

EVALUACIÓN DE UN ENSAYO DE PCR DUPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis* Y NO TUBERCULOSIS

Evaluation of a Duplex PCR Assay for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Nontuberculous Mycobacteria

Nailet Arráiz¹, Valmore Bermúdez¹, Zolay Romay², Nelba Faría² y Dámaso Mujica³

¹Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez", Sección de Biología Molecular, Facultad de Medicina.
Universidad del Zulia. E-mail: narraiz@cantv.net

²Laboratorio de Diagnóstico de Tuberculosis, Coordinación del Programa Regional de Control de Tuberculosis.

³Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

RESUMEN

La reemergencia de la tuberculosis como problema de salud pública a nivel mundial, hace imperativo el diseño de estrategias de diagnóstico rápido, sensible y específico para detectar tempranamente el patógeno. El objetivo de este trabajo fue evaluar un ensayo de PCR duplex para identificar micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (TB) y no tuberculosis (NTB). En una única reacción de amplificación se incluyeron dos pares de oligonucleótidos y se estandarizaron sus temperaturas de alineamiento. Para detectar cualquier micobacteria (TB y NTB), se utilizó un par de oligonucleótidos dirigido a la secuencia conservada del gen 16S rRNA. Para identificar micobacterias del complejo TB, se utilizó otro par de oligonucleótidos dirigido a la secuencia del marco de lectura abierta identificado como Rv0577 en el genoma de la cepa de referencia H37Rv. Para validar el ensayo, se analizaron 50 aislados clínicos de micobacterias, incluyendo micobacterias del complejo TB y NTB. En todas las especies de micobacterias ensayadas con oligonucleótidos de 16S rRNA, se observó un amplicón esperado de 543 pb, confirmando que el par de oligonucleótidos utilizados tiene carácter género-específico. La amplificación con oligonucleótidos de Rv0577, rindió un producto de PCR de 786 pb solo en *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG, las cepas del complejo TB analizadas en este estudio, el cual estaba ausente en micobacterias NTB. Dada la especificidad del par de oligonucleótidos utilizados, este ensayo de PCR duplex puede contri-

buir al diagnóstico de micobacteriosis y ser utilizado para identificar micobacterias del complejo tuberculosis y no tuberculosis en muestras clínicas humanas y de animales.

Palabras clave: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, PCR duplex, micobacterias, 16S rRNA, Rv0577

ABSTRACT

The recent resurgence of tuberculosis at world wide level demands the design of rapid, sensitive and specific diagnostic strategies for early detection of pathogen. It was evaluated a duplex PCR assay for the detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex (TB) and nontuberculous mycobacteria (NTB). In a single amplification reaction, two primer sets were included and their annealing temperatures were standardized. In order to detect any mycobacteria (TB and NTB), a set of primers directed to the conserved region of the 16S rRNA gene were used. In order to identify mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex, another primers were designed from the open reading frame Rv0577 sequence from the genome *M. tuberculosis* reference strain H37Rv. To validate the test, 50 clinical isolates of mycobacteria were analyzed, including mycobacteria of the TB complex and NTB mycobacteria. In all the species of mycobacteria tested with oligonucleótidos of 16S rRNA, a PCR product of 543 pb was observed, confirming that the primers set used were specific-genus. The reaction with Rv0577 primers set used specifically and consistently amplified an additional PCR product of 786 pb in *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. bovis* BCG, the strains of the TB complex analyzed

in this study, whereas none of the NTB strain showed a PCR fragment. Given the sensitivity and specificity of the primer sets used, this duplex PCR assay can contribute to the diagnosis of micobacteriosis and may be applied to identify mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in clinical samples from humans and animals.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* complex, duplex PCR, mycobacteria, 16S rRNA, Rv0577.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis sigue representado una de las enfermedades infecciosas que cobra mayor número de víctimas a nivel mundial. A pesar de numerosos esfuerzos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y organismos oficiales de salud de diversos países, los programas de control de tuberculosis y la implementación de la estrategia DOTS (tratamiento directamente observado de corta duración), no han logrado disminuir la incidencia de la infección, de hecho, en el último reporte de la OMS, se refleja que la cifra de nuevos casos de tuberculosis se incrementó a 8,8 millones para el 2002, de los cuales 3,9 millones fueron bacilíferos [32] y se ha estimado que un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* [7, 9]. Si esta tendencia se mantiene, se proyecta que para el periodo comprendido entre los años 2002 y 2020, se podrían alcanzar cifras de 1000 millones de nuevos casos de personas infectadas con *M. tuberculosis*, de los cuales 150 millones desarrollarían la enfermedad y 36 millones morirían por esta causa [32]. Al debilitamiento de los programas de control, se suma el incremento en el número de personas infectadas con *M. tuberculosis* multirresistente a drogas y la pandemia de HIV-SIDA [9, 10, 32].

