

Detección de *Mycobacterium tuberculosis* Basada en una Prueba de ADN

RENDÓN-AGUILAR H¹, RÍOS-TOSTADO JJ¹, CAZARES-SALAZAR S¹, AMARILLAS-BUENO LA²,
MOLINA-BENÍTEZ CE³, OCHOA- RAMÍREZ LA¹, VELARDE-FÉLIX JS^{1,3}

RESUMEN

Objetivo. Describir el desarrollo de una técnica molecular no comercial para la detección de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) en diferentes tipos de muestras biológicas. **Material y métodos.** Se recibieron 137 muestras biológicas de diferentes hospitales de Culiacán, con sospecha de alguna forma clínica de tuberculosis durante el periodo de enero a diciembre de 2007, en el Centro de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán "Bernardo J. Gastélum". Para la detección precisa del bacilo tuberculoso, el ADN obtenido de las muestras se sometió a amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de la secuencia genética IS6110, específica de *Mycobacterium tuberculosis*, cuyo producto final se observó en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. De los individuos incluidos en el estudio se consideró edad, género e institución de salud emisora. **Resultados.** Un total de 36 muestras resultaron positivas, 22 del tipo pulmonar y 14 extrapulmonar, correspondientes a 34 individuos, de éstos 17 fueron mujeres y 17 varones predominando una edad promedio de 44.71 años y un rango de 6 a 80 años. En cuanto a la institución que remite 22 fueron del Hospital General de Culiacán, 4 del Hospital Civil, 3 IMSS y 7 de hospitales privados. **Conclusión:** La aplicación de la PCR es de gran apoyo en el diagnóstico de tuberculosis porque permite la identificación oportuna y precisa de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas.

Palabras claves: Tuberculosis, identificación molecular.

ABSTRACT

Objective. To describe the development of a non commercial molecular technique for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) DNA in different kinds of biological samples. **Methods.** We received 137 biological samples from different hospitals from Culiacán, Sinaloa with suspicion of any clinical form of tuberculosis from January to December 2007, at the Center for Genomic Medicine of Culiacán General Hospital. For the precise detection of tuberculosis bacillus, the IS6110 genetic sequence, specific of Mtb, was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) from the template DNA obtained from the samples. The product was observed in silver nitrate stained polyacrilamide gels. We considered age, gender and submitting institution from the individuals included in the study. **Results.** A total of 36 samples were positive for the test, 22 were pulmonary and 14 extrapulmonary, corresponding to 34 individuals. From these, 17 were male and 17 female with an average age of 44.71 years and a range from 6 to 80 years. About the submitting institution 22 samples were from Culiacan General Hospital, 4 from Civil Hospital, 3 from Social Security Institute and 7 from private practice hospitals. **Conclusion.** The application of PCR offers great support in the diagnosis of tuberculosis since it allows the timely and precise identification of Mtb in clinical samples.

Keywords: Tuberculosis, molecular identification.

¹ Centro de Medicina Genómica, Hospital General de Culiacán, Bernardo J. Gastélum", ² Facultad de Ciencias Químico Biológicas y ³ Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Enviar correspondencia, observaciones y sugerencias al Dr. en C. Jesús Salvador Velarde Félix, correo electrónico: jsvelfe@hotmail.com, Centro de Medicina Genómica, Hospital General de Culiacán. Aldama S/N, esquina con Edo. de Nayarit, Col. Rosales, Culiacán, Sinaloa, teléfono (667)716 85 60 y 65 extensión 196 CP. 80230.

Artículo recibido en enero del 2008

Artículo aceptado para publicación 4 de julio del 2008.

Este artículo podrá ser consultado en www.hgculiacan.com

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa ocasionada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y, por la morbi-mortalidad que produce es considerada un problema serio de salud pública en todo el mundo.¹

Entre los factores riesgo que participan en su morbilidad destacan la pobreza, negligencia en el diagnóstico así como en el tratamiento y la pandemia de VIH/SIDA.¹ La OMS ha estimado que entre el año 2000 y el 2020, 200 millones de personas enfermarán y 35 millones fallecerán de tuberculosis si no se lleva a cabo un riguroso control.

