela of soft-tissue infection due to *Mycobacterium abscessus* associated with Mesotherapy]." Enferm Infecc Microbiol Clin **28**(9): 596-601.
 - Dámaso, B., R. Díaz, L. Menacho and C. Loza (2009). "Reactividad de la prueba de tuberculina en contactos intradomiciliarios de pacientes con tuberculosis en Huánuco, Perú: Tuberculin test reactivity in household contacts of tuberculosis patients from Huanuco, Peru." Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica **26**: 449-454.
 - Daniel, T. M. (2006). "The history of tuberculosis." Respir Med **100**(11): 1862-1870.
 - Dankner, W. M. and C. E. Davis (2000). "*Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region." Pediatrics **105**(6): E79.
 - Davis, J. M. and L. Ramakrishnan (2009). "The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection." Cell **136**(1): 37-49.
 - Draper, P. (1998). "The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers." Front Biosci **3**: D1253-1261.
 - Field, S. K. and R. L. Cowie (2006). "Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria." Chest **129**(6): 1653-1672.



- Flynn, J. L. and J. Chan (2003). "Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy." Curr Opin Immunol **15**(4): 450-455.
- Georgiev, V. (2003). Nontuberculous Mycobacterial Infections. Opportunistic Infections, Humana Press: 95-128.
- Gorocica, P., M. d. C. Jiménez-Martínez, Y. Garfias, I. Sada and R. Lascurain (2005). "Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis." Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias **18**: 142-153.
- Grubek-Jaworska, H., R. Walkiewicz, A. Safianowska, M. Nowacka-Mazurek, R. Krenke, T. Przybylowski and R. Chazan (2009). "Nontuberculous mycobacterial infections among patients suspected of pulmonary tuberculosis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **28**(7): 739-744.
- Gupta, A., A. Kaul, A. G. Tsolaki, U. Kishore and S. Bhakta (2012). "Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation." Immunobiology **217**(3): 363-374.
- Hasaneen, N. A., M. E. Zaki, H. M. Shalaby and A. S. El-Morsi (2003). "Polymerase chain reaction of pleural biopsy is a rapid and sensitive method for the diagnosis of tuberculous pleural effusion." Chest **124**(6): 2105-2111.
- Johansen, I. S., V. O. Thomsen, A. Forsgren, B. F. Hansen and B. Lundgren (2004). "Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens with necrotizing granulomatous inflammation by strand displacement amplification." J Mol Diagn **6**(3): 231-236.
- Karnak, D., O. Kayacan and S. Beder (2002). "Reactivation of pulmonary tuberculosis in malignancy." Tumori **88**(3): 251-254.
- Katoch, V. M. (2004). "Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM)." Indian J Med Res **120**(4): 290-304.
- Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoback, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg and N. Zoric (2006). "The real-time polymerase chain reaction." Mol Aspects Med **27**(2-3): 95-125.
- Liao, C. H., C. C. Lai, C. K. Tan, C. H. Chou, H. L. Hsu, T. H. Tasi, Y. T. Huang and P. R. Hsueh (2009). "False-negative results by enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma among patients with culture-confirmed tuberculosis." J Infect **59**(6): 421-423.