Cerca del 90% de todos los enfermos aparecen en los países tropicales en vías de desarrollo, donde América Latina contribuye con un poco más del 6% [22]. Particularmente en el país, la tuberculosis se ubica entre las primeras 20 causas de muerte [19], con una incidencia estimada entre 25 y 49 casos/100.000 habitantes [22].

El resurgimiento de la tuberculosis con características epidémicas y la aparición de cepas multirresistentes, hace imperativo el diseño de estrategias de diagnóstico y estudios de susceptibilidad a drogas que permita obtener resultados inmediatos, a fin de adoptar un esquema terapéutico acertado para lograr la cura del paciente y disminuir la transmisión del patógeno y propagación de cepas multirresistentes a drogas [23, 33, 34].

Las herramientas de diagnóstico de tuberculosis, además de las evidencias clínicas, incluyen radiografía de tórax, la cual es sensible pero no específica; baciloscopia o análisis microscópico del esputo para buscar bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) que es una técnica sencilla y específica, pero de baja sensibilidad y por último se cuenta con la posibilidad del cultivo, el cual es muy sensible, pero se requiere alrededor

de 3 a 6 semanas para visualizar colonias de *M. tuberculosis*, debido al lento crecimiento de este organismo. *M. tuberculosis* tiene un tiempo de generación estimado en 18 a 24 horas, haciéndose las colonias visibles a las 3 a 4 semanas de incubación y en casos extremos, el aislamiento primario puede extenderse hasta 8 semanas.

En los últimos años se han diseñado algunos ensayos de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basados en diferencias genotípicas entre especies micobacterianas, algunos de los cuales se encuentran comercialmente disponibles, tales como AMPLICOR *M. tuberculosis* Assay (Roche), Amplified *M. tuberculosis* Direct (AMTD2 de Gene Probe) LCx (Abbott) INNO-LipA (Innogenetics) y otros [14, 24], sin embargo, estos ensayos son estandarizados bajo condiciones específicas de los laboratorios donde fueron desarrollados, con protocolos de extracción de ácidos nucleicos y condiciones de amplificación que muchas veces no son reproducibles bajo las condiciones propias de los laboratorios locales. A esto se suma el elevado costo de los "Kits" y reactivos utilizados.

A través de este trabajo se diseñó y evaluó una prueba genotípica para la identificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* y no tuberculosis para contribuir al diagnóstico temprano de infecciones causadas por micobacterias. A tal fin, se seleccionaron secuencias de ADN del genoma de *M. tuberculosis* utilizadas previamente [13] y disponibles en la base de datos [5] y se evaluó la especificidad de dos pares de oligonucleótidos, para ser incorporados en un formato de PCR duplex mediante técnicas de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El patrón de amplificación, utilizando este par de oligonucleótidos en una única reacción de PCR, permitió discriminar entre cepas del complejo *M. tuberculosis* y no tuberculosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Se analizaron un total de 50 cepas de micobacterias, incluyendo cepas de referencia y aislados clínicos bien caracterizados desde el punto de vista fenotípico y características bioquímicas. 33 cepas del complejo tuberculosis: *M. tuberculosis* (25), *M. bovis* (4) y *M. bovis* BCG (4) y 17 cepas del complejo no tuberculosis *M. smegmatis* (3) [26], *M. flavescens* (3), *M. gordonae* (3), *M. kansasii*, (3), *M. szulgai* (2) y *M. scrofulaceum* (3). En la TABLA I se describen las cepas utilizadas y su procedencia. Los aislados clínicos corresponden a cepas provenientes de pacientes con clínica de tuberculosis, cuyas muestras de esputo fueron referidas al laboratorio de Diagnóstico de Tuberculosis con sede en el Hospital Universitario de Maracaibo, el cual está adscrito al Programa Regional de Control de Tuberculosis.

Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Para la amplificación de secuencias del genoma de cualquier especie de micobacterias (oligonucleótidos género-

específicos) se utilizó un par de oligonucleótidos dirigido a la secuencia conservada del gen 16S rRNA y para diferenciar entre cepas del complejo *M. tuberculosis* y no tuberculosis se utilizó la secuencia de la región codificante del marco de lectura abierta identificado como Rv0577 [13] (TABLA II). La identidad de estos oligonucleótidos fue confirmada por alineamiento de sus secuencias utilizando el programa Blast [2, 3] y las Bases de Datos EMBL del Centro Nacional de Información Biotecnológica de EEUU (NCBI) y del Centro de Sanger, donde están depositadas las secuencias obtenidas de los Proyectos de Secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Los genes blanco de amplificación, su secuencia y la localización de los oligonucleótidos pueden ser encontrados en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Acceso: NC_000962) [5]. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Maxim Biotech, INC.