En la actualidad la tuberculosis sigue planteando importantes problemas epidemiológicos, terapéutico y de diagnóstico. La pandemia del VIH ha traído un gran impacto en la epidemiología de la tuberculosis, la cual incrementa 40% el riesgo de conversión de infección a enfermedad y por lo tanto también incrementa la transmisión de la tuberculosis a la población general.^{2,3}

Desafortunadamente, los métodos de diagnóstico durante los últimos 30 años han mostrado pocos avances, basándose en la detección microscópica del bacilo, misma que posee especificidad y sensibilidad limitadas, aunado a la imposibilidad de poder diferenciar *Mycobacterium tuberculosis* de otras micobacterias; sin embargo puede ser aceptable en los casos de tuberculosis pulmonar debido a que los pacientes secretan gran cantidad de bacilos en expectoración. La identificación de la especie mediante el cultivo continúa siendo el estándar de oro para el diagnóstico, a pesar de la demora de tres a cuatro semanas, en el mejor de los casos.⁴⁻⁶

De tal manera que para alcanzar estrategias de control y eliminación más eficaces se requiere disponer de técnicas diagnósticas de vanguardia que sean rápidas, sensibles y específicas. Las técnicas de análisis de ácidos nucleicos son una alternativa.

Dentro de éstas últimas, destaca la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction: PCR) que permite demostrar la presencia de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* en un tiempo aproximado de 72 horas.⁷ Existen reportes a cerca de que esta técnica es especialmente útil en pacientes con infecciones no bacilíferas y cuadros atípicos asociados con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana o a la inmunosupresión por trasplante,⁸⁻¹⁴ de la cual existen versiones comerciales completamente automatizadas, pero por su alto costo, cada vez se hace más común que los hospitales dispongan de sistemas no comerciales, siendo varias las secuencias dianas utilizadas, entre ellas los elementos de inserción IS6110 e IS986,¹⁵⁻¹⁶ los genes de los antígenos de 64 y 65 kDa, entre otras.¹⁷⁻²⁰

El propósito de este trabajo es describir el desarrollo de una técnica no comercial para la detección del bacilo causante de la tuberculosis, basada en la amplificación de la

secuencia de inserción IS6110.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio descriptivo en el cual se analizaron 137 muestras biológicas durante enero a diciembre del año 2007 para la búsqueda de ADN de Mtb. Del total de las muestras, se recibieron 76 de Hospital General de Culiacán “Bernardo J. Gastélum”, 28 del Hospital Civil de Culiacán, 17 de hospitales privados, 11 de IMSS, 2 del Centro de Salud, 2 Hospital Pediátrico de Sinaloa “Rigoberto Aguilar Pico” y 1 del Hospital Militar de Mazatlán. Por el tipo de muestra 66 llegaron por sospecha de enfermedad pulmonar (34 de líquido pleural, 28 de expectoración, 3 de lavado bronquial y 1 de lavado pleural) y 71 por sospecha de enfermedad extrapulmonar (49 de orina, 9 de hisopo nasal, 5 de líquido cefalorraquídeo, 3 de líquido ascítico, 2 de secreción de ganglios, 1 de granuloma lumbar, 1 de líquido peritoneal y 1 de secreción de herida). De los individuos incluidos en el estudio se consideró edad, género e institución de salud emisora.

Procesamiento de muestras

Para concentrar y neutralizar las muestras, excepto orina se agregó un volumen igual de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 4%, se mezcló en vórtex y, posteriormente se centrifugó durante 15 min a 3,500 rpm. El sobrenadante se descartó y al precipitado se le agregó 20 ml de agua destilada estéril, mezclando en vórtex y se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 min. Se repite este paso hasta que el botón de células se observe limpio, se diluye el botón en 750 ul de solución amortiguadora TE pH 8.0 (Tris HCl 100mM y EDTA 1mM).

