

11277



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**



**IMSS**

FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE INFECTOLOGIA  
CENTRO MEDICO "LA RAZA"

1  
2es.

**"VALOR DIAGNOSTICO DE LA REACCION EN  
CADENA DE LA POLIMERASA PARA DETERMINAR  
RESISTENCIA A RIFAMPICINA COMPARADO  
CON EL METODO RADIOMETRICO.**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN MEDICINA**  
P R E S E N T A :  
**ARNULFO JOEL CORREA CHACON**

TUTORES: DR. CARLOS E. HERMIDA ESCOBEDO.  
DR. EN C. JOSE ANTONIO ENCISO MORENO.

LUGAR DE REALIZACION  
HOSPITAL DE INFECTOLOGIA  
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"  
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR UIMEIP  
HOSPITAL DE PEDIATRIA  
CENTRO MEDICO NACIONAL "SIGLO XXI"

1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

11/2/98



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.

**A María Eugenia y Pablo Joel por su comprensión y cariño, ya que juntos logramos esta meta.**

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Enciso por su gran apoyo en la realización de esta tesis, así como por su amistad brindada, siempre lo consideraré como un maestro y un gran amigo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo de infraestructura al desarrollo en México ( F564-M9312 ). Arnulfo Joel Correa Chacón recibió beca de maestría, proyecto ( 0796P-M9506 ).

Al Fondo al Fomento de la Investigación (FOFOI) del Instituto Mexicano del Seguro Social, por su apoyo ( FP38/203 ).

A toda mi familia por su apoyo recibido durante toda mi formación, a Don Raudel Correa y Rosita Chacón, a Marco, Claudia y Rafael, a todos mis demás familiares.

A todos mis compañeros de Laboratorio; Erika, Gloria, Norma, Hilda, Mauricio, Marisa, Mónica, Nancy, Paty, Carmen y José Juan, por su amistad y ayuda prestada.

A todos los integrantes del grupo interinstitucional formado para estudio de la tuberculosis.

A la Dra. Elena Úrdez Hernández y la Dra. Verónica Gaona por su labor desempeñada en mi formación como Infectólogo. Al Dr. Cesar González, Dra. Nelly Cisneros, Dr. Javier Torres, Dr. Carlos Hermida y Dr. Gustavo Sánchez Huerta por la lectura crítica de éste manuscrito.

Atte. Dr. Arnulfo Joel Correa Chacón

## INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
JUSTIFICACIÓN .....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	10
HIPÓTESIS .....	11
OBJETIVO .....	11
MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
UNIVERSO DE TRABAJO .....	12
TIPO DE ESTUDIO .....	12
VARIABLES .....	12
DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES .....	13
DISEÑO DE LA MUESTRA .....	14
CRITERIOS DE INCLUSIÓN .....	14
CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN .....	14
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN .....	14
DESCRIPCIÓN ESQUEMÁTICA DEL ESTUDIO .....	15
DESCRIPCIÓN OPERACIONAL DEL ESTUDIO .....	16
Método radiométrico para el cultivo de <i>M. tuberculosis</i> .....	17
Identificación de <i>M. tuberculosis</i> .....	18
Análisis de sensibilidad de <i>M. tuberculosis</i> .....	21
Método de PCR-Hibridación en línea .....	23
Extracción de DNA de <i>M. tuberculosis</i> .....	24
Amplificación del gen <i>rpo B</i> de <i>M. tuberculosis</i> .....	25
Hibridación en línea reversa .....	31
DISEÑO ESTADÍSTICO .....	39
CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	39
RESULTADOS .....	40
DISCUSIÓN .....	48
ANEXO 1 .....	54
BIBLIOGRAFÍA .....	58

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La tuberculosis es un problema de salud pública a nivel mundial con una prevalencia estimada de 30 millones, con la aparición de 8 millones de casos nuevos y 3 millones de muertes al año. Para el año 2000 se tiene estimado que ocurrirán 10.3 millones de muertes anuales por tuberculosis. En México se reportaron en 1997 17000 casos al año, lo que equivale a 47 casos diarios. Las cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes a los antibióticos de primera línea, constituyen una amenaza para el control de la tuberculosis en el mundo, ya que afecta no solo a pacientes con inmunodeficiencias sino también a trabajadores de la salud y pacientes sin inmunocompromiso, presentando estos últimos una alta letalidad. Las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina presentan mutaciones en el gen *rpo B* que codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa. Estas mutaciones se han asociado a resistencia a rifampicina.

**OBJETIVO:** Valorar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa-hibridación en línea (PCR-HLIN) para determinar resistencia a rifampicina a partir de muestras de expectoraciones de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se estudiaron 80 muestras de expectoración de pacientes atendidos en el Hospital de Infectología del CMN "La Raza". Los sedimentos de expectoración fueron descontaminados de acuerdo al método de Petroff y examinados con la tinción de Ziehl Neelsen. Posteriormente los especímenes se cultivaron en medio 12 B por el método radiométrico (BACTEC TB-460); se realizó identificación de especie por NAP y análisis de susceptibilidad a estreptomocina, isoniacida, rifampicina y etambutol. Para la técnica de PCR-HLIN, el DNA se obtuvo por extracciones fenólicas y se realizaron PCR-anidados utilizando los iniciadores externos OP1 y OP2 marcados con biotina. Posteriormente se realizó una hibridación en línea en una membrana Biodyne C, donde previamente se colocaron oligonucleótidos correspondientes a la zona de alta mutación del gen *rpo B* de *M. tuberculosis*. Para observar los resultados de la hibridación se realizó una reacción de quimioluminiscencia.

**RESULTADOS:** De los 80 sedimentos estudiados por el método de PCR-HLIN para la detección de resistencia a rifampicina, 41 (51.25%) presentaron patrón de resistencia mientras que por el método radiométrico fueron 38 (47.5%). Así mismo, el método de PCR-HLIN detectó 39 (48.75%) cepas sensibles mientras que el método radiométrico detectó 42 (52.5%). Con estos datos se obtuvieron los siguientes valores; una sensibilidad de un 94.7% y una especificidad de un 88.1%, con un valor predictivo positivo de 87.8% y un valor predictivo negativo de 94.9%, con una exactitud total de la prueba de un 91.25%.

**CONCLUSIONES:** El método de PCR-HLIN resultó más rápido que el método radiométrico. Existe una alta sensibilidad y especificidad por lo que representa un método eficaz y rápido para la caracterización de sedimentos de pacientes con diagnóstico probable de tuberculosis pulmonar para especímenes con *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina por lo que se podrá utilizar en los laboratorios clínicos

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad bacteriana infectocontagiosa, crónica, causada por *Mycobacterium tuberculosis*, la cual se caracteriza por la formación de granulomas en los tejidos infectados y por producir hipersensibilidad tardía mediada por inmunidad celular. La enfermedad pulmonar es la presentación clínica más frecuente, no obstante, también pueden ocurrir afecciones linfáticas, genitourinarias, osteomielitis y diseminación miliar, así como meningitis, peritonitis y pericarditis <sup>(1)</sup>.

La transmisión de *Mycobacterium tuberculosis* es de persona a persona por vía respiratoria, a través de las secreciones respiratorias, en las cuales los bacilos tuberculosos forman los núcleos de las gotitas de líquidos expulsados al toser, estornudar o hablar; estos aerosoles se evaporan a poca distancia de la boca y seguidamente, los bacilos desecados persisten viables en el aire por largo tiempo y así pueden infectar a otros individuos <sup>(2)</sup>.

El período de incubación de este bacilo varía de 1 a 3 meses pero puede ser mayor. Clínicamente, los signos de la enfermedad aparecen en los primeros 6 a 12 meses después de la infección y la mayoría de los enfermos dejan de ser contagiosos a los 15 días de iniciar la quimioterapia apropiada, al disminuir la tos y por lo tanto, el número de microorganismos expulsados <sup>(3)</sup>.

Los bacilos expulsados pueden producir tuberculosis más frecuentemente en los pacientes con desnutrición, inmunodepresión, drogadicción, extremos de la vida, diabetes, alcoholismo, etc. <sup>(4-7)</sup>. Aunque estos grupos son más susceptibles a la infección por tuberculosis, esta enfermedad sigue siendo un problema mundial de salud pública, con una prevalencia estimada de 30 millones de casos, en su mayoría de afección pulmonar <sup>(8)</sup>. Actualmente aparecen 8 millones de casos nuevos y 3 millones de personas fallecen por año, lo que equivale al 6 por ciento del total de muertes en el mundo entero. Se estima que para el año 2000 habrá 10.3 millones de muertes anuales por tuberculosis <sup>(9,10)</sup>.

En México existen problemas para el registro de datos epidemiológicos y además hay poca información clínica de los pacientes con tuberculosis. Esto ocurre principalmente porque sólo son reportes de casos. También hay falta de estudios con marcadores específicos de especie de uso convencional, ya que estos estudios sólo se realizan en laboratorios de referencia o de investigación.

La mortalidad por tuberculosis en todas sus formas en 1995 fue de 5.1 por 100 000 habitantes; sólo por tuberculosis pulmonar hubo 4023 defunciones, lo que equivale a 11 muertes diarias y mas de 90 000 años potenciales de vida perdidos. La morbilidad por tuberculosis en todas sus formas mostró hasta 1994 una tendencia estable, pero en 1995 se inició un incremento con 14 casos

por 100 000 habitantes a 17.5 en 1996. En los últimos dos años, el promedio de casos nuevos es de 17 000; es decir, 47 casos diarios <sup>(12)</sup>.

Aunado a las abundantes cifras de casos de tuberculosis a nivel mundial, existe un problema creciente con el surgimiento de brotes de tuberculosis ocasionados por cepas fármaco resistentes, lo cual se ha atribuido al tratamiento inadecuado o incompleto de la enfermedad, lo que trae consigo el desarrollo de cepas que afectan no únicamente a pacientes con inmunodeficiencias, sino también a trabajadores de la salud y pacientes sin inmunocompromiso, casos en los cuales también existe una alta letalidad <sup>(13-16)</sup>.

La presencia de un alto número de cepas multidrogoresistentes ha sido evidenciada en nuestro país por el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE); así, de 1989 a 1993 se caracterizaron un total de 1637 cepas y se reportó resistencia primaria a los medicamentos antituberculosos de primera línea en el 8.2 por ciento y secundaria en el 63 por ciento. De éstas, 27 por ciento fueron resistentes a una droga, 31.2 por ciento a dos drogas y más del 30 por ciento fueron resistentes a tres drogas <sup>(17)</sup>.

Otro estudio realizado en el Instituto Nacional de la Nutrición, reportó que de 84 pacientes, en el 70 por ciento se aisló *M. tuberculosis* sensible y en el 30 por ciento *M. tuberculosis* resistente, encontrándose una resistencia a isoniacida de un 24 por ciento, a rifampicina de un 19 por ciento, a

estreptomycin en un 12 por ciento, a etambutol en 10 por ciento, a ácido paraaminosalicílico en un 9 por ciento, a etionamida en un 7 por ciento y a kanamicina en un 6 por ciento <sup>(11)</sup>.

Debido a que *Mycobacterium tuberculosis* se distingue por sus lípidos superficiales que los convierten en ácido-alcohol resistente, el diagnóstico de tuberculosis pulmonar en la actualidad considera el estudio de especímenes de esputo con tinción de Auramina Rodamina ó de Ziehl Neelsen seguido por cultivo en medio de Lowestein Jensen o Middlebrok, con la utilización de técnicas bioquímicas para identificación de especie. Sin embargo; la tinción de Ziehl Neelsen requiere de una concentración de bacilos de  $10^4$  /ml o mayor para detectar una muestra positiva <sup>(18)</sup>.

Para evaluar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a diferentes drogas, los métodos más utilizados son el de las concentraciones absolutas, el de la relación de resistencia y el de las proporciones; este último es el más conocido y más difundido en América Latina y es el que prácticamente se lleva en todos los programas de control y diagnóstico de la tuberculosis <sup>(19)</sup>.

El cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* es sensible y puede detectar de 10-100 organismos viables por examen. El tiempo de generación de las micobacterias es de aproximadamente 18-24 hrs, lo que hace que el método de cultivo requiera de 2 a 8 semanas antes de que el resultado este disponible

para el médico. Además, el tiempo se prolonga al evaluar la susceptibilidad a los medicamentos antituberculosos, ya que se requieren de otras 2-3 semanas. Otro problema que se presenta en el laboratorio clínico es que existen más de 25 especies del género *Mycobacterium* capaces de causar enfermedad en el humano. Particularmente, *M. tuberculosis* es la especie que requiere una pronta identificación ya que es la más contagiosa y patógena de las especies de *Mycobacterium* <sup>(20,21)</sup>.

Por lo anterior, el diagnóstico e identificación de especie así como la evaluación de los perfiles de susceptibilidad toman aproximadamente de 5 a 10 semanas, lo que compromete la vida del paciente con tuberculosis fármaco resistente. Por otro lado, estos pacientes son además una fuente potencial de brotes con cepas de tuberculosis multirresistentes, los cuales se han caracterizado por una tasa de mortalidad de un 50 hasta un 80 por ciento y en un periodo de sólo 4 a 16 semanas desde el diagnóstico hasta el fallecimiento del paciente. La alta tasa de mortalidad y el curso rápido de esta enfermedad implica la necesidad de métodos de detección de fármaco resistencia más rápidos y efectivos para la aplicación de terapias antituberculosas más efectivas <sup>(20-22)</sup>. Dentro de las mejores alternativas, se encuentra el ensayo radiométrico automatizado con el sistema BACTEC TB-460 (Becton Dickinson Diag Inst MD USA), el cual ha reducido el tiempo necesario para la detección de cepas de *M. tuberculosis*, pero sigue dependiendo del crecimiento del bacilo. Así, usando este equipo algunos laboratorios han informado un tiempo

promedio para la identificación de ocho a catorce días. Este sistema tiene la capacidad de diferenciar al complejo *M. tuberculosis* de otras micobacterias, pero el resultado requiere de otros cinco a siete días, ya que una vez que se ha identificado un microorganismo ácido-alcohol resistente con el sistema BACTEC, es además necesario inocular las micobacterias en el medio BACTEC 7H-12 (Becton & Dickinson) que contiene p-nitro- $\alpha$ -acetilamino- $\beta$ -hidroxipropiofenol (NAP, Becton & Dickinson), para poder identificar con este inhibidor específico a las micobacterias del complejo tuberculosis, ya que esta sustancia inhibe el crecimiento de el complejo de *M. tuberculosis*, mientras que el resto de micobacterias sigue creciendo en presencia del compuesto <sup>(23,24)</sup>.

Así también el sistema radiométrico BACTEC permite determinar la susceptibilidad de diferentes cepas de *M. tuberculosis* a distintos medicamentos antituberculosos de manera precisa y más rápida comparado con los métodos tradicionales en placa, ya que la susceptibilidad a los fármacos en este equipo suelen obtenerse en cinco a siete días, en comparación con los 21 días utilizados para el caso de las pruebas ordinarias. Así, el método radiométrico permite no sólo identificar a las micobacterias sino además determinar mejor y más rápidamente sus patrones de resistencia con respecto a los métodos tradicionales. Sin embargo, a pesar de que se ha observado que la sensibilidad para el cultivo es mayor con respecto a los métodos tradicionales, las desventajas del sistema radiométrico BACTEC son entre otras que utiliza substratos radioactivos y sus altos costos <sup>(23-24)</sup>.

Desde mediados de la década de los 1980s han surgido técnicas moleculares en el diagnóstico de tuberculosis; entre otras, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con lo que se ha acortado el tiempo de diagnóstico de la enfermedad. Con este método se requieren de dos a tres días para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, cuando se utiliza la secuencia de inserción *IS6110* de *M. tuberculosis* se logra hasta un 100 por ciento de sensibilidad y especificidad <sup>(25-29)</sup>.

Estas técnicas moleculares también han sido usadas para definir el mecanismo de fármaco resistencia asociadas a mutaciones genómicas en los sitios de resistencia para fármacos individuales. De esta manera, se investigó una serie de mutaciones asociadas a resistencia para los diferentes antituberculosos empleados en la actualidad. Estas técnicas moleculares han sido aplicadas para definir el mecanismo de resistencia entre otras drogas, a isoniacida y rifampicina. En el caso de isoniacida, se ha observado que la resistencia esta ligada a mutaciones genómicas en 3 genes descritos como *KatG*, *inhA* y *ahpC*, los cuales participan en la biosíntesis de la pared celular<sup>(30-34)</sup>. Por otro lado, se estableció con claridad que la rifampicina se fija en la sub-unidad  $\beta$  de la RNA polimerasa. Los altos niveles de resistencia a la rifampicina se asocia en cerca del 97 por ciento de casos a mutaciones que ocurren de manera espontánea en una pequeña región de aproximadamente 89 nucleótidos del gen *rpo B*, dentro de la secuencia que codifica para la sub-

unidad Beta de la RNA polimerasa. Estas mutaciones ocurren en forma espontánea con una frecuencia de 1 en cada  $10^{-7}$  -  $10^{-8}$  organismos <sup>(30-34)</sup>. Se ha considerado que la resistencia a rifampicina es un buen marcador de multidrogorresistencia porque se ha encontrado una alta asociación de resistencia a otras drogas. De hecho, la rifampicina ha tomado importancia debido a que se ha considerado como un predictor de resistencia asociada a isoniacida <sup>(35)</sup>.

Dado que los eventos de mutación en el gen *rpo B* son frecuentes y ocurren en casi todas las cepas resistentes a rifampicina, Telenti y cols. desarrollaron un método rápido para detectar cambios en la región *rpo B* a través de técnicas de PCR, con el cual identificaron cambios en 64 de 66 aislados resistentes a rifampicina y en ninguno de 56 aislados susceptibles <sup>(36)</sup>. Un método similar al descrito por Telenti y cols. se encuentra disponible en el mercado. Este método denominado "INNO-LiPa rifampicina test", considera para el análisis de las cepas, solo 4 de las 7 mutaciones más frecuentemente encontradas en cepas resistentes a rifampicina. Si bien el método ha resultado ser eficiente, excluye 3 regiones de mutación que pueden ser importantes en aislados de diferente región geográfica. Además el precio del ensayo "INNO-LiPa" es aún muy alto, por lo tanto no se considera un método que puede ser accesible en países del 3er. mundo <sup>(43-44)</sup>.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia de la tuberculosis por su emergencia global a nivel mundial, a la alta tasa de resistencia reportada en los aislados de *M. tuberculosis* y a la alta tasa de letalidad en estos casos, es importante desarrollar métodos confiables y rápidos para la detección e identificación de micobacterias; así como la evaluación de susceptibilidad anti tuberculosa. Estos métodos ofrecerían un diagnóstico rápido de cepas resistentes de *M. tuberculosis* y permitirían un inicio de tratamiento adecuado y oportuno de la infección; disminuyendo además la probabilidad de que ocurra la selección de cepas multirresistentes.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál será la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica de PCR-Hibridación en línea (PCR-HLIN), para determinar resistencia a rifampicina en muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar comparado con el método radiométrico ?

## JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia de la tuberculosis por su emergencia global a nivel mundial, a la alta tasa de resistencia reportada en los aislados de *M. tuberculosis* y a la alta tasa de letalidad en estos casos, es importante desarrollar métodos confiables y rápidos para la detección e identificación de micobacterias; así como la evaluación de susceptibilidad anti tuberculosa. Estos métodos ofrecerían un diagnóstico rápido de cepas resistentes de *M. tuberculosis* y permitirían un inicio de tratamiento adecuado y oportuno de la infección; disminuyendo además la probabilidad de que ocurra la selección de cepas multirresistentes.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál será la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica de PCR-Hibridación en línea (PCR-HLIN), para determinar resistencia a rifampicina en muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar comparado con el método radiométrico ?

## **HIPÓTESIS**

**La técnica de PCR-HLIN, tiene una sensibilidad de un 97 por ciento y una especificidad del 100 por ciento, así como un valor predictivo positivo de un 100 por ciento y un valor predictivo negativo de un 97 por ciento para determinar la resistencia a rifampicina en aislados de *M. tuberculosis*, cuando se parte de muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar**

## **OBJETIVO**

**Valorar la sensibilidad y especificidad, identificar el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica de PCR-HLIN para determinar la resistencia a rifampicina de muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar comparado con el método radiométrico.**

## **HIPÓTESIS**

**La técnica de PCR-HLIN, tiene una sensibilidad de un 97 por ciento y una especificidad del 100 por ciento, así como un valor predictivo positivo de un 100 por ciento y un valor predictivo negativo de un 97 por ciento para determinar la resistencia a rifampicina en aislados de *M. tuberculosis*, cuando se parte de muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar**

## **OBJETIVO**

**Valorar la sensibilidad y especificidad, identificar el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la técnica de PCR-HLIN para determinar la resistencia a rifampicina de muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar comparado con el método radiométrico.**

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

### **UNIVERSO DE TRABAJO**

Pacientes con diagnóstico probable de tuberculosis pulmonar en los que se demostró en su expectoración bacterias ácido alcohol resistentes, que acudieron al Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez" del Centro Médico Nacional "La Raza" a partir del mes de Enero a Diciembre de 1997.

### **TIPO DE ESTUDIO**

Validación de prueba diagnóstica.

### **VARIABLES**

La variable predictora fue la detección de resistencia a rifampicina en muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar por la técnica de PCR-HLIN.

La variable de desenlace fue la detección en la resistencia a rifampicina en muestras de expectoración de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar por el método radiométrico de BACTEC TB-460.

## **DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES**

**La variable predictora se midió con la amplificación y detección de mutación del gen *rpo B* a través de la técnica PCR-HLIN. Fue desarrollada según los protocolos descritos por Kary Mullis <sup>(37)</sup>, y con las modificaciones realizadas por Tellenti en cuanto al fundamento de la técnica de hibridación <sup>(36)</sup>.**

**La variable de desenlace consideró que la población era resistente a rifampicina si el 1 por ciento o más de la población de micobacterias fue resistente. La resistencia se determinó al comparar los índices de crecimiento de las cepas en los medios de cultivo con respecto a la velocidad de crecimiento en cepas control de resistencia ya definida.**

## **DISEÑO DE LA MUESTRA:**

### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

#### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

- 1. Pacientes a quienes se les detectó BAAR <sup>(36)</sup> en expectoración.**
- 2. Hombres o mujeres**
- 3. Mayores de 16 años**
- 4. Independiente de co- mórbilidades que presentaron**
- 5. Que hubieran o no recibido tratamiento antituberculoso.**
- 6. Si recibieron tratamiento independiente del mismo, dosis y tiempo recibido.**

