



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud

**Detección de *M. tuberculosis* en muestras clínicas
mediante un procedimiento simple y económico de
amplificación isotérmica de la secuencia IS6110**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA

QFB. ÁLVARO RODRÍGUEZ GARCÍA

Tijuana, B.C.

Marzo de 2018.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 219

Tijuana, B. C., a 2 de marzo de 2018

C. Álvaro Rodríguez García
Pasante de: Maestro en Ciencias de la Salud
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por los C. Dres. Marco Antonio Ramos Ibarra y Rosa Elena Mares
Alejandre

Quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente,
referido al tema Detección de *M. tuberculosis* en muestras clínicas mediante un
procedimiento simple y económico de amplificación isotérmica de la secuencia
IS6110.

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

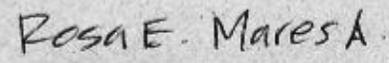
- I.- INTRODUCCION
- II.- JUSTIFICACION
- III.- OBJETIVOS
- IV.- MATERIALES Y METODOS
- V.- RESULTADOS
- VI.- DISCUSIONES
- VII.- CONCLUSIONES
- VIII.- BIBLIOGRAFIA

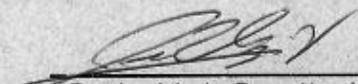
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Director de Tesis


Dra. Rosa Elena Mares Alejandre
Co-Directora de Tesis


Dr. José Luis González Vázquez
Sub-Director Secretario


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

Rodríguez García, Álvaro
Detección de *M. tuberculosis* en muestras clínicas mediante un procedimiento simple y económico de amplificación isotérmica de la secuencia IS6110
Tesis de Maestría

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- 1) el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales; incluir la siguiente cita: “Rodríguez García, Álvaro. Detección de *M. tuberculosis* en muestras clínicas mediante un procedimiento simple y económico de amplificación isotérmica de la secuencia IS6110. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Programa de Maestría en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California. Marzo de 2018.”
- 2) enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © Rodríguez García, Álvaro. Tesista.
D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.
D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.
D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.
©2018.

Tesis: Detección de *M. tuberculosis* en muestras clínicas mediante un procedimiento simple y económico de amplificación isotérmica de la secuencia IS6110

Grado: Maestría en Ciencias de la Salud, Programa de Maestría en Ciencias de la Salud

Institución: Universidad Autónoma de Baja California

Sustentante: Álvaro Rodríguez García

Fecha: Marzo de 2018

El presente trabajo de investigación fue realizado en el **Laboratorio de Biotecnología** de la **Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC**, bajo la co-dirección de los profesores **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra** y **Dra. Rosa Elena Mares Alejandre**, con financiamiento del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**: Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para Investigación en Salud (apoyo 161544), otorgado al Dr. Ramos Ibarra.

El **Manuscrito de Tesis** correspondiente fue **Revisado y Aprobado** por un **Comité Académico** conformado por los siguientes profesores:

Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Presidente)

Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Secretario)

Alexei Fedorovich Licea Navarro, Dr. (Sinodal)

Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Suplente)

Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz, M.C. (Suplente)

Dedicatoria

A mi esposa e hijos, mi fuente de energía en este infinito universo.

Agradecimientos

A mis padres por darme la vida y por llevarme donde me encuentro.

Al gran equipo de trabajo del cual me siento orgulloso de formar parte en el laboratorio de Biotecnología.

Al Dr. Marco, por creer en mí, por ser parte de mi formación y darme la oportunidad de crecer a lado de él.

Contenido

Dedicatoria.....	4
Agradecimientos	4
Contenido.....	5
Índice de figuras y tablas	7
Resumen	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Tuberculosis: la enfermedad y el agente causal	9
1.1.1. Infección y reproducción	10
1.1.2. Infección de TB latente y TB activa	11
1.1.3. Genoma	12
1.1.4. Factores de virulencia	12
1.1.5. Patogenia	14
1.1.6. Diagnóstico y tratamiento.....	15
1.2. Métodos de detección de tuberculosis	16
1.2.1. Espécimen clínico (esputo).....	16
1.2.2. Microscopía.....	17
1.2.3. Cultivo.....	19
1.2.4. Detección molecular	20
1.2.5. Pruebas inmunológicas	20
1.3. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP)	21
1.4. IS6110 como diana para la detección de <i>M. tuberculosis</i>	21
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivo general	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1. Reactivos, materiales y equipos	24
4.1.1. Reactivos	24
4.1.2. Oligonucleótidos sintéticos y ADN de referencia.....	25
4.1.3. Estuches comerciales y equipo	25
4.2. Muestras clínicas de <i>M. tuberculosis</i>	25
4.3. Digestión y descontaminación de esputo.....	26
4.4. Extracción de ADN genómico	26
4.5. Amplificaciones de Mt-IS6110 usando un termociclador	26
4.5.1. PCR típico	26
4.5.2. LAMP típico	27
4.6. Análisis de los productos de amplificación	27
4.7. Amplificación de Mt-IS6110 mediante LAMP en termobloque	27
4.7.1. Límite de detección	27
4.7.2. Análisis comparativo LAMP - PCR (ciego simple).....	28
4.8. Validación de LAMP en termobloque usando muestras clínicas	28
4.9. Análisis estadístico.....	28
4.10. Declaración ética.....	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Amplificación del gen Mt-IS6110 en termociclador	29
5.1.1. Amplificación mediante PCR de punto final	29
5.1.2. Amplificación mediante LAMP en termociclador	29