Por otra parte, las muestras de orina por su naturaleza deben ser descontaminadas; para ello se centrifugan durante 30 min a 4,000 rpm, descartando el sobrenadante. El botón de células fue resuspendido en 1 ml de solución de fosfatos para alcalinizar el pH, posteriormente se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm. Se decantó el sobrenadante y finalmente al botón se le agregó 750 ul de TE pH 8.0.

Extracción, purificación de ADN y amplificación de la secuencia IS6110

Para obtener el ADN de la muestra, el botón del paso anterior se somete a digestión con el detergente SDS y digestión enzimática con Proteinasa K, según el método descrito por Kesarwani y cols.²¹. Se confirmó la concentración y pureza del ADN obtenido mediante espectrofotometría. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 ul usando 100 ng de ADN genómico, 1.5 U de enzima Taq Polimerasa y 160 uM de cada iniciador, cuya secuencia es: TB1: CCTGTCCGGGACCACCCGCGGCAA y TB2: GGATCCTGCGAGCGTAGGCGTCGG, que generan un producto de 200 pares de bases (pb) de la secuencia

de inserción IS6110 del *Mycobacterium tuberculosis*,²¹ bajo las condiciones siguientes: desnaturalización inicial de 95°C durante 5 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 1 min, 60°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min. Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y teñidos con nitrato de plata.

Cada ensayo de amplificación incluyó un control positivo (ADN de la cepa referencia de *M. tuberculosis*: H37Rv) y un control negativo (mezcla de reacción y agua). Para descartar falsos negativos, se repite el ensayo añadiéndole al tubo de reacción con la muestra problema 50ng de ADN de la cepa referencia. Los especímenes se consideran positivos cuando se observe en el gel un fragmento de 200 pb y negativos al no encontrar éste (figura 3).

RESULTADOS

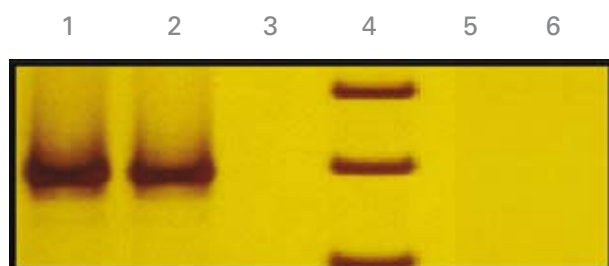


Figura 1. Gel de poliacrilamida al 6%. El carril 1 corresponde a un control positivo ADN (cepa referencia de *M. tuberculosis*: H37Rv); carril 2: individuo con resultado positivo a Mtb.; carril 3: individuo negativo; carril 4 se observan las bandas del marcador de peso molecular (de abajo hacia arriba): 100, 200 y 300 pb; los carriles 5 y 6 corresponden a los controles negativos (reacción sin ADN).

De las 137 muestras recibidas, 36 (27%) resultaron positivas a PCR, de éstas 22 (61%) fueron del tipo pulmonar; distribuidas en 13 de líquido pleural y 9 de expectoración; y 14 (39%) extrapulmonares; distribuidas en: 9 de orina, 2 de secreción de ganglio, 1 de líquido ascítico, 1 de hisopo nasal y 1 líquido cefalorraquídeo, distribuidos en 17 mujeres y 17 varones, predominando individuos de edad adulta (32/34) en comparación de la edad pediátrica (2/34); con una edad promedio de 44.7 años y rango de 6 a 80 años. En orden descendente, las instituciones que con mayor certeza diagnóstica, fueron Hospitales privados con el 41.6% (7/17), Hospital General de Culiacán con el 29% (22/76), IMSS 27% (3/11), Hospital Civil 14% (4/28) y otros.