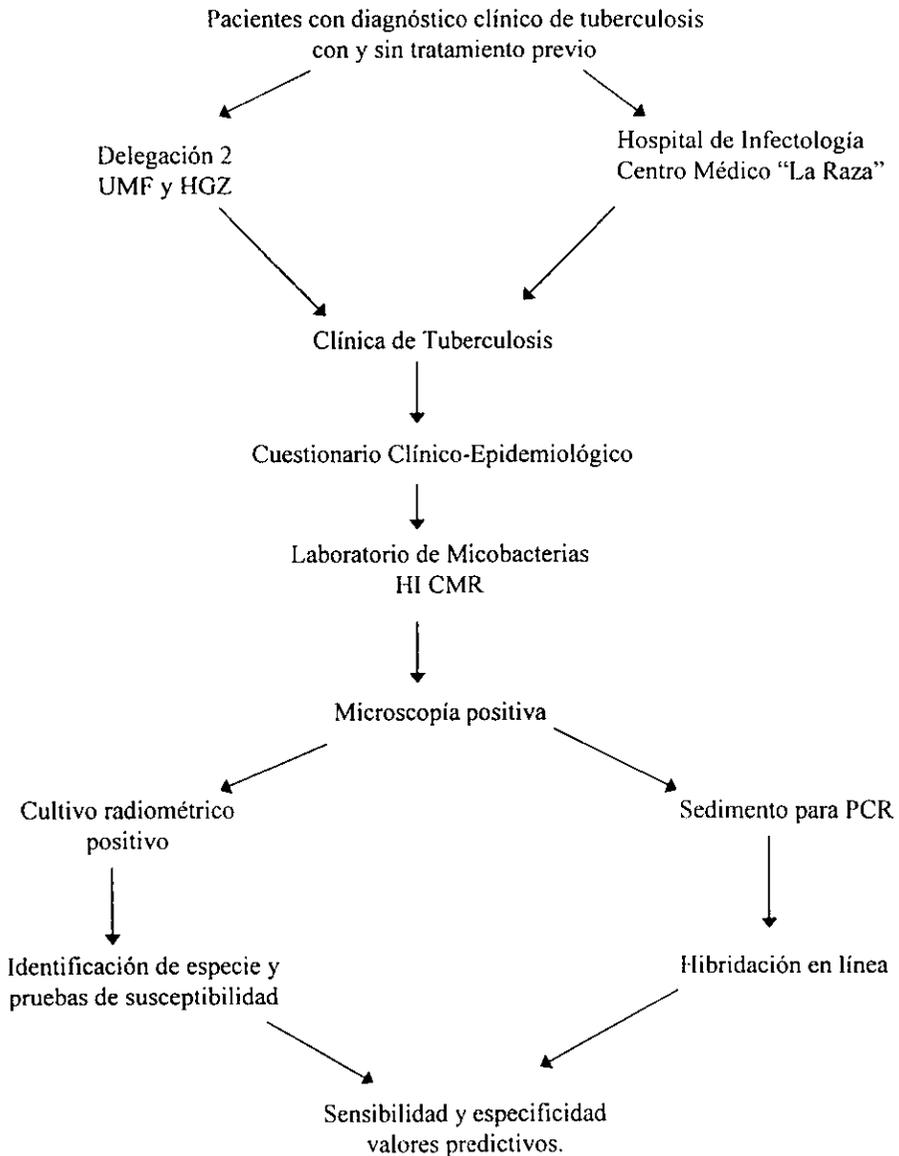
#### **CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN:**

- 1. Muestra insuficiente (menor de 10 ml) para el desarrollo de las técnicas.**
- 2. Muestras que no cumplieron los criterios de Murray; del grupo 4 y 5 como es la presencia de < de 10 células epiteliales por campo de bajo poder y la presencia de 25 leucocitos en campo de bajo poder <sup>(37)</sup> .**

#### **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:**

- 1. Cuando existió pérdida de la información por fallas bioquímicas o moleculares (accidentes de laboratorio).**
- 2. Caracterización incompleta del aislado.**
- 3. Contaminación de los cultivos y que fueron irrecuperables.**

## DESCRIPCIÓN ESQUEMÁTICA DEL ESTUDIO



## **DESCRIPCIÓN OPERACIONAL DEL ESTUDIO:**

**A cada muestra de esputo de individuos con diagnóstico de probable tuberculosis pulmonar por la presencia de síndrome febril, diaforesis, acompañado de ataque al estado general y con síntomas respiratorios como tos, expectoración mucosa, purulenta y/o hemoptóica de evolución subaguda o crónica, que se consideraron candidatos para el estudio y si las muestras cumplieron con los criterios de inclusión, se les colectaron en contenedores estériles. Dentro de las primeras tres horas de recolección, las muestras se incubaron a 37°C con N-acetil cisteína durante 10 min. Posteriormente se les agregó NaOH (J.T. Baker México) al 4 por ciento y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min; enseguida, las muestras se neutralizaron con HCl (J.T. Baker México) a una concentración final de 1.25 N. Una vez descontaminadas las muestras se dividieron en dos alícuotas, una para cultivo por el método radiométrico (BACTEC TB-460 Becton & Dickinson USA) y una segunda alícuota de 250 µl, que se guardó en ultracongelador a -70°C (Hetofrig CL 410, Scandinavia) hasta su uso para la realización de la técnica de PCR-HLIN.**

## **Método radiométrico para el cultivo de *M. tuberculosis***

El material de la primera alicuota se centrifugó a 3000 rpm durante 15-20 min a 4°C en una centrífuga Sorvall refrigerada (Dupont instruments USA) y el sobrenadante se eliminó por decantación. Las pastillas obtenidas se utilizaron para cultivo siempre y cuando mostraran tinción positiva para bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) por el método de Ziehl Neelsen <sup>(38)</sup>. Con el objeto de tener un grupo de cepas de referencia, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Washington USA) las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv (sensible a rifampicina) y *M. tuberculosis* H37Ra (resistente a rifampicina).

El cultivo de las cepas y la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* se realizó en el laboratorio de bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias dependiente de la Coordinación de Investigación del IMSS. Las cepas se crecieron a 37°C bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 por ciento, en medio de agar Middlebrook 7H12 (BACTEC 12B Becton & Dickinson USA), suplementado con solución de polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetopim y azlocilina (PANTA Becton & Dickinson). Las cepas de referencia fueron cultivadas de acuerdo a las indicaciones de la ATCC. Los índices de crecimiento (GI) fueron medidos con el

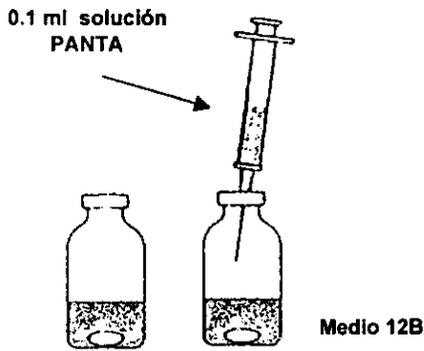
sistema radiométrico automatizado BACTEC TB-460 (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, USA) en el que, su fundamento se basa en el metabolismo del ácido palmítico  $-1-^{14}\text{C}$ ) con liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  por encima de la fase líquida del cultivo en un sistema de cámara iónica automatizada; los cultivos se recuperaron cuando alcanzaron un índice de crecimiento de 50 a 100 en la escala del aparato (Figura 1).

#### **Identificación de *M. tuberculosis***

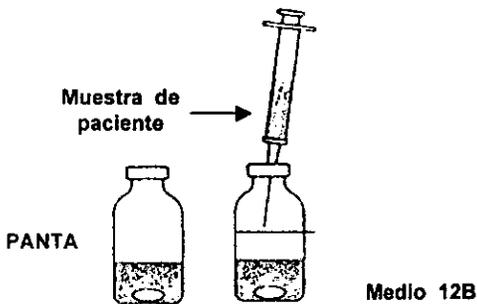
Para la identificación de *M. tuberculosis* se tomó 1 ml. del cultivo de crecimiento obtenido a partir del medio Middlebrook 7H12 y se mezcló con p-nitro-alfa-acetil aminohidroxipropiofenona (NAP, Becton & Dickinson), al mismo tiempo se incubó un control sin la presencia del NAP, ambos frascos se incubaron a 37°C y los índices de crecimiento se compararon durante un mínimo de 4 días. Dado que el NAP es un componente intermediario en la síntesis de cloranfenicol, éste inhibe específicamente el crecimiento de las micobacterias que componen el complejo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*) y permite el crecimiento de las micobacterias diferentes del complejo tuberculosis, de tal forma que las micobacterias que presentaron índices de crecimiento inferior a los cultivos control se consideraron tuberculosas (figura 2).

**FIGURA 1**

**PROCEDIMIENTO DE PRIMO AISLAMIENTO  
MÉTODO RADIOMÉTRICO**



1. Establecer una atmósfera de 5-10 por ciento de  $\text{CO}_2$  en cada vial
2. Añadir 0.1 ml de PANTA a cada vial
3. Descontaminar la muestra y obtener el sedimento
4. Inocular con 0.2-0.5 ml
5. Incubar a  $37^\circ\text{C}$
6. Leer y registrar GI 2 veces por semana hasta tener cultivo POSITIVO 10 GI, los negativos en 6 semanas se desechan.
7. Los cultivos positivos leerlos diariamente hasta 100 GI y continuar con pruebas de pureza e identificación preliminar.

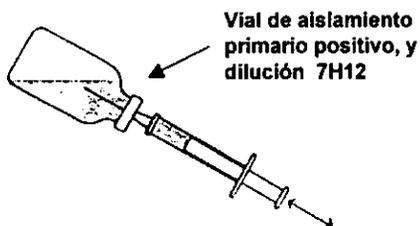


**FIGURA 2**

**PROCEDIMIENTO DE DIFERENCIACIÓN DEL COMPLEJO TUBERCULOSIS POR EL MÉTODO RADIOMÉTRICO SENSIBILIDAD AL NAP**

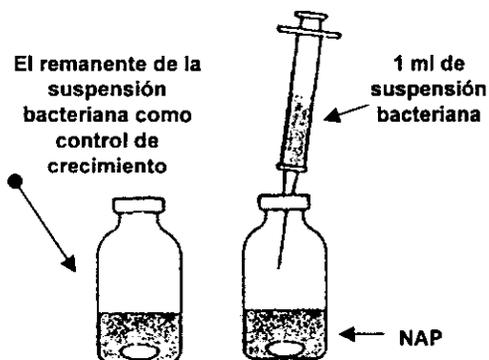
**A. Preparación del inóculo**

1. A partir de un cultivo puro con 100 GI, si excede de 100 GI, realizar dilución
2. Homogeneizar el cultivo.
3. Utilizar el cultivo o la dilución para inocular a la prueba



**B. Procedimiento de diferenciación**

1. Transferir 1 ml del cultivo o dilución al vial con NAP.
2. Establecer una atmósfera de 5-10 por ciento de CO<sub>2</sub> en el vial control y de NAP.
3. Incubar a 37° C de 2-4 días.
4. Interpretar los resultados.

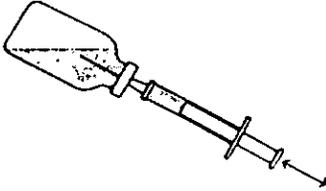


### **Análisis de sensibilidad de *M. tuberculosis*.**

El análisis de sensibilidad a antibióticos de los aislados de *M. tuberculosis* se realizó por el método SIRE de BACTEC TB-460, el cual es basado en medio de cultivo líquido y con monitoreo radiométrico del crecimiento de cultivos positivos de micobacterias durante 4 a 5 días. Para dicha prueba se utilizó el Kit SIRE (Becton & Dickinson, cat. 44022), el cual contiene una solución de rifampicina, disuelta en el medio 12 A (Becton & Dickinson), a una concentración final de rifampicina de 2 µg/ml. El cultivo fue considerado resistente si el 1 por ciento o más de la población de micobacterias creció en este medio. La resistencia fue determinada al comparar los índices de crecimiento de las cepas en los medios de cultivo, con respecto a la velocidad de crecimiento en cepas control de resistencia ya definida. Todos los frascos en los que se detectó índices de crecimiento mayores a los controles se cultivaron en agar sangre y agar chocolate por 96 hrs para identificar contaminación. En caso de existir ésta, los cultivos fueron eliminados ( figura 3).

FIGURA 3

ENSAYO DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS POR EL MÉTODO  
RADIOMÉTRICO



PREPARACIÓN DEL INÓCULO

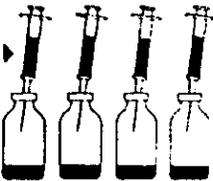
1. A partir de cultivo puro sensible a NAP con 300 GI.
2. Homogeneizar la suspensión bacteriana.



DROGAS



Suspensión  
bacteriana



Medio con  
drogas

Suspensión bacteriana  
y líquido diluyente



1:100 Suspensión  
bacteriana



Suspensión bacteriana  
Medio + drogas

PROCEDIMIENTO DE  
SENSIBILIDAD

1. Establecer atmósfera de 5-10 por ciento de CO<sub>2</sub> en cada vial
2. Añadir los antibióticos.
3. Inocular cada vial con antibióticos con 0.1 ml de suspensión bacteriana.
4. Para el control hacer una dilución 1:100.
5. Inocular un vial sin drogas con 0.1 ml de dilución 1:100 (Control).
6. Incubar a 37°C.
7. Leer diariamente, registrar los valores de GI.
8. Interpretar los resultados del cuarto día en adelante con valores GI  $\geq$  30 para el control

## Método de PCR-Hibridación en línea

Las alícuotas de expectoración almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  se procesaron al mismo tiempo y en forma cegada para la extracción del DNA de acuerdo al método descrito por Telenti con algunas modificaciones<sup>(36)</sup>. La amplificación por PCR utilizó iniciadores que corresponden al gen *rpo B*, como se describe a continuación.