5.2. Amplificación del gen Mt-IS6110 mediante LAMP en termobloque	31
5.2.1. Reacción típica	31
5.2.2. Límite de detección	31
5.3. Comparación de LAMP en termobloque y PCR de punto final	32
5.4. Análisis y validación de LAMP en termobloque usando muestras clínicas	32
5.4.1. Detección de ADN micobacteriano en extractos de cultivos solidos	33
5.4.2. Detección de ADN micobacteriano en extractos de esputo clarificado	33
6. DISCUSIONES	35
7. CONCLUSIONES	38
8. REFERENCIAS	39

Índice de figuras y tablas

Figura 1-1. Infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
Figura 1-2. Mapa circular del cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	12
Figura 1-3. <i>M. tuberculosis</i> teñida usando la técnica de Ziehl-Neelsen (carbol fucsina).....	18
Figura 1-4. <i>M. tuberculosis</i> teñida usando la técnica de Truant (auramina-rodamina).....	18
Figura 4-1. Regiones de hibridación de cada oligonucleótido LAMP en la secuencia IS6110 de <i>M. tuberculosis</i>	24
Figura 5-1. Análisis del producto de la amplificación de Mt-IS6110 mediante un ensayo PCR de punto final.....	29
Figura 5-2. Análisis de la amplificación de Mt-IS6110 mediante un ensayo LAMP en termociclador.....	30
Figura 5-3. Análisis del producto de la amplificación de Mt-IS6110 mediante el ensayo LAMP en termobloque.....	31
Figura 5-4. Límite de detección de Mt-IS6110 mediante el ensayo LAMP en termobloque.....	31
Figura 5-5. Análisis comparativo de los ensayos LAMP en termobloque (superior) y PCR de punto final (inferior) en la detección de Mt-IS6110.....	32
Figura 5-6. Análisis comparativo de los ensayos LAMP en termobloque (superior) y PCR de punto final (inferior) en la detección de Mt-IS6110 en extractos de cultivos sólidos.....	32
Figura 5-7. Análisis comparativo de los ensayos LAMP en termobloque (superior) y PCR de punto final (inferior) en la detección de Mt-IS6110 en extractos de esputos clarificados.....	33
Tabla 1-1. Diferencias clínicas entre infección de TB latente y activa.....	11
Tabla 1-2. Factores que incrementan el riesgo de desarrollar TB.....	11
Tabla 1-3. Esquemas para el tratamiento de la infección de TB latente.....	16
Tabla 1-4. Esquemas para el tratamiento de TB activa.....	17
Tabla 4-1. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en el estudio.....	25
Tabla 6-1. Resultados de los ensayos LAMP en termobloque y cultivo bacteriano durante la detección de TB en muestras de esputo con baciloscofia positiva (n = 20).....	36
Tabla 6-2. Comparación de resultados entre LAMP y cultivo durante la detección de TB en muestras de esputo con baciloscofia positiva (n = 20).....	37

Resumen

LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) es un novedoso método de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que requiere una sola temperatura. Otra de las principales características de este método es su habilidad para sintetizar grandes cantidades ADN a partir de unas cuantas moléculas diana.

IS6110 es una secuencia de inserción repetitiva con alta especificidad para micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (MTBC). La mayoría de las bacterias pertenecientes a éste, incluyendo *M. tuberculosis*, contienen múltiples copias de IS6110, por lo que su aplicación como secuencia diana incrementa la sensibilidad de la reacción.

El objetivo del presente estudio fue implementar un protocolo de amplificación isotérmica de IS6110 como sistema de detección rápida de la bacteria *M. tuberculosis* en muestras clínicas. Los resultados obtenidos demuestran que LAMP es una alternativa rápida, sensible y específica para la detección oportuna de tuberculosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tuberculosis: la enfermedad y el agente causal

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por una micobacteria del complejo MTBC, siendo *M. tuberculosis* el principal agente. A nivel mundial, la TB es una de las principales amenazas para la salud pública, junto con el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), como causa de muerte por enfermedades infecciosas. Aunque la incidencia de TB ha mostrado una tendencia a la baja, los índices de mortalidad observados en la última década indican que su erradicación permanece fuera del alcance.

Además, en regiones donde la prevalencia es alta, mejorar el acceso al diagnóstico y tratamiento son aspectos básicos para combatir la infección, particularmente en poblaciones de vulnerabilidad socioeconómica. Además, un problema alarmante, y vigente, es el creciente número de formas multirresistentes a la farmacoterapia actual, lo que demanda un gran compromiso en términos de asignación de fondos, promoción de la investigación, e implementación de nuevas herramientas diagnósticas y protocolos terapéuticos eficaces [Sulis *et al.*, 2014].

En su reporte de 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) resaltó que la TB es una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial. En el 2015, 10.4 millones de personas se reportaron infectadas y 1.8 millones murieron a consecuencia de la enfermedad (cerca del 95% ocurrieron en países de ingresos bajos o medianos). Por otro lado, se estimó que 480,000 personas desarrollaron TB multirresistente a fármacos¹.

En nuestro país, la incidencia reportada para el 2012 fue de 23 por cada 100,000 habitantes, indicando que la infección continúa siendo un problema de salud pública prevalente [Delgado-Sánchez *et al.*, 2015]. Desafortunadamente, muchas personas infectadas (latentes) o con síntomas (activos) no tienen acceso a un diagnóstico adecuado. En este sentido, los registros mundiales del 2013 estimaron que más de 3 millones de casos no fueron registrados en los respectivos sistemas sanitarios; ya sea porque no fueron diagnosticados o notificados a los programas nacionales de TB. Por lo tanto, se considera prioritario una herramienta diagnóstica rápida, precisa, y accesible para instituir oportunamente un tratamiento anti-TB [Pai y Schito, 2015].