DISCUSIÓN

Desde un punto de vista histórico, la TB se ha considerado como una enfermedad que afecta socialmente a los más desfavorecidos; el 99% de todas las muertes por tuberculosis se registra en países en vías de desarrollo.²² Para con-

trarrestar este fenómeno, es necesario que los gobiernos inviertan en nuevas tecnologías diagnósticas.

El presente estudio recoge los datos obtenidos después de realizar una búsqueda de ADN de Mtb en muestras biológicas de pacientes con sospecha de tuberculosis, enviadas al Centro de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán, durante el año 2007 por diferentes especialistas de varias instituciones públicas y privadas.

En relación a la forma clínica, encontramos que la infección pulmonar fue la más común, coincidiendo con lo reportado en diversos estudios,²³ al menos para la edad adulta. De hecho, la edad en la cual se encontró el mayor número de muestras positivas confirma que la tuberculosis tiene un predominio sobre la edad adulta, específicamente en el periodo económicamente más productivo conduciendo al mayor empobrecimiento económico-social de las comunidades.²⁴

Con base en los resultados positivos de la prueba molecular en relación con la institución emisora del paciente observamos que la institución con mayor certeza diagnóstica fue el servicio privado, seguido por el Hospital General de Culiacán, IMSS, Hospital Civil y otros. Consideramos necesario continuar analizando este fenómeno incluyendo más muestras en aras de uniformizar criterios diagnósticos, así mismo, es importante que los responsables de la salud de los pacientes adquieran más y mejores conocimientos sobre las indicaciones de las pruebas de ADN. Para el caso de la infección por Mtb son: confirmación de Mtb en muestras BAAR (+), diagnóstico rápido en muestras respiratorias BAAR negativas, diagnóstico rápido de los casos difíciles como meningitis tuberculosa, tuberculosis diseminada en pacientes con SIDA.

La baciloscopía, por ser una técnica de bajo costo y de rápida ejecución es utilizada en la búsqueda bacteriológica, en la detección de casos y control del tratamiento de la tuberculosis, pero carece de sensibilidad en muestras con carga bacilar reducida.²⁵ Al respecto en un estudio realizado en Monterrey N.L., se encontró que la sensibilidad de la baciloscopía para 698 muestras no pulmonares (pleural, urinaria y meníngea) fue del 30.2% y una especificidad del 99.8%.²⁶

Por último, la importancia de incorporar metodologías alternativas de diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar dentro de los hospitales, estriba en lo difícil que resulta llegar al diagnóstico utilizando técnicas convencionales tales como la baciloscopía.

CONCLUSIONES

Los beneficios de disponer de mejores sistemas de diagnóstico, con mayor relevancia clínica, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa serán de gran significancia en el combate, eliminación de la tuberculosis y de profundo impacto en la salud de la sociedad.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (CECyT) del Gobierno del Estado de Sinaloa por su financiamiento al proyecto titulado “Desarrollo y validación de una prueba

molecular para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*” en la convocatoria 2006, fondo con el cual fue posible brindar este servicio de manera gratuita a los individuos cuyas muestras fueron incluidas en el presente estudio.