## Extracción de DNA de *M. tuberculosis*

La extracción del DNA se realizó en muestras descontaminadas de la 2<sup>da</sup> alícuota de expectoración. Para ello los sedimentos de las expectoraciones se colocaron en tubos eppendorf (Robbins Scientific, USA<sup>R</sup>) estériles y se aforaron a 1.5 ml con TE1X (Anexo 1). Las micobacterias se inactivaron por calentamiento en un baño con agua a  $80^{\circ}\text{C}$  por 40 min. Posteriormente, el sedimento se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó en una microcentrifuga refrigerada Sorvall RMC 14 (DuPont, Newtonwn, Conn., USA) a 14 000 rpm por 10 min y el sobrenadante se retiró. La pastilla obtenida se resuspendió con 300  $\mu\text{l}$  de TE 1X y la lisis celular se inició agregando 50  $\mu\text{l}$  de lisozima a 10 mg/ml (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). Las muestras se

incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente se agregaron 75µl de una solución de SDS/Proteinasa K (Anexo 1) y las muestras se agitaron vigorosamente (Vortex, Lab-Line Instruments, Melrose Park, Ill) por 10 seg. Posteriormente, las muestras se incubaron a 65° por 10 min agregando 100 µl de NaCl 5 M (Merck, México) y se mezclaron con agitación suave. Para precipitar los complejos de glicoproteínas, lipoproteínas y carbohidratos se agregaron 100 µl de solución de CTAB/NaCl (anexo 1), el cual previamente fue calentado a 65°C. Las suspensiones se agitaron enérgicamente en vórtex por 10 seg observándose una consistencia lechosa. Las muestras fueron incubadas a 65°C en placa de calentamiento por 10 min y posteriormente se realizaron las extracciones fenólicas agregando a cada muestra un volumen de fenol saturado con Tris 10 mM (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). Las muestras se agitaron nuevamente en vórtex por 10 seg y posteriormente se centrifugaron en una microcentrífuga refrigerada a 12000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes fueron transferidos a un tubo eppendorf estéril y las muestras se extrajeron nuevamente con un volumen de cloroformo al 100 por ciento (JT Baker, México). Esta nueva extracción produjo fases acuosas que fueron depositadas en tubos eppendorf estériles. Los ácidos nucleicos se precipitaron con un volumen de Isopropanol (Sigma, San Louis, MO, USA), incubando en hielo por 30 min. La pastilla de DNA se obtuvo por centrifugación a 14 000 rpm a 4°C. Las pastillas de DNA fueron lavadas por centrifugación a 4°C a 14 000 rpm por 5 min con 300µl de etanol frío al 70 por

ciento (Merck, México). Las pastillas se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron con 20  $\mu$ l de agua estéril desionizada, usando calentamiento a 65°C por 5 min. El DNA obtenido, se guardó a - 20°C hasta su uso.

#### Amplificación del gen *rpo B* de *M. tuberculosis*

La amplificación del gen *rpo B* de las muestras de DNA obtenido del sedimento de las expectoraciones se realizó por PCR anidado en dos pasos consecutivos. Los iniciadores externos e internos utilizados son mostrados en la tabla I.

Iniciador	Secuencia	Marcado	Concentración
OP1	GAGAATTCGGTCGGCGAGCTGATCC3'	--	50 pmol/ $\mu$ l
OP2	CGAAGCTTGACCCGCGGTACACC3'	--	50 pmol/ $\mu$ l
IP1	GGTCGGCATGTGCGGGATGG 3'	Biotina	50 pmol/ $\mu$ l
IP2	GCACGTGCGGACCTCCAGC3'	Biotina	50 pmol/ $\mu$ l

Tabla I. Secuencia de los iniciadores utilizados para amplificar los fragmentos de 395 pares de bases (pb) y de 257 pb biotinilados, correspondientes ambos al gen *rpo B* de los aislados de *M. tuberculosis*.

En una campana de flujo laminar clase II tipo A/B3 (NUAIRE™ Francia) se prepararon para los ensayos de PCR las siguientes mezclas de reacción mostradas en la tabla II.

REACTIVO	CONCENTRACION STOCK	$\mu$ l POR CADA REACCIÓN
DNA		1 $\mu$ l
DNTP's	5mM	8 $\mu$ (2 c/u)
Buffer PCR	10 x	5 $\mu$
Iniciador OP1	50 pmol/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Iniciador OP2	50 pmol/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	20X-30mM	3.2 $\mu$ l
Taq polimerasa *	5 U/ $\mu$ L	0.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		30.3 $\mu$ l

**Tabla II. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción de PCR.**

\* (Biotecnologías Universitarias S.A. México).

Las muestras de DNA se amplificaron en un tubo de PCR, se tomó 49  $\mu$ l de la mezcla de reacción y 1 $\mu$ l de DNA de cada sedimento por separado. Las mezclas se agitaron levemente y se centrifugaron por 5 seg a 14,000 rpm en una microcentrífuga y se introdujeron en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp System 9600 (San José Cal, EUA). Las siguientes características fueron usadas para la amplificación externa:

- 1) 94° C por 3 min
- 2) 35 ciclos de PCR en las siguientes condiciones:
  - a) desnaturalización del DNA a 94°C por 45 seg
  - b) alineamiento de los iniciadores a 58° C por 45 seg
  - c) extensión del DNA a 72° C por 45 seg
- 4) Mantener a 4° C indefinidamente

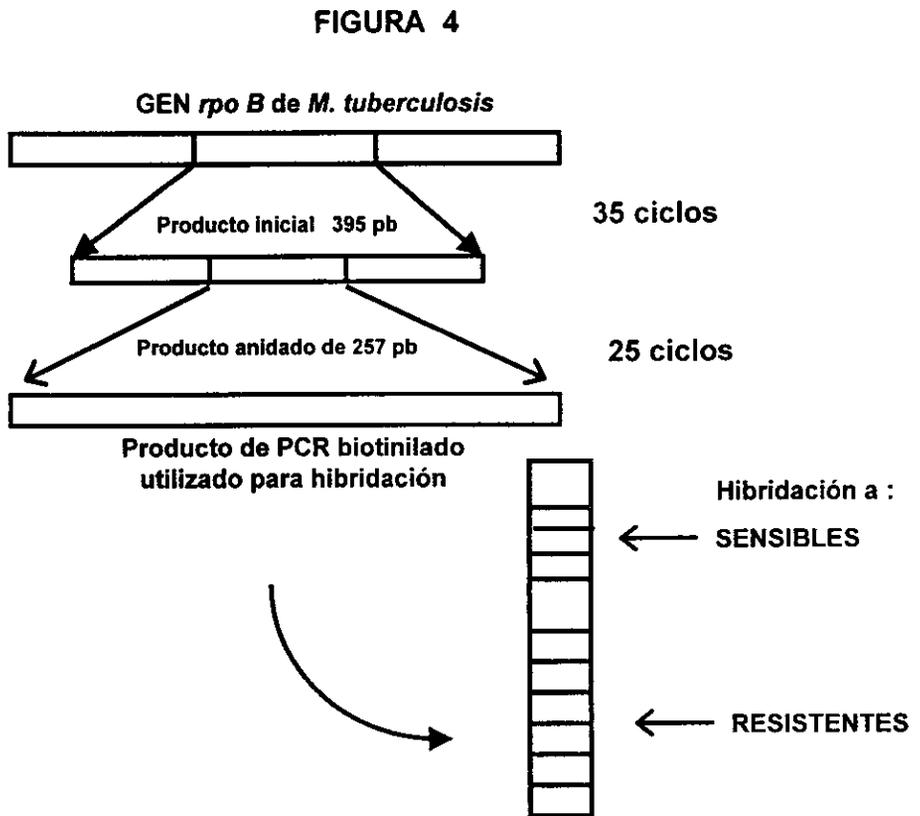
Para la amplificación interna se tomó 1  $\mu$ l del producto de la primera amplificación como DNA molde y se utilizaron los iniciadores internos (IP1 e IP2), los cuales estaban marcados con biotina. Para el ensayo de PCR, se preparó la misma mezcla de reacción y la amplificación se llevó por 25 ciclos bajo las siguientes condiciones:

- 1) 94° C por 3 min
- 2) 25 ciclos de PCR en las siguientes condiciones:
  - a) desnaturalización del DNA a 94°C por 45 seg
  - b) alineamiento de los iniciadores a 66° C por 45 seg
  - c) extensión del DNA a 72° C por 45 seg
- 4) Mantener a 4° C indefinidamente

Para las mezclas de reacción, se utilizaron puntas con filtro (Rainin, USA) para evitar contaminación con aerosoles que pudieran contener moléculas de DNA exógeno. En todos los casos se incluyeron un control positivo y uno negativo sin DNA y la mezcla de reacción siempre se preparó en exceso de 1 ó 2 muestras.

En la primera amplificación, se usaron los iniciadores externos OP1 y OP2 y se obtuvo un producto de 395 pares de bases; en la segunda, para el PCR anidado, se usaron los iniciadores internos IP1 e IP2 y se obtuvo un

producto de 257 pares de bases del gen *rpo B*. Cabe resaltar que los productos de PCR anidado estaban marcados en los extremos 5'OH con biotina, dado que estos fueron los productos que se utilizaron posteriormente en la reacción de hibridación en línea (Figura 4).



**FIGURA 4.** Representación esquemática del PCR anidado con lo que se obtiene un producto específico del gen *rpo B* de *M. tuberculosis* el cual es utilizado como sonda de hibridación.

Con la finalidad de observar y corroborar la amplificación y los pesos moleculares esperados de los productos amplificados de PCR se realizó una electroforesis en geles de agarosa de la siguiente manera: se preparó un gel de agarosa (BioRad California, EUA) al 2 por ciento usando como amortiguador TAE IX (Anexo 1). La solución de agarosa se obtuvo por calentamiento en un horno de microondas (Packard bull<sup>MR</sup>) hasta ebullición. Cuando la agarosa disuelta en agua, alcanzó una temperatura aproximada de 55 °C fue mezclada con 2 ml de buffer TAE 50 X (Anexo 1) y fue vertida en una cámara de electroforesis Horizon 11.14 (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). El peine para generar los pozos de corrida fue depositado en el gel y este se dejó hasta que el gel solidificara. De cada muestra obtenida por PCR, se tomaron 5 µl de los productos de reacción, tanto del producto obtenido de la amplificación externa (395 pb) como del producto obtenido de la amplificación interna (257 pb). Éstos se mezclaron con 1 µl de buffer de muestra 6X; las mezclas se aplicaron en el gel de agarosa, colocando 2µl del DNA de pBR322/Msp1 (Biotecnologías Universitarias S.A, México) como marcador de peso molecular de bajo rango. La corrida se llevó a cabo por un periodo de 1.5 hrs a 64 voltios con la ayuda de una fuente de poder modelo 14 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). Después de la corrida, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), a una concentración de 0.5 µg/ml, por un periodo de 5 minutos. Posteriormente, los

geles se enjuagaron por 1 min en agua desionizada. Enseguida el gel se observó con un transiluminador de luz UV 2011 MACROUVE (UVP, Inc, San Gabriel, CA., USA) con el cual se observó la amplificación y la integridad de las bandas de 395 pb y 257 pb. Los productos en los que se observó amplificación en el PCR anidado, se utilizaron posteriormente para la hibridación en línea.