¹ WHO, World Health Organization. Global tuberculosis report 2016, http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

1.1.1. Infección y reproducción

La TB es una enfermedad comunicable y los pacientes con infección pulmonar son la fuente más importante de la diseminación. De manera breve, el proceso inicia con la inhalación de microgotas (1-5 μm) que contienen a *M. tuberculosis*, que son expulsadas por pacientes con TB activa. Por su tamaño, las microgotas pueden permanecer suspendidas en el aire durante varios minutos (inclusive horas). En esta etapa, el riesgo de infección depende de varios factores, como la infectividad del patógeno, la cercanía del contacto, la carga bacilar, y el estado inmunológico del hospedero; siendo la vía pulmonar la principal ruta de entrada del agente infeccioso (Figura 1-1).

Cuando son inhaladas, las microgotas evitan las defensas de los bronquios debido a su minúsculo tamaño y penetran en los alvéolos terminales, donde son engullidas por las células inmunitarias fagocíticas (p. ej., macrófagos y células dendríticas). En la fase temprana de la infección, *M. tuberculosis* se replica intracelularmente (dentro del fagocito), y las células cargadas de bacterias pueden cruzar la barrera alveolar para causar diseminación sistémica. De manera interesante, la replicación y la difusión simultánea del patógeno hacia los ganglios linfáticos pulmonares y otros sitios extra-pulmonares se producen antes del desarrollo de la respuesta inmune adaptativa.

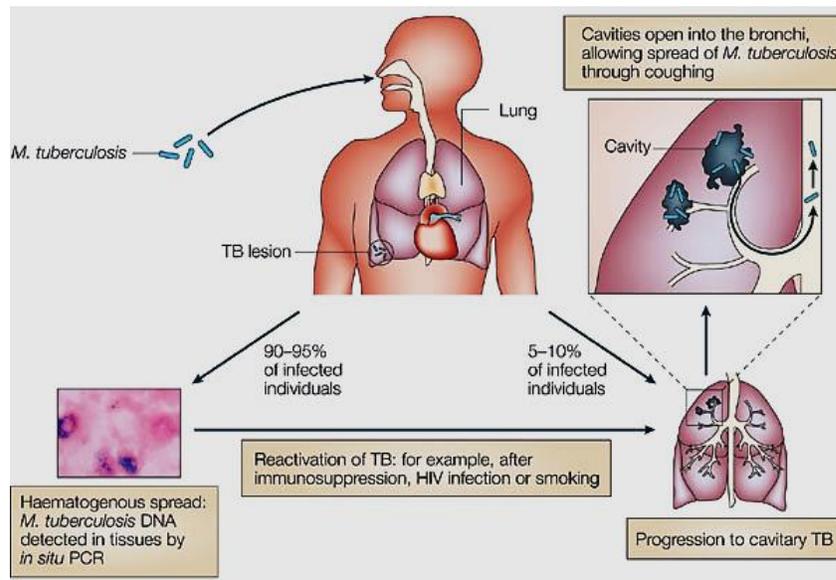


Figura 1-1. Infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

Tomada y mantenida en su formato original de Rook (2005).

Esto muestra la extraordinaria habilidad de *M. tuberculosis* para establecer un nicho protegido, donde puede evitar la eliminación por el sistema inmunitario (SI) y persistir indefinidamente [Ahmad, 2011].

1.1.2. Infección de TB latente y TB activa

No todos los individuos infectados con *M. tuberculosis* desarrollan la enfermedad. Por tal motivo, de acuerdo con el CDC (Tabla 1-1), han sido categorizados como pacientes con infección tuberculosa latente (LTBI), o con enfermedad tuberculosa (TB activa)².

Los pacientes con infección de TB latente no advierten malestares ni presentan síntomas de la enfermedad, a pesar de estar infectadas por *M. tuberculosis*. El único signo de infección es la reacción positiva en la prueba cutánea de la tuberculina, pero no son contagiosas y, por ende, no pueden transmitir las micobacterias. En la mayoría de los pacientes, las micobacterias permanecerán inactivas durante toda la vida, sin causar la enfermedad. Sin embargo, en individuos con SI debilitado (p. ej., infectados con VIH), las micobacterias pueden activarse y causar TB.

En pacientes con TB activa, las micobacterias se activan si el SI no evita que se multipliquen. Por consiguiente, desarrollan la enfermedad y pueden transmitir las micobacterias a otras personas. Algunos individuos presentan la enfermedad poco después de la infección (en las semanas siguientes), antes de que su SI pueda combatir a las micobacterias. En tanto, otras personas se enferman años después, cuando su SI se debilita por otra razón. Además de otros factores (Tabla 1-2), el riesgo de desarrollar TB es mucho mayor en pacientes con SI comprometido (p. ej., infectados con VIH) que para personas con SI competente.

Tabla 1-1. Diferencias clínicas entre infección de TB latente y activa.

Latente	Activa
<ul style="list-style-type: none"> ▪ No presenta síntomas ▪ No manifiesta malestares ▪ Radiografía de tórax normal 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tos intensa ▪ Dolor en el pecho ▪ Tos o esputo con sangre ▪ Debilidad o fatiga ▪ Pérdida de peso ▪ Falta de apetito ▪ Escalofríos ▪ Fiebre ▪ Sudores nocturnos ▪ Radiografía de tórax anormal

Tabla 1-2. Factores que incrementan el riesgo de desarrollar TB.