Extracción y purificación de ADN genómico de colonias de micobacterias

La extracción de ADN de colonias micobacterianas se llevó a cabo utilizando un procedimiento básico MINIPREP [4], con algunas modificaciones. Se tomó una asada de una colonia micobacteriana, se inactivó con calor a 90°C por 1 hora y se sometió a tratamiento con etanol para provocar muerte celular [1]. Se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos y la colonia se resuspendió en 500 µL de Buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8). Se agregó 100 µL de lisozima 10mg/ml y se incubó a 37°C por 1 hora. Se agregó 30 µL de SDS 10% y 10 µL de proteinasa K 10 mg/ml, se incubó a 65°C por 1 hora. Se hizo una extracción con 500 µL de cloroformo, se aplicó vortex y se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se precipitó con 500 µL de isopropanol. El sedimento se resuspendió en

TABLA I
CEPAS MICOBACTERIANAS ANALIZADAS. STRAINS ANALYZED

Cepa	Descripción	Procedencia de la cepa
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 6	Cepa silvestre Ms IP930587	CVCM 563
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	Cepa mutante derivada de mc ² 6	IVIC-LGM
<i>M. bovis</i>	Cepa Pasteur	IVIC-LGM
<i>M. bovis</i> BCG	Cepa Pasteur de <i>M. bovis</i> atenuada en virulencia	ATCC 35734
<i>Mycobacterium flavescens</i>	Cepa silvestre, Fla 0, IP93091	CVCM 565
<i>Mycobacterium goodii</i>	Cepa silvestre, Gor 0, IP930835	CVCM 581
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Cepa silvestre, Kans 0, IP930908	CVCM 564
<i>M. tuberculosis</i>	Aislado clínico	CPRCT Lab.TB-SAHUM
<i>M. bovis</i>	Aislado clínico	CPRCT Lab.TB-SAHUM
<i>M. bovis</i> BCG	Aislado clínico	CPRCT Lab.TB-SAHUM
<i>M. goodii</i>	Aislado clínico	CPRCT Lab.TB-SAHUM
<i>M. kansasii</i>	Aislado clínico	CPRCT Lab.TB-SAHUM
<i>M. flavescens</i>	Aislado clínico	CPRCT Lab.TB-SAHUM
<i>M. szulgai</i>	Aislado clínico	CPRCT Lab.TB-SAHUM
<i>M. scrofulaceum</i>	Aislado clínico	CPRCT Lab.TB-SAHUM

CVCM: Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos. Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela.
IVIC-LGM: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Laboratorio de Genética Molecular.
ATCC: American Type Culture Collection.
CPRCT: Coordinación del Programa Regional de Control de Tuberculosis, Laboratorio de tuberculosis. SAHUM: Servicio Autónomo Hospital universitario de Maracaibo.

TABLA II
OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS. PRIMERS USED

Nombre del oligoNT	Secuencia de nucleótidos	Descripción Acceso N°. NC-000962 (Ref 14)	Tamaño del producto de PCR
16SRNAF	5' ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTC 3'	Gen DNA ribosomal 16S	543 pb
16SRNAR	5' TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA 3'	Género específico	
Rv0577F	5' ATGCCCAAGAGAAGCGAATACAGGCAA 3'	Marco de lectura de función desconocida Rv3912 Complejo tuberculosis	786 pb
Rv0577R	5' CTATTGCTGCGGTGCGGGCTTCAA 3'		

30 µL de buffer TE. Se utilizó 3 µL de la muestra para ensayos de amplificación.

Alternativamente, para las mismas muestras se utilizó un procedimiento de "boiling" [1], que consistió en colocar la colonia en 50 µL de buffer TEN (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8) y colocar los tubos en ebullición por 10 minutos, en baño maría en bloque seco sin ningún procesamiento posterior, descrito para reducir el tiempo de extracción y minimizar el riesgo de contaminación cruzada. Se utilizó 5 µL de la suspensión como templado para reacciones de PCR.

Ensayos de amplificación por PCR

Para las reacciones de amplificación individuales, tanto para oligonucleótidos 16SRNA, como Rv0577, se preparó la mezcla de reacción para un volumen final de 50 µL, consistiendo en 5 µL de buffer taq DNA polimerasa (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µL de cada oligonucleótido 20 µM (20 pmol cada oligonucleótido). Se utilizó 0,5 µL de Taq DNA polimerasa 1U/µL para cada reacción (PROMEGA). Se ensayaron temperaturas de alineamiento en el rango de 58°C hasta 62°C para cada par de oligonucleótidos.

Posteriormente se ensayaron condiciones para amplificación simultánea en una única reacción con ambos pares de oligonucleótidos y se seleccionó 58°C como temperatura de alineamiento óptima el ensayo de PCR duplex. El programa de amplificación consistió en 3 minutos a 94°C y 35 ciclos de amplificación de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C, 45 segundos a 72°C y un paso final de amplificación a 72°C por 10 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en termociclador MJ Research PTC-100. Como control negativo y de

riesgos de contaminación cruzada durante los procedimientos de extracción y amplificación, se procesaron en paralelo colonias de *E. coli*.