#### Hibridación en línea reversa:

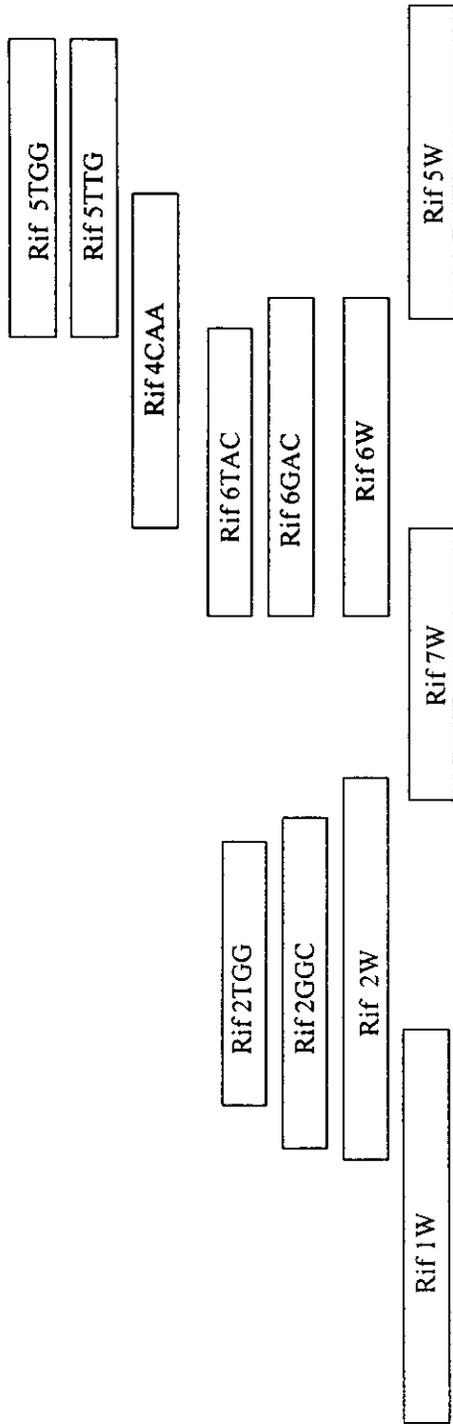
Para la preparación de la membrana utilizada en la hibridación en línea se preparó una membrana que contenía tanto oligonucleótidos con mutaciones asociadas a resistencia como secuencias silvestres. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron derivadas de la secuencia de DNA de 89 nucleótidos del gen *rpo B* de cepas de *M. tuberculosis*, en donde se ha encontrado la zona de alta mutación relacionada a resistencia (figura 5). Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados con un grupo amino terminal en la posición 5' (Lakeside, México), lo que permitió unirlos covalentemente a un grupo carboxil de una membrana Biodyne C (Pall biosupport USA ) con grupos de carga negativa. La secuencia de los oligonucleótidos son enlistados en la tabla III.

No. de Oligo	Tipo	Nombre del oligo	Secuencia (5'-3')	Concentración (pmol/150 µl)
1	Silvestre	Rif 1W	AGCCAGAGCCAATTCAT	12.5
2	Silvestre	Rif 2W	TTCATGGACCAGAAACCCG	12.5
3	Silvestre	Rif 7W	GCTGTCCGGGTTGACC	100
4	Silvestre	Rif 6W	TTGACCCACAAGCGCCGA	50
5	Silvestre	Rif 5W	CTGTTCCGGCGCTGGGGC	100
6	Mutante	Rif 2GGC	TTCATGGGCCAGAACCAACC	50
7	Mutante	Rif 2TGG	CATGGTGGACCAGAACCAACC	50
8	Mutante	Rif 6GAC	TTGACCGACAAGCGCCGA	100
9	Mutante	Rif 6TAC	TTGACCTACAAGCGCCG	200
10	Mutante	Rif 4CAA	CACAAGCGCCAACACTGTCG	100
11	Mutante	Rif 5TTG	CTGTTGGCGCTGGGGC	100
12	Mutante	Rif 5TGG	CTGTGGGCGCTGGGGC	100

**Tabla III. Secuencia y concentración de los oligonucleótidos fijados a la membrana Biotodyne C (Pall biosupport) del gen *rpo B* de *M. tuberculosis***

La membrana Biotodyne C fue activada en un tubo de hibridación (Robbins Scientific<sup>®</sup> Cal USA) por incubación durante 15 min en 10 ml de una solución recién preparada de EDAC (Sigma Chemical Co, USA) al 16 por ciento disuelta en agua desmineralizada. Posteriormente, la membrana se colocó en un contenedor de plástico y se lavó con agua desmineralizada por 2 min. La membrana lavada fue entonces colocada sobre un soporte (Immunelectrics, 380 Green street, Cambridge, Mass. 02139, USA) y dentro de un sistema miniblotted (Immunelectrics, 380 Green street, Cambridge, Mass. 02139, USA). Los 13 oligonucleótidos mostrados en la tabla III se diluyeron en 150 µl de 0.5 M de NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.4 (Merck, México), a las concentraciones enlistadas en la tabla III. Los carriles del miniblotted se llenaron con 150 µl de la solución de oligonucleótidos diluidos, sin usar el primer carril del miniblotted y llenando

**FIGURA 5**  
**MAPA DE LA ZONA DE ALTA MUTACIÓN DEL GEN *rpo B***



AGC CAG CTG AGC CAA TTC ATG GAC CAG AAC AAC CCG CTG TCG GGG TTG ACC CAC AAG CGC CGA CTG TCG GCG CTG GGG

**FIGURA 5.** Mapa de la zona de alta mutación del gen *rpo B* de *M. tuberculosis* que se asocia a resistencia a rifampicina, así como el sitio de localización de los oligonucleótidos utilizados derivados de la secuencia de DNA de cepas silvestres y susceptibles.

los carriles del 2 al 13 con los oligonucleótidos en el orden respectivo. Como marcador se usó tinta china (Pelikan México), la cual se diluyó 1:100 en un amortiguador 2xSSPE. Ésta se colocó en los carriles 1 y 14 del miniblotter, con el objeto de marcar los extremos del sitio donde fueron aplicados los oligonucleótidos con las secuencias silvestres y mutantes. Cuando todas las muestras se aplicaron, la membrana se dejó incubar por 1 min a temperatura ambiente, permitiendo así que los oligonucleótidos con el grupo terminal amino se unieran covalentemente a el grupo carboxil de la membrana. Posteriormente, la solución de los oligonucleótidos se retiró por aspiración en el mismo orden en que se aplicaron las muestras en los carriles y la membrana fue retirada del miniblotter usando pinzas. La membrana se incubó en 200 ml de una solución recién preparada de 0.1 M NaOH por 10 min a temperatura ambiente. Para inactivar la membrana, esta se enjuagó con agua desmineralizada y se incubó posteriormente con 100 ml de 20 mM EDTA pH 8 por 15 min a temperatura ambiente. Para evitar la deshidratación de la membrana, ésta se colocó y se guardó hasta su uso a 4°C en una bolsa de hibridación ( Gibco BRL Bethesda Research Laboratories).

Una vez preparada la membrana y contando con los productos de PCR marcados con biotina, se procedió a la hibridación en línea de fase reversa, la cual permitió que los productos de PCR marcados con biotina, obtenidos del DNA amplificado de cada sedimento, fueran hibridados con los

oligonucleótidos que se encuentran fijados en la membrana. Debido a que el DNA de doble cadena no puede hibridar con los oligonucleótidos, los productos de PCR fueron previamente desnaturalizados por calentamiento a 100°C por 5 min. Posteriormente, se realizó la hibridación a la membrana y en seguida se lavó para remover los productos de PCR unidos inespecíficamente.

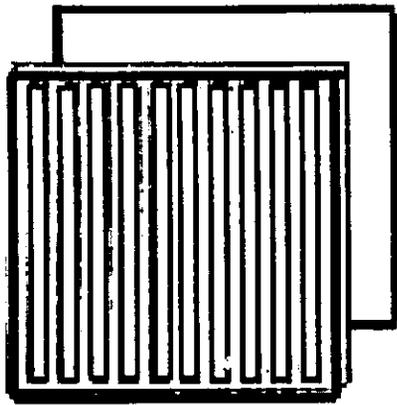
Las condiciones de hibridación y los lavados se hicieron de acuerdo a las siguientes soluciones, las cuales previamente se pre-calentaron a las siguientes temperaturas;

1. 250 ml. 2xSSPE/0.1% SDS, 60°C
2. 500 ml. 2xSSPE/0.5% SDS, 60°C
3. 500 ml. 2xSSPE/0.5% SDS, 42°C
4. 500 ml. 2xSSPE a temperatura ambiente.

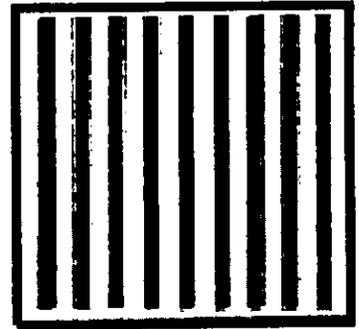
Para la hibridación se tomaron 10 µl de cada producto de PCR, diluidos en 150µl 2xSSPE/0.1% SDS (Anexo 1). Los productos se desnaturalizaron a 100°C por 10 min y se colocaron inmediatamente en hielo con la finalidad de mantener las cadenas separadas. La membrana se lavó por 5 min a 50°C en 2xSSPE/0.1% SDS y se colocó sobre el miniblotteder, de tal forma que los carriles quedaron en forma perpendicular al patrón de líneas en que fueron aplicados originalmente los oligonucleótidos (figura 6). El líquido residual de los carriles fue retirado por aspiración. Los 150 µl de los productos de PCR diluidos fueron

depositados en los carriles del miniblotter evitando la formación de burbujas. La reacción de hibridación se efectuó durante 45 min, a 50°C, en una base horizontal, dentro de un horno de hibridación (Robbins Scientific 400<sup>R</sup> Cal. USA) y sin agitación. En los carriles vacíos, se depositaron 150 µl de 2xSSPE/0.1% SDS. Las muestras del miniblotter fueron retiradas por aspiración y la membrana se retiró del miniblotter usando pinzas. La membrana se lavó dos veces dentro de un tubo de hibridación con agitación usando 250 ml. 2xSSPE/0.5% SDS durante 10 min a 55°C.

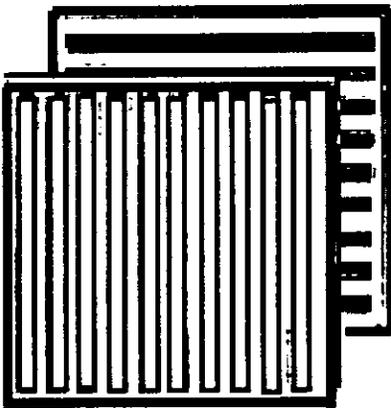
La detección de la señal que identificó la hibridación de los productos de PCR biotinilados a los diferentes oligonucleótidos en la membrana, se efectuó por una reacción de quimioluminiscencia. Para ello, la membrana se colocó en un tubo de hibridación a temperatura ambiente para evitar la inactivación de la fosfatasa alcalina. El conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina se diluyó en 10 ml de 2X SSPE/0.5%SDS a una concentración final de 1 U/ml. La membrana se incubó con esta solución por 30 min a 42°C en un tubo de hibridación. Antes del revelado, la membrana fue lavada 2 veces con 250 ml de una solución 2x SSPE a temperatura ambiente, durante 5 min cada vez, para remover los residuos de SDS.



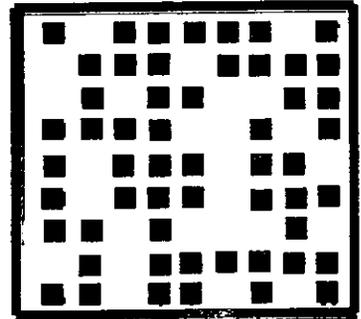
Aplicación de oligos en los carriles usando un miniblotted



Los oligos son unidos covalentemente en una línea horizontal a la membrana



Rotar la membrana 90°, aplicar el producto de PCR biotinilado e hibridar



Incubar con el conjugado de estreptavidina / fosfatasa alcalina y un sustrato y revelar exponiendo a una placa de rayos X

**FIGURA 6.** Representación esquemática del patrón de bandas en que fueron colocados los oligonucleótidos que identificaron cepas susceptibles y resistentes a rifampicina. Los productos de PCR biotinilados que fueron utilizados como sondas se colocaron perpendicularmente para el ensayo de hibridación.