<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infección con VIH ▪ Infección reciente por TB ▪ Problemas de salud, como diabetes, y otras que afecten el sistema inmunitario ▪ Consumo de alcohol en exceso o drogas ▪ Tratamiento no adecuado para combatir infección previa
--

² CDC, Centers for Disease Control and Prevention (USA). The difference between latent TB infection and TB disease (last updated: November 21, 2014), https://www.cdc.gov/tb/esp/publications/factsheets/general/lbtbandactivetb_es.htm.

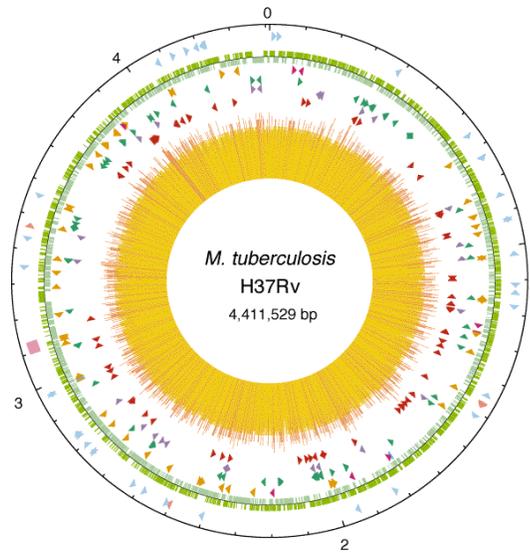


Figura 1-2. Mapa circular del cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

El círculo exterior muestra la escala en Mb, con 0 representando el origen de replicación. Del exterior al interior: el primer anillo denota las posiciones de los genes de ARN estables (ARNt, azul; otros, rosa) y la región de repetidos directos (cubo rosa); el segundo anillo muestra la secuencia de codificación por cadena (en el sentido de las manecillas del reloj, verde oscuro; en el sentido contrario, verde claro); el tercer anillo representa al ADN repetitivo (secuencias de inserción, naranja; familia 13E12 REP, rosa oscuro; profagos, azul); el cuarto anillo indica las posiciones de los miembros de la familia PPE (verde); el quinto anillo los miembros de la familia PE (púrpura, excluyendo PGRS); y el sexto anillo las secuencias PGRS (rojo oscuro). El histograma central representa el contenido de G+C: <65% en amarillo y >65% en rojo. Tomada y mantenida en su formato original de Cole (1998).

1.1.3. Genoma

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (NCBI™ NC_000962.3) consta de 4.41×10^6 pares de bases (Figura 1-2), con un contenido de 3,906 genes codificantes para proteínas: 233 del metabolismo de ácidos grasos, 708 de procesos celulares y de pared celular, y 99 relacionados con la virulencia, la detoxificación, y la adaptación. Con relación a elementos móviles, fueron identificadas 16 copias de la secuencia de inserción IS6110; además de otros 32 elementos de inserción. De manera interesante, la distribución cromosómica de estas secuencias es evolutivamente muy informativa, ya que aparentemente hubo una selección contra inserciones en la región adyacente al origen de replicación y una sobre-representación en la región de repetición directa que contiene a IS6110 [Camus *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 1998; Cole, 1999].

1.1.4. Factores de virulencia

La habilidad de un patógeno para sobrevivir dentro de un organismo hospedero requiere de la expresión de un conjunto de factores genéticos involucrados en la interacción

patógeno-hospedero, situación que le permite resistir el estrés fisiológico y medioambiental. La combinación de diferentes estrategias experimentales ha permitido identificar una serie de genes relevantes para la patogenicidad de *M. tuberculosis*, los cuales han sido agrupados, en base a su función, en distintos tipos de factores de virulencia [Smith, 2003]:

Proteínas de secreción. A partir de un filtrado, se identificaron alrededor 200 proteínas de secreción, y algunas asociadas (ya que no contienen señal de exportación, pero han sido obtenidas del medio de cultivo), denominadas CFP (del inglés *Cell Filtrate Proteins*). Entre los factores de virulencia categorizados en este grupo figuran KatG, SodA, GlnA, HspX, y ESAT6. De manera interesante, los factores HspX y ESAT-6 han sido catalogados como antígenos inmuno-dominantes, ya que son reconocidos por anticuerpos séricos de pacientes con TB activa. Además, en base a que confieren protección contra *M. tuberculosis* en modelos animales, estos factores representan inmunógenos potenciales para el desarrollo de vacunas.

Componentes de superficie celular. Estos factores son exclusivos de la pared celular de micobacterias patógenas, ya que siendo una estructura celular única y compleja contiene proteínas, lípidos, y carbohidratos propios del género (p. ej., Erp, Mas, FadD26, FadD28, MmpL7, FbpA, MmaA4, PcaA, OmpA, HbhA, y LAM); por tanto, son excelentes blancos para contrarrestar la virulencia de *M. tuberculosis*. Inclusive, las proteínas Fbp (micolil transferasas) han sido definidas como antígenos inmuno-dominantes.