Los amplicones se separaron en geles de agarosa en cámaras horizontales (BIORAD). La concentración de agarosa utilizada fue de 0,8% a 1%. Como Buffer de corrida se utilizó TBE (Tris-Borato 89mM, EDTA 2mM pH 8) o TAE (Tris-Acetato 40mM, EDTA 2mM pH 8). La corrida se llevó a cabo a 40v/cm por 1-2 horas. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador ultravioleta y fotografiados con sistema de fotodocumentación DigiDoc UVP. Se utilizó marcador de peso molecular PCR markers de PROMEGA (1000 pb, 750 pb, 500 pb, 300 pb, 150 pb y 50 pb)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación con oligonucleótidos dirigidos a la secuencia del gen rDNA16S

En la FIG. 1 se observan los resultados de amplificación utilizando oligonucleótidos 16SRNAF y 16SRNAR, dirigidos a la secuencia conservada del gen ribosomal 16S rRNA de micobacterias. En todas las especies de micobacterias ensayadas se observó el producto esperado de 543 pb, confirmando que el par de oligonucleótidos utilizados tiene carácter género-específico [13] y pueden ser utilizados para el diagnóstico de micobacteriosis, de hecho, la secuencia de los genes ribosomales se ha utilizado ampliamente en análisis filogenético y la identificación de micobacterias [13, 25, 30]. Utilizando este par de oligonucleótidos se logró amplificar el producto a todas las temperaturas ensayadas en el rango de 58°C a 60°C, sin pérdida de especificidad.

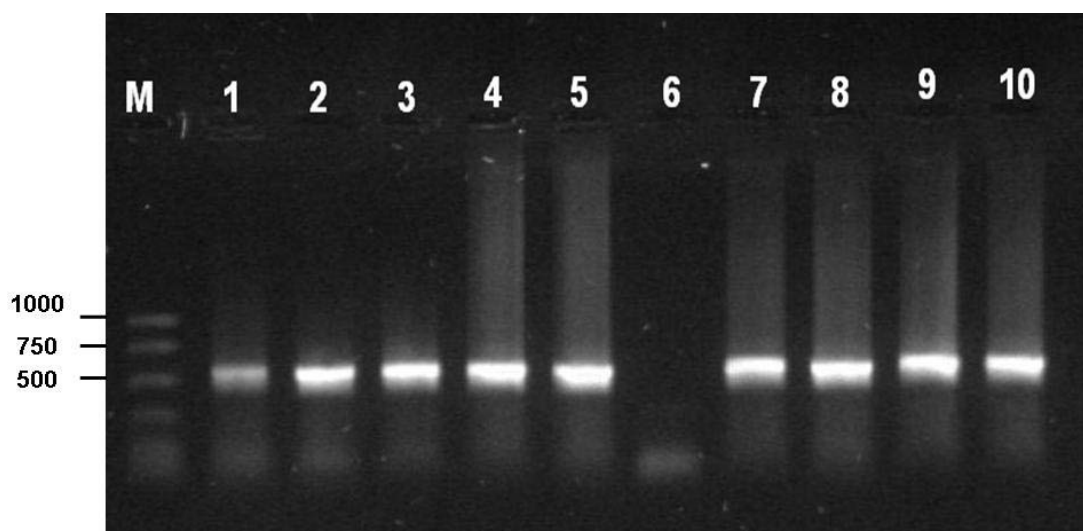


FIGURA 1. AMPLIFICACIÓN POR PCR CON OLIGONUCLEÓTIDOS DIRIGIDOS A LA SECUENCIA 16S rRNA DE MICOBACTERIAS. SE ANALIZARON 33 CEPAS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis* Y 17 CEPAS DEL COMPLEJO NO TUBERCULOSIS. EL PRODUCTO AMPLIFICADO ES DE 543 PB. 1: *M. tuberculosis*, 2: *M. bovis*, 3: *M. bovis* BCG, 4: *M. smegmatis*, 5: *M. flavescens*, 6: CONTROL NEGATIVO (*E. coli*), 7: *M. gordonae*, 8: *M. kansasii*, 9: *M. szulgai*, 10: *M. scrofulaceum*, M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR, INDICANDO EL PESO MOLECULAR DE LAS TRES PRIMERAS BANDAS.

Amplificación con oligonucleótidos dirigidos a la secuencia del marco de lectura abierta Rv0577

La estandarización de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos del marco de lectura Rv0577 resultó más difícil. La temperatura teórica de "melting" para estas secuencias es de 62,4°C y 63,4°C para Rv0577F y Rv0577R y previamente se ha reportado exitosa amplificación utilizando 60°C como temperatura de alineamiento [13], sin embargo bajo las condiciones del presente ensayo, no se obtuvo amplificación a temperaturas por encima de 58°C y se generaron múltiples bandas inespecíficas a temperaturas $\leq 58^\circ\text{C}$, limitación que fue superada por la adición de 3 μL de DMSO. La amplificación con este par de oligonucleótidos, rindió el producto esperado de 786 pb solo en *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG, las cepas del complejo tuberculosis disponibles para este estudio, pero no se observó amplificación para las otras especies de micobacterias del complejo no tuberculosis (FIG. 2). La persistencia de una banda difusa inespecífica de aproximadamente 100 pb, inclusive en el control negativo, no altera la interpretación de los resultados.