Finalmente, para la detección la membrana fue colocada en una bolsa de hibridación y a ésta se le adicionaron 5 ml de reactivo CPD Start™ (Amersham Life London, UK). La bolsa se selló por calor y la reacción se dejó desarrollar por 5 min. Posteriormente, la bolsa se cortó en un extremo y el exceso de líquido fue eliminado, sellando nuevamente la bolsa por calor (figura 7). Los resultados de hibridación se obtuvieron al exponer por 30 min una placa de Hiperfilm ECL (Amersham international). Los resultados en la placa obtenida fueron analizados y comparados con los resultados de BACTEC TB-450 (figura 9 y 10).

Una vez obtenidos los patrones de hibridación, la membrana fue recuperada y lavada para su reutilización. En resumen; la membrana se lavó dos veces en 1 por ciento SDS a 80°C por 30 min y una vez con 20 mM EDTA pH 8 (Anexo 1) por 15 min a temperatura ambiente. La membrana se guardó en una bolsa de hibridación sellada, que contenía un pequeño volumen de EDTA 20 mM para evitar su deshidratación.

## FIGURA 7

### Detección de la señal de hibridación por quimioluminiscencia

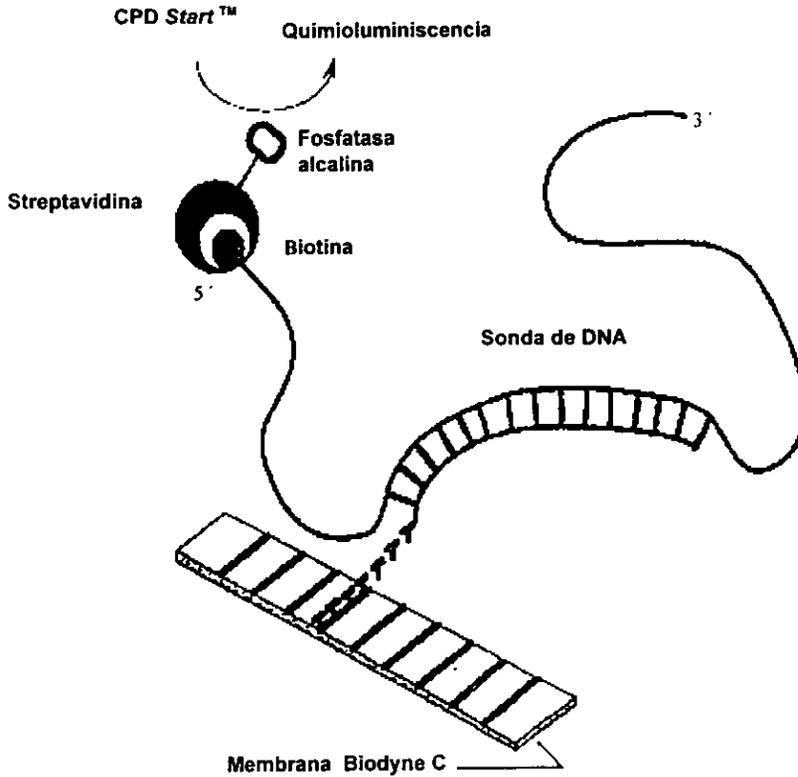


FIGURA 7. Representación esquemática de la hibridación en línea así como la detección de la reacción por quimioluminiscencia.

## **DISEÑO ESTADÍSTICO**

**Se realizaron tablas de 2X2 para obtener sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo y se calcularon para las mismas su intervalo de confianza al 95 por ciento.**

**La asociación entre rifampicina e isoniacida se calculó por  $X^2$  y se obtuvo su riesgo relativo para dicha asociación.**

**Así mismo se realizaron estadísticas descriptivas como son medidas de tendencia central de dispersión y porcentajes**

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

**El proyecto fue sometido a evaluación por el comité de investigación del Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez" del Centro Médico Nacional "La Raza" con el número de registro 05-09-04-97 .**

## **DISEÑO ESTADÍSTICO**

**Se realizaron tablas de 2X2 para obtener sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo y se calcularon para las mismas su intervalo de confianza al 95 por ciento.**

**La asociación entre rifampicina e isoniacida se calculó por  $X^2$  y se obtuvo su riesgo relativo para dicha asociación.**

**Así mismo se realizaron estadísticas descriptivas como son medidas de tendencia central de dispersión y porcentajes**

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

**El proyecto fue sometido a evaluación por el comité de investigación del Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez" del Centro Médico Nacional "La Raza" con el número de registro 05-09-04-97 .**

## RESULTADOS:

Se analizaron 80 sedimentos de expectoración de pacientes con el diagnóstico probable de TB pulmonar, los cuales se procesaron para la técnica de PCR-HLIN y por el método radiométrico BACTEC TB-460. Del total de 80 cultivos aislados de los pacientes, de ellos 37 (46.25 por ciento) , resultaron sensibles a las 4 drogas probadas (isoniacida, rifampicina, estreptomycin y etambutol); mientras que 43 (53.75 por ciento) de los pacientes presentaron aislados resistentes a cuando menos una droga. De los aislados resistentes, 6 (13.9 por ciento) fueron monorresistentes, 37 (46.25 por ciento) resultaron resistentes a dos drogas y 36 (45 por ciento) fueron resistentes a isoniacida y rifampicina; en 9 casos (11.25 por ciento) se encontró aislados resistentes a 3 drogas y solo se encontró 1 (1.25 por ciento) aislado resistente a las 4 drogas probadas.

Las sensibilidades obtenidas a los 4 antibióticos por el método radiométrico (BACTEC TB-460) de los 80 aislados obtenidos de sedimentos de expectoración estudiados se resumen en la tabla IV:

Fármaco	Cepa sensible	Cepa resistente	% resistencia
Estreptomina	71	9	11.25
Isoniacida	38	42	52.50
Rifampicina	42	38	47.5
Etambutol	77	3	3.75

**Tabla IV. Patrón de sensibilidad a los 4 antibióticos (SIRE) obtenido por BACTEC TB-460, de los aislados de *M. tuberculosis* de muestras de expectoración.**

De los 43 aislados en los que se observó patrones de resistencia, sólo 6 fueron monorresistentes; de estos, 5 fueron resistentes a isoniacida y uno a rifampicina, mientras que la distribución de multirresistencia fue; Isoniacida, rifampicina y otro fármaco en 37 (86 por ciento) , de estos 36 (83.7 por ciento) presentaron resistencia a isoniacida y rifampicina y en solo caso se presentó resistencia a isoniacida y estreptomina.

La resistencia a rifampicina y su asociación con la resistencia a isoniacida mostró una  $X^2 = 51.78$  ( $p = < 0.0001$ ) y un riesgo relativo de 16.29 (I.C. al 95% de 4.2 – 63.5 por ciento).

En los 80 sedimentos de expectoración trabajados por la técnica de PCR-HLIN se logró su amplificación (figura 8) sin haber encontrado factores inhibidores de la amplificación, para posteriormente llevarse a la hibridación en línea reversa, con lo que se obtuvieron los siguientes resultados.

FIGURA 8

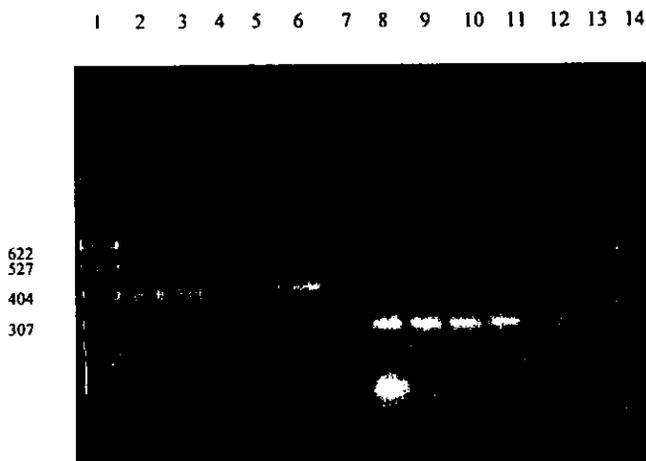


FIGURA 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se observa la amplificación del gen *rpo B* de *M. tuberculosis* en 5 DNAs de sedimentos tomados al azar. A la izquierda en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de bajo rango y en seguida se muestra el fragmento largo (carriles 2-6) producto de 395 pb, en el carril 7 se tiene el control negativo de la primera amplificación. A la derecha se observa el producto biotinilado de PCR de 257 pb (carriles 8-12) utilizado en el ensayo de PCR-HLIN y por último en el carril 13 el control negativo del PCR anidado.

En una primera fase se estandarizó la técnica de PCR-HLIN en 39 aislados puros y bien identificados de *M. tuberculosis*; por el método radiométrico de BACTEC TB-460 resultaron 18 sensibles y 21 resistentes y por el método de PCR-HLIN resultaron 17 sensibles y 22 resistentes.

Posteriormente en una segunda fase, una vez estandarizada la técnica se trabajaron las alicuotas de los sedimentos de expectoración. Para ello en cada membrana se colocaron los productos de PCR de 40 muestras. En la figura 9, panel 1 se colocaron controles negativos en los carriles 1, 27 y 42. En la misma figura pero en el panel 2 se colocaron controles negativos en los carriles 1, 42, 43, 44 .

Como se muestra en la figura 9 (paneles 1 y 2) de los 80 sedimentos estudiados por el método de PCR-Hibridación en línea para la detección de resistencia a rifampicina, 41 (51.25 por ciento) presentaron mutaciones asociadas a resistencia, mientras que por el método radiométrico, solo 38 (47.5 por ciento) fueron resistentes. El resto de las muestras 39 (48.75 por ciento) fueron identificadas con este método como sensibles, mientras que por el método radiométrico fueron identificadas 42 (52.5 por ciento), con los datos antes mencionados se realizó una tabla de 2X2 para el análisis estadístico (tabla V).

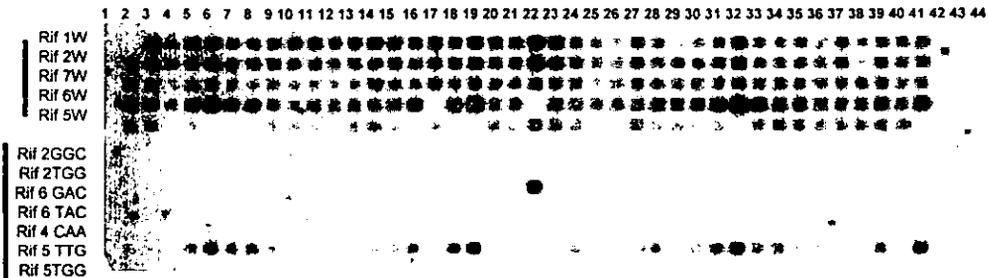
## FIGURA 9

### Ensayo típico de hibridación en línea

#### Panel 1



#### Panel 2



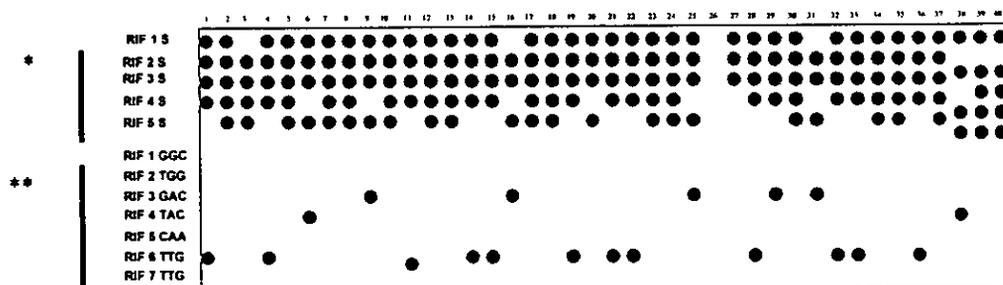
\* Oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de *rpo B* sin mutaciones

\*\* Oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de *rpo B* con mutaciones

FIGURA 9. Resultado de hibridación en línea para 80 muestras de DNA de sedimentos de expectoración de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar. A la izquierda de la figura se presentan las denominaciones de los oligonucleótidos que cubren la región de 89 nucleótidos de la zona de mutación del gen *rpo B* y que se asocia a resistencia a rifampicina. En la parte superior se sitúan las secuencias silvestres (sin mutación) mientras que en la parte inferior, todas aquellas que se han asociado a mutaciones que confieren resistencia al antibiótico. La colocación de las muestras se describe en el texto.