Enzimas del metabolismo celular. Actualmente, más de 200 enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos y ácidos grasos han sido incluidas en esta clasificación (p. ej., Icl, LipF, FadD33, Plc[A/B/C/D], y Pan[C/D]). Por otro lado, algunas enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos y purinas (p. ej., LeuD, TrpD, ProC, PurC) han sido seleccionadas para aislar cepas auxotróficas y crear una vacuna de célula viva (atenuada). Por ejemplo, la mutación en el gen codificante para la antranilato fosforribosiltransferasa (TrpD) conduce a una atenuación severa, ocasionando que *M. tuberculosis* no proliferen en macrófagos de ratones SCID y por ende no cause la muerte.

Proteínas de anaerobiosis y estrés oxidativo. La expresión de enzimas que participan en la respiración en ausencia de oxígeno (NarG) y que contrarrestan la acción de las especies reactivas de oxígeno (SodA, SodC, KatG, y AhpC), durante el establecimiento del patógeno dentro del macrófago, sugiere que la resistencia a las condiciones de anaerobiosis y el estrés oxidativo son importantes para la fisiología de la micobacteria durante la infección; especialmente en la fase tardía (granuloma de pulmón).

Factores de captación de metales. La virulencia de microorganismos patógenos ha sido frecuentemente asociada con la captura de hierro y magnesio (Fe^{3+} y Mg^{2+}), los cuales son esenciales para la vida. De manera interesante, *M. tuberculosis* no es la excepción, ya que mutantes afectadas en la asimilación de estos metales exhiben un fenotipo de atenuación en su virulencia. Aún más, algunas proteínas (como MgtC, MbtB, y IdeR) han sido asociadas a defectos en los sistemas de incorporación de tales metales.

Reguladores transcripcionales. Habitualmente, son factores que controlan la transcripción de muchos genes. Aunque no se ha definido su papel fisiológico, la inactivación de algunos reguladores promete un deterioro importante en la virulencia de *M. tuberculosis*. Estos han sido clasificados en tres grupos: (a) factores sigma (SigA, SigE, SigF, SigH), que se predice esenciales para la virulencia; p. ej., SigA, es el principal factor para la transcripción de la mayoría de los genes *housekeeping*; (b) reguladores de respuesta (PhoP, PrrA, MprA), los cuales integran sistemas de dos componentes que responden a señales del medio ambiente, vía un sensor (receptor de membrana) y un efector (activador de la transcripción); p. ej., PhoP, que responde a la depleción de Mg^{2+} a través de un sensor de membrana; y (c) otros reguladores transcripcionales (HspR, WhiB3), que fueron anotados en el genoma de *M. tuberculosis* pero no se ha determinado su papel en la fisiología y virulencia bacteriana. .

1.1.5. Patogenia

Basados en los estudios en conejos, se han distinguido cuatro etapas de la TB pulmonar [Van Crevel *et al.*, 2002]. La primera etapa inicia con la inhalación de las micobacterias; enseguida, los macrófagos alveolares las ingieren y, a menudo, las destruyen. Sin embargo, la destrucción de los bacilos depende de dos factores: la capacidad microbicida intrínseca de los fagocitos del hospedero y de los factores de virulencia de las micobacterias ingeridas. Las micobacterias que escapan a la destrucción intracelular inicial se multiplicarán, dando lugar a una alteración del macrófago. Cuando esto sucede, los monocitos sanguíneos, y otras células inflamatorias, son atraídos hacia el pulmón (segunda etapa). Los monocitos se diferenciarán en macrófagos que ingieren micobacterias, pero no las destruyen. En esta etapa simbiótica, las micobacterias crecen logarítmicamente y los macrófagos (derivados de la sangre) se acumulan, pero se produce poco daño tisular. Dos a tres semanas posteriores a la infección, se desarrolla la inmunidad mediada por células T; el arribo de linfocitos T antígeno-específicos a las lesiones

tempranas, permite su proliferación, y las citocinas producidas por éstos, activan a los macrófagos para tratar de eliminar a las micobacterias intracelulares. Posterior a esta fase, el crecimiento bacilar logarítmico se detiene (tercera etapa). La necrosis en estas lesiones primarias inhibe el crecimiento extracelular de las micobacterias. Como resultado, la infección puede convertirse en estacionaria o latente. La enfermedad puede progresar, y la diseminación hematogena puede ocurrir después de la infección primaria, meses o años después, bajo condiciones de deficiente vigilancia inmunológica. Los focos caseosos licuados proporcionan excelentes condiciones para el crecimiento extracelular de *M. tuberculosis*. La formación de cavidades puede conducir a la ruptura de los bronquios cercanos, permitiendo a las micobacterias diseminarse a través de las vías aéreas a otras partes del pulmón y al medio exterior. En resumen, el resultado final de la infección depende del equilibrio entre (i) la proliferación y eliminación de las micobacterias y (ii) el grado de necrosis, fibrosis, y regeneración tisular.

1.1.6. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de TB activa incluye evaluación clínica, radiografía de tórax, tinción para bacilos ácido-resistentes, detección de anticuerpos, cultivos microbiológicos, y amplificación de ácidos nucleicos. Por otro lado, la infección de TB latente es detectada mediante la prueba PPD y la cuantificación de interferón gamma (IFN- γ) [Brodie y Schluger, 2005].

Como no todos los pacientes infectados desarrollan la enfermedad, el CDC³ sugiere dos esquemas terapéuticos de tratamiento anti-TB, ya que la infección latente puede evolucionar a enfermedad, y ésta, si no es tratada adecuadamente, puede ser mortal. Los cuatro esquemas para el tratamiento de la infección de TB latente (Tabla 1-3) utilizan a isoniazida (INH), rifapentina (RPT), o rifampicina (RIF). Si el paciente tiene contacto con una persona con TB activa y resistente a fármacos se sugiere modificar el tratamiento. En tal caso, es recomendable consultar a un especialista en TB.