El par de oligonucleótidos del marco de lectura abierta Rv0577 permitió discriminar claramente entre cepas del complejo *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosis, resultados que fueron reproducibles utilizando tanto cepas de referencia como aislados clínicos, de manera que este par de oligonucleótidos se incorporó en un formato de PCR duplex a fin de contribuir al diseño de una estrategia de diagnóstico rápido que contribuya a un mejor manejo del paciente infectado [6, 10, 18, 27, 35]. El complejo *M. tuberculosis* incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* (subtipos I y II), *M. microti*, *M. cannetti* [20] y la diferenciación de este grupo, de otras micobacterias no tuberculosis, tiene importantes implicaciones para el tratamiento del paciente y para obtener información epidemiológica.

PCR duplex con ambos pares de oligonucleótidos: rRNA16S y Rv0577

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos han facilitado el desarrollo de estrategias de diagnóstico para la identificación de micobacterias [16, 17, 28, 29]. Sin embargo, algunos de estos ensayos, varios de los cuales han sido comercializados, no siempre rinden resultados reproducibles [24, 11] y son muy costosos. Por ejemplo, uno de los ensayos más utilizados se basa en el elemento de inserción IS6110, pero se han reportado falsos negativos [12, 15] y falsos positivos [29]. Así mismo, se ha demostrado que la secuencia del gen *mtp40*, también utilizada en ensayos de identificación, está ausente en algunas cepas de *M. tuberculosis* [31]. Estas limitaciones mantienen el interés en diseñar y aplicar técnicas diagnósticas adaptadas a las condiciones de los laboratorios locales, por lo cual en este trabajo, se estandarizó un ensayo de identificación basado en PCR.

Para estandarizar la reacción de amplificación simultánea con los dos pares de oligonucleótidos, se utilizó la temperatura óptima de alineamiento de la secuencia de Rv0577, factor limitante, debido a que los oligonucleótidos 16S rRNA amplificaron bien a todas las temperaturas. El ensayo de PCR duplex se evaluó utilizando cepas de referencia y aislados clínicos. Mientras el fragmento de 543 pb se observó en todas las cepas de micobacterias, incluyendo las del complejo tuberculosis y no tuberculosis, el amplicón de 786 pb sólo se detectó en *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG, las cepas del complejo tuberculosis incluidas en este estudio y no en cepas del complejo NTB (FIG. 3), demostrando que el ensayo de PCR es útil para identificar micobacterias y diferenciar entre cepas del complejo *M. tuberculosis* y no tuberculosis. En el proceso de estandarización de condiciones de amplificación con ambos pares de oligonucleótidos se evidenciaron múltiples bandas inespecíficas de bajo peso molecular, limitación

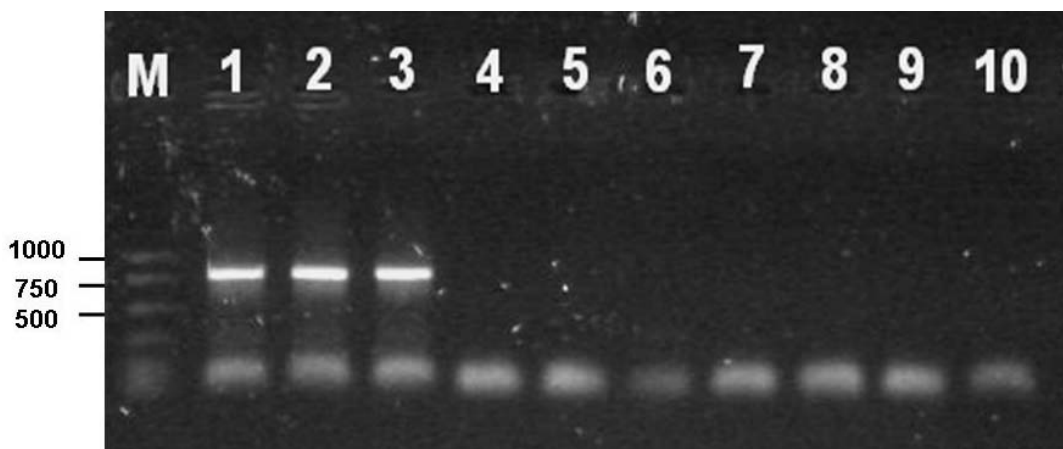


FIGURA 2. AMPLIFICACIÓN POR PCR CON OLIGONUCLEÓTIDOS DIRIGIDOS A LA SECUENCIA RV0577 ESPECÍFICO DE MICOBACTERIAS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis*. SE ANALIZARON 33 CEPAS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis* Y 17 CEPAS DEL COMPLEJO NO TUBERCULOSIS. EL PRODUCTO AMPLIFICADO ES DE 786 PB.