Bibliografía

1. World Health Organization 1997. Tratamiento de la tuberculosis: directrices para los programas nacionales. Segunda edición WHO/TB/97.220.
2. Petchenik AE. "Tuberculosis control and the AIDS epidemic in developing countries". Ann Intern Med 1990;113: 89-90.
3. Braum MM, Byers RH, Heyward WL, Ciesielski A, Bloch AB, Berkelman RL, et al. "Acquired immunodeficiency syndrome and extra pulmonary tuberculosis in the United States". Arch Intern Med 1990; 150: 1913-1916.
4. American thoracic society Statement. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 2000;161: 1376-1395.
5. Morán-Moguel MC, Hernández DA, Peña-Montes de Oca PM, Gallegos-Arreola MP, Flores-Martínez SE, Montoya-Fuentes H, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polimerase chain reaction in a select in north-western Mexico. Rev Panam Salud Publica 2000; 7:389-393.
6. Lebrún L, Mathieu D, Saulnier C, Nordmann P. Limits of commercial molecular test for diagnostic of pulmonary tuberculosis. Eur Respir J 1997; 155:1497-1498.
7. Altamirano M, Kelly MT, Wong A, Bessuille ET, Black WA, Smith JA. Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30:2173-2176.
8. Heifets L. Dilemmas and realities of rapid diagnostic tests for tuberculosis. Chest 2000;118:4-5
9. Popper HH, Winter E, Höfler G. DNA of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in tuberculosis and sarcoidosis detected by polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol 1994;101:738-741.
10. Saboor SA, Johnson NM, McFadden J. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. Lancet 1992;339:1012-1015.
11. Mitarai S, Shishido H, Kurashima A, Tamura A, Nagai H. Comparative study of amplicor *Mycobacterium* PCR and conventional methods for the diagnosis of pleuritis caused by micobacterial infection. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4:871-876.
12. Gomez-Pastrana D, Torronteras R, Caro P, Anguita ML, Barrio AML, Andrés A, et al. Diagnosis of tuberculosis in children using a polymerase chain reaction. Pediatric Pulmonol 1999; 28:344-351
13. D'Amato RF, Hochstein LH, Colaninno PM, Scardamaglia M, Kim K, Mastellone AJ, et al. Application of the roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* (PCR) test to specimens other than respiratory secretions. Diagn Microbiol Infec Dis. 1996; 24:15-17.
14. Tan MF, Ng WC, Chan SH, Tan WC. Comparative usefulness of PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in different clinical specimens. J Med Microbiol 1997; 46:164-169.
15. Almeda J, Gracia A, Gonzalez J, Quintó L, Ventura PJ, Vidal R, et al. Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnostic of tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19:859-67.
16. Hermans PW, van Soolingen D, Dale JW, Schuitema AR, McAdam RA, Catty D, et al. "Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis". J Clin Microbiol 1990; 28:2051-2058.
17. Hosek J, Svastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material. veterinarni medicina, 2006; 5:180-192
18. Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD. "Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method". Mol Microbiol 1993; 10:1057-1065.
19. Moore M, McCray E, Onorato IM. TB-AIDS versus non-AIDS TB cases, United States 1993-1997 (abstract). Int J Tuberc Lung Dis 1999; 20S.
20. Tuberculosis in relation to human immunodeficiency syndrome. In: Iseman MD, editor. A clinician's guide to tuberculosis. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000;199-252.
21. Kesarwani RC, Pandey A, Misra A, Singh A. Polymerase chain reaction (PCR): Its comparison with conventional techniques for diagnosis of extra-pulmonary tubercular diseases. Indian J Surg 2004; 66:84-88.
22. Hopewell PC, Chaisson RE. In: Reichman LB, Herschfield ES (eds). Tuberculosis. A comprehensive international approach. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 2000.
23. Herrera Barrios MT, Torres Rojas M, Juárez Carvajal E, Sada Díaz E. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2005;18: 327-336.
24. Hopewell PC, Chaisson RE. In: Reichman LB, Herschfield ES (eds). Tuberculosis. A comprehensive international approach. 2nd. Ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 2000.
25. Organización Panamericana de la Salud. 1988. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis Parte I La Muestra. El Examen Microscópico.OPS. Nota Técnica Núm. 26/Rev. I.
26. Llaca-Díaz JM, Flores Aréchiga A, Martínez-Guerra MG, Cantú-Martínez PC. La baciloscopia y el cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar. Revista de Salud Pública y Nutrición 2003;4. http://respyn.uanl.mx/iv/3/articulos/tbexp_co.htm.