Por otro lado, pacientes con TB activa pueden diseminar micobacterias a personas con las que tienen contacto diario por varias horas (p. ej., trabajo o escuela). Por lo tanto, es muy importante que sean tratadas adecuadamente, siguiendo exactamente el régimen prescrito de los fármacos, y finalicen su tratamiento. Ya que cualquier alteración en el esquema terapéutico puede ocasionar relapso (recaída en la enfermedad) y el desarrollo

³ CDC, Centers for Disease Control and Prevention (USA). Tuberculosis (TB) – Treatment (last updated: April 8, 2016), <https://www.cdc.gov/tb/topic/treatment/default.htm>.

Tabla 1-3. Esquemas para el tratamiento de la infección de TB latente.

(Esquema) Fármaco	Duración	Intervalo	Observaciones
(1) Isoniazida	9 meses	Diariamente Dos veces a la semana*	Recomendado para personas portadoras de VIH, niños de 2 a 11 años, y mujeres embarazadas (con suplementos de piridoxina). Recomendado para mujeres embarazadas (con suplementos de piridoxina).
(2) Isoniazida	6 meses	Diariamente Dos veces a la semana*	
(3) Isoniazida-Rifapentina	3 meses	Una vez a la semana*	Recomendado para personas mayores de 12 años. No recomendado para personas menores de 2 años, portadoras de VIH/SIDA y que reciben tratamiento anti-retroviral, portadoras de <i>M. tuberculosis</i> resistente a isoniazida o rifampicina, mujeres embarazadas o que tienen previsto quedar embarazadas dentro de las 12 semanas del esquema.
(4) Rifampicina	4 meses	Diariamente	

* Se sugiere observación directa (especializada) durante el tratamiento.

Nota: Debido a reportes sobre lesiones hepáticas graves y muerte, la CDC recomienda que la combinación rifampicina-pirazinamida no se ofrezca de manera general como tratamiento contra TB latente.

de multirresistencia. La TB activa puede ser tratada mediante la administración de fármacos durante 6-9 meses (Tabla 1-4). Actualmente, existen 10 fármacos aprobados por la agencia FDA; de los cuales, la primera línea de agentes anti-TB que conforman el núcleo básico de los esquemas de tratamiento son isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), y etambutol (EMB).

1.2. Métodos de detección de tuberculosis

1.2.1. Espécimen clínico (esputo)

La recolección y transporte adecuados de los especímenes son esenciales para el apropiado diagnóstico de TB. En general, los especímenes inapropiados incluyen aquellos que (i) tienen volumen insuficiente, (ii) exceden el tiempo óptimo entre recolección y procesamiento (>7 días), o (iii) consisten en saliva en lugar de esputo. Además, se debe tener cuidado para evitar la contaminación con fuentes de micobacterias ambientales (p. ej. agua del grifo), lo que puede confundir tanto los resultados de frotis como los de cultivo. Todos los especímenes deben ser transportados al laboratorio en menos de 24 h y deben mantenerse a 4 °C (si el transporte lleva más de una hora). La digestión-descontaminación

Tabla 1-4. Esquemas para el tratamiento de TB activa.

Fase Intensiva		Fase de Continuación		Observaciones ^{c, d}
(Esquema) ^a Fármacos*	Dosis e Intervalo ^b (duración mínima)	Fármacos	Dosis e Intervalo ^{b, c} (duración mínima)	
(1) INH-RIF- PZA-EMB	<ul style="list-style-type: none"> • 56 dosis, 7 días/semana (8 semanas) • 40 dosis, 5 días/semana (8 semanas) 	INH-RIF	<ul style="list-style-type: none"> • 126 dosis, 7 días/semana (18 semanas) • 90 dosis, 5 días/semana (18 semanas) 	Este esquema es recomendado para pacientes con TB pulmonar de reciente diagnóstico
(2) INH-RIF- PZA-EMB	<ul style="list-style-type: none"> • 56 dosis, 7 días/semana (8 semanas) • 40 dosis, 5 días/semana (8 semanas) 	INH-RIF	<ul style="list-style-type: none"> • 54 dosis, 3 días/semana (18 semanas) 	Esquema alternativo en situaciones donde la vigilancia terapéutica es requerida para completar la fase de continuación
(3) INH-RIF- PZA-EMB	<ul style="list-style-type: none"> • 24 dosis, 3 días/semana (8 semanas) 	INH-RIF	<ul style="list-style-type: none"> • 54 dosis, 3 días/semana (18 semanas) 	Esquema para pacientes con VIH, con o sin enfermedad cavernosa. Cualquier falta en el esquema puede conducir fracaso en el tratamiento, relapso, y resistencia adquirida a fármacos
(4) INH-RIF- PZA-EMB	<ul style="list-style-type: none"> • 14 dosis, 7 días/semana; seguidas de 12 dosis, 2 días/semana^e 	INH-RIF	<ul style="list-style-type: none"> • 36 dosis, 2 días/semana (18 semanas) 	Esquema no recomendado para pacientes con VIH, con o sin enfermedad cavernosa. Si falta una dosis la eficacia disminuye

* EMB, etambutol; INH, isoniazida; PZA, pirazinamida; RIF, rifampicina.

^a Otros esquemas pueden ser apropiados en ciertas circunstancias.