1: *M. tuberculosis*, 2: *M. bovis*, 3: *M. bovis* BCG, 4: *M. smegmatis*, 5: *M. flavescens*, 6: CONTROL NEGATIVO (*E. coli*), 7: *M. gordonae*, 8: *M. kansasii*, 9: *M. szulgai*, 10: *M. scrofulaceum*, M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR, SE INDICA PM DE LAS TRES PRIMERAS BANDAS.

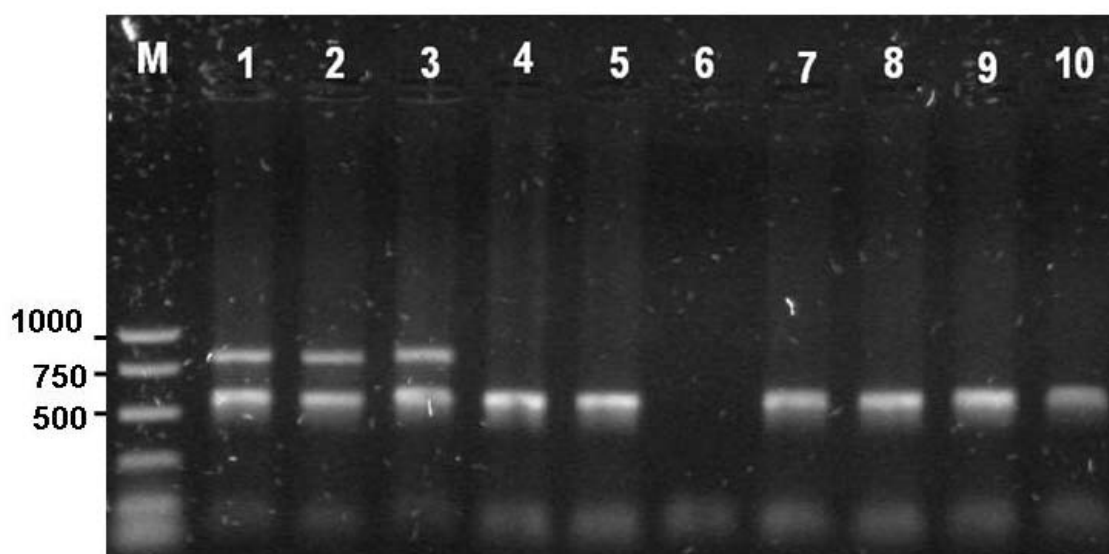


FIGURA 3. PCR DUPLEX CON OLIGONUCLEÓTIDOS DIRIGIDOS A LA SECUENCIA 16S rRNA Y RV0577. SE ANALIZARON 33 CEPAS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis* Y 17 CEPAS DEL COMPLEJO NO TUBERCULOSIS. SE OBSERVA LA AMPLIFICACIÓN DIFERENCIAL DEL FRAGMENTO DE 786 PB SÓLO EN EL COMPLEJO *M. tuberculosis*. 1: *M. tuberculosis*, 2: *M. bovis*, 3: *M. bovis* BCG, 4: *M. smegmatis*, 5: *M. flavescens*, 6: CONTROL NEGATIVO (*E. coli*), 7: *M. gordonae*, 8: *M. kansasii*, 9: *M. szulgai*, 10: *M. scrofulaceum*, M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR, SE INDICA PM DE LAS TRES PRIMERAS BANDAS.

que fue superada por la adición de 3 µL de dimetilsulfóxido a la mezcla de reacción de PCR.

La amplificación diferencial se ejecutó en una única reacción de amplificación con un programa de ciclos de temperatura de 1,5 horas de duración y un tiempo de procesamiento de la muestra de 4 horas, para un total de 5,5 horas. La diferenciación de cepas se correlacionó 100% con la identidad de las cepas de referencia y aislados clínicos, establecida por cultivo y caracterización bioquímica, no observándose falsos positivos ni falsos negativos.

Aunque en el presente trabajo se analizaron cepas del complejo *M. tuberculosis* y no tuberculosis aisladas con mayor frecuencia en el país, lamentablemente, no se evaluó la especificidad del ensayo en micobacterias del complejo *avium-intracellulare*, debido a que no se disponía de cepas de referencia o de aislados clínicos bien caracterizados, por lo que se está a la espera de cepas de referencia para su evaluación.