FIGURA 10

REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA PCR-HLIN



- Oligonucleótidos correspondientes a la secuencia del gen *rpo B* sin mutación
- \*\* Oligonucleótidos correspondientes a la secuencia del gen *rpo B* con mutación

FIGURA 10. Representación esquemática del panel 1. La numeración de la parte superior corresponde a cada una de las muestras en que se colocaron en el blotter, a la izquierda de la figura se presentan las denominaciones de los oligonucleótidos de la zona de alta mutación del gen *rpo B*. Se observan los sitios de hibridación en línea en los sitios correspondientes a oligonucleótidos de DNA de cepas sensibles y resistentes respectivamente.

	RESULTADO DEL MÉTODO RADIOMÉTRICO		
	(+)	(-)	
RESULTADO (+)	36	5	41
DE PCR-HLIN (-)	2	37	39
	38	42	80

Tabla V. Tabla de 2x2 donde se observan los resultados obtenidos por ambos métodos

**Bajo el análisis estadístico usado y los datos antes mencionados, nuestra prueba diagnóstica; cuando se estandarizó a partir de aislados puros y bien caracterizados se obtuvo una sensibilidad de un 100 por ciento y una especificidad de 94 por ciento, con un valor predictivo positivo de 95 por ciento y un valor predictivo negativo de 100 por ciento.**

**Cuando se realizó a partir de sedimentos de expectoración, mostró una sensibilidad de un 94.7 por ciento (I.C. 80.9 - 99.1), y una especificidad de un 88.1 por ciento (I.C. 73.6 - 95.5), con un valor predictivo positivo de 87.8 por ciento (I.C. 73 - 95.4) y un valor predictivo negativo de 94.9 por ciento (I.C. 81.4 - 99.1) con una exactitud total de la prueba de un 91.25 por ciento, comparado con el método radiométrico.**

**Para analizar las mutaciones identificadas por el método de PCR-HLIN, se correlacionó el sitio de hibridación de la sonda con respecto a los oligonucleótidos resistentes y la substitución del aminoácido correspondiente. Los resultados son mostrados en la tabla VI.**

No. de sedimentos con mutación	Posición de mutación	Substitución	
		Original	→ Nuevo
28	531	SERINA	LEUCINA
7	526	HISTIDINA	ASPARTICO
2	526	HISTIDINA	TIROSINA
5	?	DESCONOCIDO	

Tabla VI. Frecuencia de mutaciones del gen *rpo B* asociadas a resistencia a rifampicina de *M. tuberculosis* amplificado a partir de sedimentos de expectoración.

La mayor frecuencia de mutación se encontró en el aminoácido 531, siendo el reemplazo de serina por leucina el más frecuente. En 5 casos no hubo hibridación con los oligonucleótidos resistentes pero hubo ausencias en alguno de los 5 oligonucleótidos sensibles, por lo que fueron considerados resistentes.

## DISCUSIÓN

La finalidad del presente estudio fue obtener un método de diagnóstico más rápido y efectivo que los métodos tradicionales para determinar la resistencia a rifampicina, a partir de sedimentos de expectoración de pacientes con diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar.

En los últimos años se establecieron los mecanismos moleculares de la resistencia a rifampicina. Así, se ha establecido que mutaciones en el gen *rpo B* que codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa se ha asociado con su resistencia, con lo que se han desarrollado nuevas técnicas para su diagnóstico. Entre otros métodos tenemos a la secuenciación del DNA, el cual es considerado el mejor método molecular para detectar mutaciones. La desventaja de este método es que se requieren de equipos complicados y de alta tecnología, además de los altos costos que esto implica. Por otro lado este método se ha considerado el estándar de oro para evaluar métodos que tratan de detectar mutaciones en forma indirecta <sup>(36,40-46)</sup>.

Entre otros métodos descritos para determinar en forma indirecta las mutaciones del gen *rpo B* se encuentra el polimorfismo en la movilidad de

**cadena sencilla del DNA (SSCP), el cual se basa en la diferencia de estructura que presenta el gen *rpo B* debido a las mutaciones, éste cambio de estructura influye en la velocidad de migración en un gel de agarosa. A diferencia del ensayo de PCR-HLIN, este método no es capaz de analizar muestras de sedimentos ya que se requiere de aislados puros bien identificados. Por otro lado, este método no diferencia entre mutaciones silenciosas ya reportadas previamente y que no son asociadas a resistencia, con lo cual pudiera generar falsos positivos, como ha sido demostrado por las bajas sensibilidades y especificidades obtenidas hasta ahora. La principal causa de esto ha sido sugerida que radica en la capacidad del personal que realiza esta técnica <sup>(40-41)</sup>.**

**Otro de los métodos ampliamente descritos es el ensayo comercial INNO-LiPA Rif. TB el cual, ya se encuentra en uso en algunos laboratorios de diagnóstico clínico, este método se basa en la hibridación reversa y se ha obtenido una buena sensibilidad y especificidad, pero su uso en los países de 3er mundo es muy limitado debido a los altos costos del kit <sup>(43-45)</sup>. En este sentido el método de PCR-HLIN descrito aquí, se propone como un método alternativo en los países en desarrollo ya que se pueden realizar hasta 44 determinaciones de resistencia a rifampicina en un solo ensayo y la membrana se reutiliza hasta por más de 15 veces y probarla cada vez con diferentes DNA de sedimentos de expectoración.**

De lo anterior, es claro que el método de PCR-HLIN permite el diagnóstico de resistencia a rifampicina en sedimentos de expectoración de pacientes mexicanos con una alta sensibilidad y especificidad, por lo que se podría utilizar ampliamente en los laboratorios de referencia. No obstante que presenta una disminución en los valores de sensibilidad y especificidad cuando se trabaja con DNA amplificado a partir de sedimentos de expectoración, con respecto al uso de DNA obtenido de cultivo (en donde se tiene 100% de sensibilidad y especificidad de 97%), los valores son suficientemente altos como para considerarla una buena prueba. Las razones por las cuales ocurre esta disminución pueden estar dadas por la posible coexistencia de dos o más micobacterias; de ahí que en nuestra membrana se observa en algunos productos amplificados hibridación con todos los oligonucleótidos sensibles y en algunos de los resistentes, lo que hace suponer la existencia de diferentes sensibilidades en un mismo paciente. Esta discrepancia también fue observada por el método de INNO LiPA Rif Tb <sup>(44)</sup>. Otra posible razón puede ser la presencia de otras mutaciones asociadas a resistencia pero fuera de la región analizada de 89 nucleótidos y que pudiera estar presente en aislados de diferente área geográfica; esto podrá asegurarse cuando se realice secuenciación en un mayor número de aislados de origen mexicano.

Una de las deficiencias de nuestro método es la falta de un marcador específico del complejo tuberculosis, ya que como se ha demostrado por otros autores, el PCR anidado del gen *rpo B* no es completamente específico para dar una amplificación, por lo que se pudieran amplificar DNA de otras micobacterias<sup>(44)</sup>. En nuestro caso, en todos los sedimentos que se trabajaron hubo el aislamiento por cultivo e identificación de micobacterias del complejo tuberculosis, por lo que la especificidad se conservó alta. Este análisis podría mejorarse si además se analizaran muestras de expectoraciones que contengan micobacterias diferentes al complejo tuberculosis.

El ensayo de PCR-Hibridación en línea permite la detección a partir de sedimentos de expección de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina en 72 horas a diferencia del método radiométrico que se requieren de 6-8 semanas y con un costo en reactivos inicial de \$89,100.00 MN con lo que se podrán analizar 19 800 sedimentos, lo que da un costo por muestra de \$4.50 MN en reactivos; comparado con el método radiométrico que requiere aproximadamente de \$1000.00 MN por muestra, el método de PCR-HLIN puede ser de gran ayuda en los países en desarrollo. La desventaja del método PCR-HLIN es que sólo se evalúa una droga comparada con las 4 determinadas por el método radiométrico. Otra de las desventajas del método de PCR-HLIN es que solo se reporta como sensible o resistente sin poder realizar la determinación de resistencia en función de su concentración mínima inhibitoria, aunque ésta

misma deficiencia la tiene el método radiométrico. Hasta el momento, otros autores han asociado el sitio de mutación con el grado de resistencia; de esta manera, han reportado que la mutación en el aminoácido 531 se ha asociado con una concentración mínima inhibitoria > 64 µg/ml, por lo que de acuerdo a su tipificación genotípica se podrá tener su perfil fenotípico <sup>(46-47)</sup> .

El sitio de mayor frecuencia de mutación en las cepas de *M. tuberculosis* analizadas corresponde al aminoácido 531 (Ser-Leu), con un total de 28 de 42 cepas resistentes, lo que corresponde a un 66.6 por ciento. Este valor se encuentra por arriba de los reportes internacionales que van de 35 a un 44 por ciento. En algunos casos no hubo hibridación por lo que probablemente correspondió a mutación fuera de la región de 89 nucleótidos o a mutación de baja frecuencia que no son cubiertos por los oligonucleótidos usados por el ensayo. Esto requiere por lo tanto de un estudio de secuenciación de DNA <sup>(36,44)</sup> . El hecho de que un gran porcentaje de aislados mexicanos de *M. tuberculosis* presenta esta mutación, puede facilitar la determinación de resistencia a rifampicina por el método de PCR-HLIN <sup>(38,44)</sup> . Ésto último se refuerza además en el hecho de que existe una gran asociación entre la resistencia de *M. tuberculosis* a rifampicina y la encontrada con isoniacida (37 aislados contra 35 respectivamente). Esto que se ha observado en nuestro estudio también ha sido informado en otros países, por lo que el método de PCR-HLIN podría también considerarse como un método capaz de identificar multidrogorresistencia <sup>(36,43)</sup> .

**Es de llamar la atención que en la mayoría de los aislados resistentes se encontró esta asociación entre la resistencia a isoniacida y rifampicina así como la poca presencia de monoresistencia a rifampicina o asociada con otras drogas. Así, de 43 aislados que se encontraron resistentes a algún fármaco, 37 presentaron un patrón de multidrogorresistencia asociado a rifampicina, por lo que el determinar la resistencia a rifampicina tiene un valor predictivo alto de multidrogorresistencia .**

o

## ANEXO 1

### SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES UTILIZADOS

#### SOLUCIONES STOCK GENERALES

##### 20X SSPE

0.2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	35.6 g/l
3.6 M NaCl	210.24 g/l
20 mM EDTA	7.4 g/l

Ajustar a pH de 7.4

Esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente (TA) máximo 1 año.

##### 10% SDS

10 g SDS / 100 ml agua desmineralizada

Disolver calentando a 65°C por 20 min.

No esterilizar en autoclave, guardar a TA no más de 1 mes.

##### 0.5 M EDTA, pH 8.0

186.12 EDTA/l de agua desmineralizada

Guardar a TA máximo 1 año.

##### Amortiguador TE 10x

(100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)

12.11 gr/l Tris

20 ml 0.5 M EDTA

Ajustar el pH a 8 con HCl concentrado y agua destilada a volumen final de 1 l

Esterilizar en autoclave y guardar a TA máximo 1 año.

##### 5M NaCl

29.2 g NaCl/100 ml de agua destilada

Esterilizar en autoclave y guardar a TA máximo 1 año.

**Isopropanol .**

Guardar a TA máximo 1 año.

**Etanol absoluto**

Guardar a TA máximo 1 año.

**Fenol buffer saturado**

Guardar a TA máximo 1 año.

**SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA**

**Amortiguador TE 1X**

Tomar 1 volumen de TE 10X y 9 volúmenes de ddH<sub>2</sub>O  
Esterilizar en autoclave y guardar máximo 1 año a TA.

**Solucion de lisozima**

10 mg lisozima/ml agua destilada  
Guardar en alícuotas a -20°C máximo 1 año.

**Proteinasa K**

Disolver 10 mg de proteinasa K en 1 ml  
de agua destilada estéril  
Guardar en alícuotas a -20° máximo 1 año.