^b Cuando se recomienda vigilancia terapéutica, los fármacos pueden administrarse 5 días por semana y el número de dosis puede ser ajustado acorde. A pesar de la inexistencia de estudios comparativos, la amplia experiencia indica que el régimen de 5 días por semana puede ser eficaz en la práctica. Importante: cualquier reducción al esquema de 7 días por semana debe ser estrictamente vigilado.

^c En base a opiniones de expertos, pacientes con cavitación en la radiografía de tórax inicial y cultivos positivos al final de los 2 meses de terapia deben proseguir a una fase de continuación de 7 meses (31 semanas).

^d Dosis de 25-50 mg/día de vitamina B6 (piridoxina) deben ser administradas con INH a todos los pacientes en riesgo de neuropatía (p. ej., mujeres embarazadas, lactando o amamantando; personas con HIV; pacientes con diabetes, alcoholismo, desnutrición, falla renal crónica; o pacientes de edad avanzada). Para pacientes con neuropatía periférica, se recomienda un aumento de dosis de 100 mg/día.

^e Alternativamente, algunos programas internacionales de control de TB han administrado regímenes de fase intensiva de 15 dosis, 5 días/semana (3 semanas), seguidas de las 12 dosis, 2 días/semana.

es necesaria para todos los especímenes. El método más utilizado consiste en N-acetil-L-cisteína (NALC) e hidróxido de sodio al 2%. Este método es suficientemente suave para no matar a los bacilos ácido-resistentes en el espécimen, al tiempo que proporciona la adecuada inhibición de otros microorganismos contaminantes. Además, es compatible con varios sistemas automatizados de detección en cultivo [Parrish y Carroll, 2011].

1.2.2. Microscopía

El examen microscópico de esputo ha sido el pilar de la detección de *M. tuberculosis*. Como tal, la baciloscopía es la prueba más utilizada para detectar TB activa y es fundamental para la mayoría de las estrategias de control. La microscopía es rápida, barata

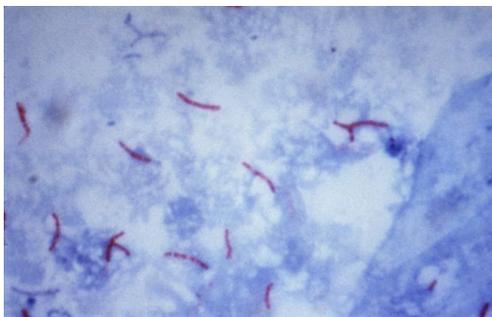


Figura 1-4. *M. tuberculosis* teñida usando la técnica de Ziehl-Neelsen (carbol fucsina).

Micrografía 1,000X. Tomada de PHIL (Public Health Image Library, CDC). ID # 5789 (<https://phil.cdc.gov>).



Figura 1-4. *M. tuberculosis* teñida usando la técnica de Truant (auramina-rodamina).

Micrografía 100X. Tomada de PHIL (Public Health Image Library, CDC). ID # 6469 (<https://phil.cdc.gov>).

y menos laboriosa que otras tecnologías. Aunque la microscopía de campo luminoso tradicional se ha utilizado ampliamente; p. ej., tinción Ziehl-Neelsen (ZN), la microscopía de fluorescencia proporciona una opción más sensible. Además, se ha desarrollado una tinción fluorescente más rápida, la tinción con auramina, que al mismo tiempo maximiza la tinción de los bacilos y minimiza el fondo [Holani *et al.*, 2014; Hooja *et al.*, 2011; Parrish y Carroll, 2011]. Aunque la tinción ZN es altamente específica, su sensibilidad es variable (20-80 %). Actualmente, la técnica de tinción fluorescente, usando como colorante a la mezcla auramina-rodamina, es más rápida y muy sensible (10%). Además, el uso de la tecnología LED (diodos emisores de luz) ha reducido el costo los equipos. Por tal motivo, la OMS recomienda que los análisis microscópicos fluorescentes sustituyan paulatinamente a los convencionales [Ryu, 2015].

Tinción de Ziehl-Neelsen. La presencia de los ácidos micólicos, y otros componentes de la pared celular, habilita a las micobacterias de una capa cerosa que le permite retener ciertos colorantes y resistir la decoloración ácida (propiedad denominada como “*acid-fast*”) [Singhal y Myneedu, 2015]. La tinción ZN toma ventaja de esta propiedad usando el colorante carbol fucsina (una mezcla de fucsina básica y fenol). La capa cerosa es impermeable a cualquier colorante ordinario; sin embargo, con ayuda de calor, facilitando la permeabilización, carbol fucsina es capaz de introducirse a la célula. Una vez teñida (color rojo), el bacilo resiste la decoloración alcohol-ácido, debido a que el complejo fucsina-fenol es insoluble en tales condiciones y la capa cerosa impide su salida. Habitualmente, la visualización es contrastada usando un colorante para contra-tinción, p. ej., azul de metileno (Figura 1-3).

Tinción fluorescente. El principio y el procedimiento para la tinción con fluorocromos es el mismo que para la tinción ZN. Con auramina, los bacilos emiten fluorescencia amarilla brillante, en tanto con auramina-rodamina la emiten de color amarillo-rojo. Ambas variantes ofrecen como ventaja un fondo casi negro (Figura 1-4).