Actualmente se está aplicando este ensayo de PCR duplex directamente sobre sedimentos de esputo, a fin de integrar los análisis moleculares con resultados del laboratorio de diagnóstico bacteriológico. Así mismo, se está evaluando un panel de oligonucleótidos para hacer identificación a nivel de especies y contribuir a acortar el período de detección y diferenciación de cepas de micobacterias, lo cual tiene un gran impacto para la elección de un tratamiento adecuado y oportuno para el paciente.

Reacciones de PCR utilizando método de extracción simplificado de ADN ("boiling")

En relación a los métodos de extracción, las muestras procesadas por el método de "boiling" no rindieron resultados reproducibles, no observando amplificación en el 64% de las muestras procesadas por esta técnica. Aunque se ha recomendado este método para minimizar la manipulación de la muestra, evitar contaminación cruzada y por supuesto, simplificar el procedimiento de extracción [1], la cantidad de ADN liberado de la célula parece ser insuficiente como templado, comparado con los métodos de lisis enzimática, al menos bajo las condiciones utilizadas en este trabajo, de manera que se descartó esta alternativa de extracción de ADN genómico.

CONCLUSIONES

A través de este estudio se logró la estandarización y optimización de un ensayo de PCR duplex para la identificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* y no tuberculosis bajo las condiciones propias del laboratorio. Este ensayo podría ser utilizado para el diagnóstico de micobacteriosis en muestras clínicas de humanos y animales y contribuir a alcanzar un nivel de independencia tecnológica, debido a que obvia la necesidad de recurrir a la adquisición de "kits" diagnósticos de países desarrollados, los cuales además de costosos, no brindan, al menos hasta el presente, resultados reproducibles.

Los reactivos utilizados en este estudio se pueden obtener comercialmente y su incorporación en protocolos de extracción de ADN estandarizados en el laboratorio brinda resultados más reproducibles que los kits comerciales disponibles para extracción de ADN. Además, permite introducir modificaciones relacionadas con concentraciones de reactivos, tiempos de incubación hasta lograr la optimización.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia por el cofinanciamiento de esta investigación (Programa N° CC-0241-02). A la Oficina de Planificación del Sector Universitario (OPSU) por su contribución en el fortalecimiento y equipamiento del laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez" de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AFGHANI, B.; STUTMAN, H.R. Polimerase chain reaction for diagnosis of *M. tuberculosis*: comparison of simple boiling and a conventional methods for DNA extraction. **Biochem. Mol. Med.** 57: 14-18. 1996.
- [2] ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215: 403-410. 1990.
- [3] ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". **Nucleic. Acids. Res.** 25: 3389-3402. 1997.
- [4] AUSUBEL, F. M. Short Protocols in Molecular Biology. Chapter 2. 2nd Edition. John Wiley Sons, Inc. New York, USA, 680 pp. 1992.
- [5] COLE, S.T.; BROSC, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGHS, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARREL, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature** 393: 537-544. 1998.
- [6] CROFTON, J.; CHAULET, P.; MAHER, D. Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis. WHO Report 1997. WHO/TB/97.220. Geneva, Switzerland. Pp 27-34 pp. 1997.
- [7] DOLIN, P.J.; RAVIGLIONE, M.C.; KOCHI A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. **Bull W.H.O.** 72:213-220. 1994.
- [8] DROBNIESKI, F.A.; PABLOS-MÉNDEZ, A.; RAVIGLIONE, M.C. Epidemiology of tuberculosis in world. **Semin. Respir. Crit. Care. Med.** 18: 419-429. 1997.
- [9] DYE, C.; SCHEELE, S.; DOLIN, P.; PATHANIA, V.; RAVIGLIONE, M.C. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. **JAMA** 282: 677-686. 1999.
- [10] DYE, C.; WILLIAMS B.G.; ESPINAL, M.A.; RAVIGLIONE, M.C. Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. **Science** 15: 295: 2042-2046. 2002.
- [11] EING, B.R.; BECKER, A.; SOHNS, A.; RINGELMANN, R. Comparison of Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in-house PCR and culture for detection of *M. tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** 36: 2023-2029. 1998.
- [12] EL-DAWI, T.G.; SAEDEL, N.S.; HAMID, M.E. Evaluation of a PCR-amplified IS6110 insertion element in the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in comparison to microscopic methods in Sudan. **Saudi Med. J.** 25:1644-1647. 2004.
- [13] HUARD, R.C.; DE OLIVEIRA, L.C.; BUTLER, R.; VAN SOOLINGEN, D.; HO, J.L. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **J. Clin. Microbiol.** 41: 1637-1650. 2003.
- [14] KATOCH, V.M. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. **Indian J. Med. Res.** 120: 418-428. 2003.
- [15] KENT, L.; MCHUGH, T.D.; BILLINGTON, O.; DALE, J.W.; GILLESPIE, S.H. Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp. **J. Clin. Microbiol.** 33: 2290-2293. 1995.
- [16] KLEMEN, H.; BOGIATZIS, A.; GHALIBAFIAN, M.; POPPER, H. Multiplex polymerase chain reaction for rapid detection of atypical mycobacteria and *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Diagn. Mol. Pathol.** 7: 310-316. 1998.
- [17] LEMAITRE, N.; ARMAND, S.; VACHEE, A.; CAPILLIEZ, O.; DUMOULIN, C.; COURCOL, R.J. Comparison of the real-time PCR method and the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and nonpulmonary specimens. **J. Clin. Microbiol.** 42:4307-4309. 2004.