**Mezcla de SDS/Proteinasa K**

Mezclar 5 µl proteinasa K (10 mg/ml) con 70 µl 10% SDS  
Mezclar antes de usar

**Solución de CTAB/NaCl**

Disolver 4.1 gr de NaCl en 80 ml agua destilada, añadir 10 gr CTAB (N-cetyl  
N,N,N-trimethyl bromuro amonio) y en caso necesario, calentar la solución a  
65°C, ajustar a un volumen de 100 ml con agua destilada.  
Guardar a TA no más de 6 meses.

**Cloroformo**

Guardar 4°C no más de 1 año.

**Etanol al 70%**

Mezclar 7 volúmenes de etanol con 3 volúmenes de agua destilada  
Guardar a TA no más de 1 año

## **SOLUCIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN *rpo B*.**

### **Buffer de PCR 10X**

**10 mM Tris-HCl, pH 9.0**

**1.5 mM MgCl<sub>2</sub>**

**50 mM KCl**

**0.1% Triton X-100**

**0.01% gelatina (w/v)**

**Guardar en alícuotas a -20° máximo 1 año.**

### **Amplificasa**

**5U taq polimerasa/μl.**

**Guardar a -20°C máximo 1 año.**

### **dNTP's**

**Agregar 10 μl de cada dNTP (solución 100 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y 360 μl de agua desionizada. Guardar en alícuotas a -20°C máximo 1 año.**

### **Agarosa 2%**

**Disolver 2 gr agarosa en 98 ml buffer de corrida TAE 1X**

**Preparar antes de su uso.**

### **Amortiguador de corrida TAE 1X**

**Tris- Base 0.04 M**

**EDTA 0.001 M**

## **SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA E HIBRIDACIÓN**

### **0.5 M NaHCO<sub>3</sub>, pH8.4**

**10.5 g NaHCO<sub>3</sub>/250 ml agua desmineralizada**

**Guardar a TA máximo 1 año.**

### **16% (w/v) EDAC (1-ethyl-3-(3dimethylaminoproyl)carbodiimide)**

**1.5 g EDAC/10 ml agua desmineralizada**

**Preparar antes de su uso.**

### **2xSSPE**

**Diluir 20xSSPE 10 veces en agua desmineralizada**

**Preparar antes de su uso.**

**Tinta china 1:100 en 2XSSPE**

100 µl de tinta china /900 µl 2xSSPE

Guardar a TA máximo 1 año.

**0.1 M NaOH**

0.8 g NaOH/200 ml agua desmineralizada

Preparar antes de su uso.

**2xSSPE/0.1% SDS**

100 ml 20xSSPE y 10 ml 10% SDS en 890 ml agua desmineralizada

Preparar antes de su uso.

**20mM EDTA, pH 8.0**

1 volumen 0.5 M EDTA/24 volúmenes de agua desmineralizada

Guardar a TA máximo 1 año.

**2xSSPE/0.1%SDS**

100 ml 20xSSPE y 10 ml 10% SDS/ 890 ml agua desmineralizada

Preparar antes de su uso.

**2xSSPE/0.5% SDS**

100 ml 20xSSPE y 50 ml 10%SDS/850 ml agua desmineralizada

Preparar antes de su uso.

**Conjugado de streptavidina-fosfatasa alcalina**

500 U/ml. Guardar a +4°C máximo 1 año.

**2x SSPE**

Diluir 20xSSPE 10 veces en agua desmineralizada

**CDP Start™**

Guardar +4°C máximo 6 meses.

**SOLUCIONES PARA RE-USO DE LA MEMBRANA.**

**1% SDS**

100 ml 10% SDS /900 ml agua desmineralizada

Guardar a TA máximo 1 mes

**20 mM EDTA, pH 8.0**

Mezclar 1 volumen de 0.5 M EDTA/24 volúmenes de agua desmineralizada

Guardar a TA máximo 1 año.

## BIBLIOGRAFIA

1. Daniel T. Tuberculosis en Isselbacher, KL; y cols, Harrison: Principios de Medicina Interna. Interamericana, McGramm-Hill, 1994, pag 827-36.
2. González SN y cols. Tuberculosis. Infectologa clínica. Ed. trillas 1989 pag 205-57
3. Control Disease Center. Management of personas exposed to multidrug-resistant tuberculosis. MMWR 41: (RR-11), pag 59-71.
4. Hoge CH, Fisher L, Donnell HD, Rodson DR, Tomlinson GV, Breiman RF, et al Risk Factors for Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in a Primary School Outbreak, Lack of Racial Difference in susceptibility to Infection. Am J Epidemiol 1994; 139: 520-30.
5. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, et al Transmission of tuberculosis in New York City. N Engl J Med 1994; 330:1710-6.
6. Edlin BR, Tokars JL, Grieco MH, Grauwford JT, Williams J, Sordillo EM, Ong KR, Kilburno JO. An outbreak of muldrug-resistan tuberculosis among hospitalized patients wisth the adquired inmunodeficiency syndrome, N Eng J Med 1992; 326: 1514-21.
7. Jereb JA, Burwen DR, Dooley SW, Mass WH, Crawford JT, Geiter LJ, Edmond MB, Dowling JN, Nosocomial OutBreak of Tuberculosis in a Renal Transplant Unit: Application of a New Technique for Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculsis Isolates. J Infect Dis 1993; 168: 1219-24.
8. Ramírez CE, Cicero SR, Lo esencial en diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis Medicine 1994; 16: 880-6.
9. Centers for Disease Control. Estimates of future global tuberculosis morbidity and mortaly MMWR 1993; 42: 961-4.
10. Ellner JJ, Hinman AR, Dooley SW, Fischl MA, Spekowitz KA, Goldberger MJ, Shinnick TM. Tuberculosis Symposium: Emerging Problems and promise. J Infect Dis 1993; 168: 537-51.
11. Sifuentes-Osornio J, Ponce de Leon LA, Camacho-Mezquital FE, Bobadilla del Valle JM, Infante-Suárez ML, Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos. Rev Invest Clin 1995; 47:273-81.
12. Boletín de Epidemiología, Sistema Unico de Información Núm. 39, Vol. 14, Semana 39.
13. Coronado VG, Beck-Sague CM, Hutton MD, David BJ, Nocholas P, Villarreal C, Woodley CL, Transmission of Multidrug-Resist *Mycobacterium tuberculosis* among Persons with Human Inmunodeficiency Virus Infection in a Urban Hospital: Epidemiologic and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. J Infect Dis 1993; 168: 1052-5.

- 14.Schafer RW, Small PM, Larkin C, Singh SP, Kelly P, Sierra MF, Temporal Trends and Transmission Patterns during the Emergence of Multidrug-Resistant Tuberculosis in New York City: A Molecular Epidemiologic Assessment. *J Infect Dis* 1995; 171: 170-6.
- 15.Salomon N, Perlman DC, Friedmann P, Buchstein S, Kreiswirth BN, Mildvan O, Predictors and Outcome of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Clinic Infec Dis* 1995; 21: 1245-52.
- 16.Friedman CR, Stoeckle MY, Kreiswirth BN, Johnson WD, Manoach SM, Berger J. Transmission of Multidrug-Resistant Tuberculosis in a Large Urban Setting. *Am J Respir Crit Car Med* 1995; 152: 355-9.
- 17.Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. Tuberculosis. Boletín informativo INDRE, 1993: 115-6.
- 18.Yeager H. Smith LR, Lacy J, LeMaistre CM, Quantitative studies of mycobacterial population in sputum and saliva. *Am Rev Respir Dis* 1967; 95: 998-1004.
- 19.Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, and Armstrong D, Tuberculosis in the AIDS Era, *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 180-99.
- 20.Shinnick TM, Good RC, Diagnostic Mycobacteriology Laboratory Practices. *Clinic Infec Dis* 1995; 21:291-9.
- 21.Falkinham J. Epidemiology of Infection By Nontuberculous Mycobacteria *Clinic Microbiol Rev* 1996; 9: 177-215.
- 22.Morris S, Bai HG, Suffys P, Portillo-Gómez L, Fairchok M and Rouse D. Molecular Mechanisms of Multiple Drug Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* , *J Infec Dis* 1995;171:954-60.
- 23.Laszlo A, Siddigi SM, Evaluation of a rapid radiometric differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis* complex by selective inhibition with p-nitro-acetalamino-b-hidroxipropophenone. *J. Clin Microbiol* 1984; 14:694-5.
- 24.Peterson EM, Floyd C. Lu R, Nakasone A, Friedly G and De la Maza LM, Direct identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium intracellulare* Amplified Primary cultures in BACTEC Media Using DNA Probes. *J Clinic Microbiol* 1989; 27: 1543-7.
- 25.Eisenach KD, Sifford MD, Lave MD, Bates JM, and Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a Polymerase chain Reaction. *An Rev Respir Dis* 1991; 144: 1160-3.
- 26.Hance AJ, Grandehamp B, Levy-Frebault V, Lecossier D,Rauzier J, Bocart D, Gicquel B, Detection and identification of Mycobacterium by amplification of mycobacterial DNA. *Mol Microbiol* 1989; 3: 843-9.
- 27.Nolte FS, Metchock B, McGowan JE, Edwrds A, Okwumabua O, Thurmond C. Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis in Sputum by Polymerse Chain Reaction and DNA Hibridation. *J Clinic Microbiol* 1993; 31: 1777-82.
- 28.Schluger NW, Rwsos WN, The polymerase Chain Reaction in the Diagnosis and Evaluation of Pulmonary Infections. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 11-6.
- 29.Bennedsen J. Thomsen VO, Pfyffer GE,Funke G, Feldmann K, Beneke A, et al, Utility of PCR in diagnosing Pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*

- 1996; 34: 1407-11.
30. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S., The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 192, 358:591-3.
  31. Bannerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, et al, *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994; 263: 227-9.
  32. Ristow M, Möhlig M, Rifai M, Schatz H, Feldmann K, Pfeiffer A, New isoniazid/ethionamide resistance gene mutation and screening for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Lancet* 1995; 346: 502-3.
  33. Jacobs RF. Multiple-Drug-Resistant Tuberculosis, *Clinic Infec. Dis* 1994; 19:1-10.
  34. Molecular Mechanisms of Multiple Drug Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infec Dis* 1995; 171: 954-60.
  35. Cole ST, and Telenti. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* *Eur Respir J* 1995; 8: 701-13.
  36. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341: 647-50.
  37. Chamberlain JS, Chamberlain JR. Optimization of Multiplex PCRs en Kary Mullis et al PCR The polymerase chain reaction De Birkhauser 1994, 38-45.
  38. Kimbere Chapin, Clinical Mycroscopy en Murray Patrick R, Manual of clinical microbiology. American Society for microbiology. 1995 33-51.
  39. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic Analisis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 1975; 50: 339-44
  40. Roberts GP, Drwyer B, *Mycobacterium* en Balows A. Manual of clinical microbiology 5a ed, American Societ of microbiology 1991, 304-39.
  41. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schimidheini T, Bodmer T. Direct, Automated Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Polimerase Chain reaction and Single-Strand Conformation Polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37 (10): 2054-8.
  42. Bum-Joon K, Seok-Yong K, Byoung-Hee P, Mi-Ae L, IL-Kyoo P. et al Mutation in the *rpoB* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-Single-Strand Conformation Polymorphismo Analisis for rifampin susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1997;35(2):492-4.
  43. Goyal M, Shaw RJ, Banerjee DK, Coker RJ, Robertson BD, Young BD, Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J* 1997;10:1120-4.
  44. Rossau R, Traore H, Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, Rijk P, Portaels F, Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB Assay, a Reverse Hybridization Assay for the Simultaneous Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and its Resistance to Rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41 (10): 2093-8.
  45. Matsiota-Bernard P, Vrioni G, Marinis E, Characterization of *rpoB* mutations in Rifampin-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece *J Clin Microbiol* 1998; 36 (1): 20-3.
  46. Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K, Relationship between rifampin

- MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40 (4): 1053-6.
47. Ohno H, Koga H, Kuroita T, Tomono K, Ogawa K, Yanagihara K, Yamamoto Y, et al Rapid prediction of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 2057-63.