- Lima, S. S., W. T. Clemente, M. Palaci, R. V. Rosa, C. M. Antunes and J. C. Serufo (2008). "Conventional and molecular techniques in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a comparative study." J Bras Pneumol **34**(12): 1056-1062.
- Martínez Romero, M. R., M. Sardina Aragon, G. Garcia, M. Almaguer Diaz, M. J. Llanes Cordero and E. Montoro Cardoso (2006). "[Evaluation of quality control of bacilloscopy in tuberculosis diagnosis in Cuba]." Rev Cubana Med Trop **58**(3): 194-199.
- Muller, R., C. A. Roberts and T. A. Brown (2014). "Genotyping of ancient *Mycobacterium tuberculosis* strains reveals historic genetic diversity." Proc Biol Sci **281**(1781): 20133236.
- Nagesh, B. S., S. Sehgal, S. K. Jindal and S. K. Arora (2001). "Evaluation of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural fluid." Chest **119**(6): 1737-1741.
- Naveen, G. and B. V. Peerapur (2012). "Comparison of the Lowenstein-Jensen Medium, the Middlebrook 7H10 Medium and MB/BacT for the Isolation of *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) from Clinical Specimens." J Clin Diagn Res **6**(10): 1704-1709.
- Nerlich, A. G., C. J. Haas, A. Zink, U. Szeimies and H. G. Hagedorn (1997). "Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy." Lancet **350**(9088): 1404.
- Palomino, J. C. (2005). "Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field." Eur Respir J **26**(2): 339-350.
- Park, D. Y., J. Y. Kim, K. U. Choi, J. S. Lee, C. H. Lee, M. Y. Sol and K. S. Suh (2003). "Comparison of polymerase chain reaction with histopathologic features for diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded histologic specimens." Arch Pathol Lab Med **127**(3): 326-330.
- Perez-Martinez, I., A. Ponce-De-Leon, M. Bobadilla, N. Villegas-Sepulveda, M. Perez-Garcia, J. Sifuentes-Osornio, J. A. Gonzalez-y-Merchand and T. Estrada-Garcia (2008). "A novel identification scheme for genus *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex, and seven mycobacteria species of human clinical impact." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **27**(6): 451-459.



- Piersimoni, C. and C. Scarparo (2009). "Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons." Emerg Infect Dis **15**(9): 1351-1358; quiz 1544.
- Pilszczek, F. H. and S. H. E. Kaufmann (2008). "Prevalence and predictors of positive tuberculin skin test results in a research laboratory." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **41**: 416-418.
- Russell, D. G., H. C. Mwandumba and E. E. Rhoades (2002). "Mycobacterium and the coat of many lipids." J Cell Biol **158**(3): 421-426.
- Sant'Anna, C. C., L. d. S. Fonseca and M. H. F. Saad (2001). "Relação entre o diagnóstico sorológico (ELISA) e a gravidade da tuberculose pulmonar na infância." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **34**: 531-535.
- Styblo, K. (1980). "Recent advances in epidemiological research in tuberculosis." Adv Tuberc Res **20**: 1-63.
- Taylor, G. M., G. R. Stewart, M. Cooke, S. Chaplin, S. Ladva, J. Kirkup, S. Palmer and D. B. Young (2003). "Koch's bacillus - a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective." Microbiology **149**(Pt 11): 3213-3220.
- Tomioka, H. (1998). "[Bacteriology of mycobacteria: taxonomic and morphological characteristics]." Nihon Rinsho **56**(12): 3001-3007.
- Tsukamura, M. (1983). "Numerical classification of 280 strains of slowly growing mycobacteria. Proposal of *Mycobacterium tuberculosis* series, *Mycobacterium avium* series, and *Mycobacterium nonchromogenicum* series." Microbiol Immunol **27**(4): 315-334.
- Vecchiola H, M. (2010). "Mycobacterium tuberculosis." Revista chilena de infectología **27**: 539-540.
- Young, B. N., A. Rendon, A. Rosas-Taraco, J. Baker, M. Healy, J. M. Gross, J. Long, M. Burgos and K. L. Hunley (2014). "The effects of socioeconomic status, clinical factors, and genetic ancestry on pulmonary tuberculosis disease in northeastern Mexico." PLoS One **9**(4): e94303.
- Zhuravlev, V., O. V. Narvskaia, A. A. Viazovaia, I. V. Mokrousov, T. F. Otten and B. I. Vishnevskii (2010). "[Molecular genetic tools for etiologic diagnostics of disseminated lung tuberculosis]." Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol(3): 77-81.



Citas de internet

1. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2014/completo/sem14.pdf>
2. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/Monografias5_Tuberculosis_Mex_junio12.pdf



“LO IMPOSIBLE ES POSIBLE”