- [18] LIBANORE, M.; BIOCCHI, R.; GUINELLI, F. Mixed bronchial infection due to *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* in AIDS patient. **Infection**. 20: 298-299. 1992.
- [19] MINISTERIO DE SALUD Y DESARROLLO SOCIAL. Anuario de Mortalidad 2003. República Bolivariana de Venezuela. 9-13 pp. 2004.
- [20] MOSTOWY, S.; COUSINS, D.; BRINKMAN, J.; ARANAZ, A.; BEHR, M.A. Genomic deletions suggests a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J. Infect. Dis.** 186: 74-80. 2002.
- [21] MUSTAFA, A.S.; ABAL, A.T.; CHUG, T.D. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and non tuberculous mycobacteria by multiplex polymerase chain reactions. **East Mediterr. Health J.** 5: 61-70. 1999.
- [22] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. OFICINA REGIONAL DE LA OMS. Situación epidemiológica de la tuberculosis en las Américas. Hoja Informativa 2004, Américas. 13-19 pp. 2004.
- [23] PABLOS-MENDEZ, A.; RAVIGLIONE, M.C.; LASZLO, A.; BINKIN, N.; RIEDER, H.L.; BUSTREO, F.; COHN, D.L.; LAMBREGTS-VAN WEEZENBEEK, C.S.; KIM, S.J.; CHAULET, P.; NUNN, P. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. **N. Engl. J. Med.** 338: 1641-1649. 1998.
- [24] PIERSIMONI, C.; SCARPARO, C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.** 41: 5355-5365. 2003.
- [25] ROTH, A.; FISHER, M.; HAMID, M.E.; MICHALKE, S.; LUDWING, W.; MAUCH, H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16-23s rRNA gene internal transcribed spacer sequences. **J. Clin. Microbiol.** 36: 139-147. 1998.
- [26] SNAPPER, S.B.; MELTON, R.E.; MUSTAPHA, S.; KIESER, T.; JACOBS, W.R. Isolation and Characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. **Mol. Microbiol.** 4: 1911-1919. 1990.
- [27] STERLING, T.R., LEHMANN, H.P., FRIEDEN, T.R. Impact of DOTS compared with DOTS-plus on multidrug resistant tuberculosis and tuberculosis deaths: decision analysis. **British. Med. J.** 26: 574-574. 2003.
- [28] SUFFYS, P.; PALOMINO, J.C.; CARDOSO, S.; ESPITIA, C.; CATALDI, A.; ALITO, A. Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **Int. J. Lung Dis.** 4: 179-183. 2000.
- [29] TORREA, G.; VAN DE PERRE, P.; OUEDRAOGO, M.; ZOUGBA, A.; SAWADO, A.; DINGTOUMDA, B.; DIALLO, B.; DEFER, M.C.; SOMBIE, I.; ZANETTI, S.; SECHI, L.A. PCR-based detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in urine of HIV-infected and uninfected pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients in Burkina Faso. **J. Med. Microbiol.** 54:39-44. 2005.
- [30] TURENNE, C.Y.; TSCHETTER, L.; WOLFE, J.; KABANI, A. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. **J. Clin. Microbiol.** 39: 3637-3648. 2001.
- [31] WEIL, A.; PLIKAYTIS, B.B.; BUTLER, W.R.; WODLEY, C.I.; SHINNICK, T.M. The *mtp40* gene is not present in all strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** 34: 2309-2311. 1996.
- [32] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control –surveillance, planning, financing. WHO Report 2004. WHO/HTM/TB/2004.331. Geneva, Switzerland. (on-line): http://www.who.int/tb/publications/global_report/2004. Acceso Febrero 2005.
- [33] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for establishing DOTS-Plus Pilot Project 2000. WHO Report 2000. WHO/CDS/TB/2000.279. Geneva, Switzerland. 21-22 pp. 2000.
- [34] WORLD HEALTH ORGANIZATION/IUATLD. Global project on Anti-tuberculous Drug Resistance Surveillance. Anti-tuberculous drug resistance in the world. WHO Report 1997. WHO/TB/97.229. Geneva, Switzerland. 94-95 pp. 1997.
- [35] WORLD HEALTH ORGANIZATION/IUATLD. Global project on Anti-tuberculous Drug Resistance Surveillance. Anti-tuberculous drug resistance in the world. WHO/TB/97.229. Geneva, Switzerland. 33-35 pp. 1997.