1.2.3. Cultivo

El cultivo sigue siendo el método más sensible para la detección y aislamiento de *M. tuberculosis* en muestras clínicas. El aislamiento proporciona material biológico suficiente para todas las pruebas posteriores, incluyendo la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. El cultivo es capaz de detectar 10^1 - 10^2 bacilos/mL de muestra, superando la sensibilidad del frotis ($\leq 10^4$ bacilos/mL). Aunque existen varias opciones de cultivo, son preferibles los métodos basados en medio líquido para el aislamiento inicial, ya que la recuperación es significativamente más rápida (promedio de 10-14 días). Aunque los sistemas manuales para cultivo líquido son más económicos, existen sistemas automatizados que permiten el monitoreo continuo de la proliferación bacteriana; p. ej., el tubo indicador de crecimiento micobacteriano 960 (Bactec MGIT960) de Becton Dickinson.

Sin embargo, los cultivos líquidos están sujetos a mayores índices de contaminación bacteriana, en comparación con los métodos convencionales basados en agar (cultivo sólido). Además, ningún de los métodos de cultivo líquido puede proporcionar una identificación definitiva de la especie de micobacteria en proliferación, ni mucho menos la indicación de un cultivo micobacteriano mixto. Por lo tanto, es recomendable realizar cultivos paralelos en medio sólido (p. ej., Lowenstein-Jensen), los que proporcionarán material para la confirmación morfológica, genética y funcional de la especie de micobacteria aislada [Parrish y Carroll, 2011].

Lowenstein-Jensen (LJ). Este medio de cultivo es generalmente utilizado para aislar y cuantificar el crecimiento de *M. tuberculosis*. Existen diferentes formulaciones para la preparación del medio LJ; sin embargo, la formulación a base de huevo ofrece las siguientes ventajas: (1) fácil y económico para preparar; (2) tasa de contaminación reducida; y (3) mejor apreciación de las características morfológicas de las colonias. Empero, muestra ciertas desventajas; por ejemplo, (i) cuando prolifera la contaminación, ésta frecuentemente invade la superficie total del medio, y (ii) las pruebas de susceptibilidad no son recomendables, ya que existe la posibilidad de pérdida de potencia del antibiótico.

Medio líquido MGIT. Este medio de cultivo es comúnmente utilizado para amplificar el número de bacilos presente en la muestra clínica (como inóculo inicial) y detectar rápidamente las muestras positivas. MGIT consiste en caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con una mezcla de sustratos (OADC: ácido oleico, albúmina, dextrosa, y catalasa); y suplementado con una mezcla de antibióticos (PANTA: polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima, azlocilina). Además, contiene al complejo fluorescente tris-(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)-rutenio(II)-dicloro, conjugado a una capa de silicón en el fondo del tubo, que funciona como indicador sensible al oxígeno. De esta manera, si durante el crecimiento micobacteriano el oxígeno es utilizado, el indicador fluorescente presente en el tubo se activa. De manera interesante, la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la depleción de oxígeno en el medio y proporcional a la proliferación bacteriana.

1.2.4. Detección molecular

La detección de *M. tuberculosis* por métodos moleculares continúa cambiando el panorama diagnóstico de TB. Aunque todas las tecnologías moleculares actuales son rápidas y han demostrado una excelente especificidad, sus características de rendimiento pueden variar y su sensibilidad aún no es comparable con los métodos basados en cultivos, especialmente para muestras negativas por métodos microscópicos. Adicionalmente, son procedimientos costosos de llevar a cabo en laboratorios de diagnóstico con presupuesto limitado, ya que requieren (i) equipo costoso que demanda mantenimiento continuo; (ii) personal capacitado con amplia experiencia técnica, y (ii) un volumen de muestras relativamente alto para ser rentable [Parrish y Carroll, 2011].

Actualmente, el diagnóstico de *M. tuberculosis* se ha mantenido con los métodos tradicionales (baciloscopía y cultivo) y, en el mejor de los casos, en sinergia con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [O'Connor *et al.*, 2015]. Además de la técnica típica, otras variantes han sido implementadas, desde PCR múltiple hasta PCR en tiempo real [Law *et al.*, 2015].

1.2.5. Pruebas inmunológicas

Para distinguir *M. tuberculosis* de otras micobacterias no tuberculosas se utilizan pruebas rápidas inmuno-cromatográficas, las cuales han demostrado ser altamente sensibles (>95%) y específicas (>95%). Sin embargo, la variabilidad individual en la respuesta inmune hace que estas pruebas sean poco fiables [Brodie y Schluger, 2005].

1.3. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP)

Como alternativa a PCR y sus variantes, el método LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) fue desarrollado para obtener hasta 10^9 copias de ADN a partir de unas cuantas moléculas de material genético diana [Notomi *et al.*, 2000]. En comparación con otros métodos de amplificación, LAMP ofrece varias ventajas: (1) la amplificación isotérmica (60-65 °C) no requiere un equipo especializado, y puede realizarse en un termobloque de mesa; (2) puede ser en tiempo real y cuantitativo; (4) alta eficiencia de amplificación y sensibilidad; (5) el resultado final puede visualizarse de manera simple, mediante turbidez, color, o fluorescencia [Parida *et al.*, 2008]. Una de las bondades de LAMP es su alta especificidad, ya que utiliza 6 iniciadores que reconocen ocho diferentes regiones de la secuencia diana, ofreciendo eficiencia en la síntesis del fragmento deseado [Aryan *et al.*, 2010].

1.4. IS6110 como diana para la detección de *M. tuberculosis*

Micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (MTBC) contienen un alto número de copias de la secuencia de inserción IS6110 [Thierry *et al.*, 1990]. Por ejemplo, el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv incluye 16 copias de tal secuencia [Cole *et al.* 1998]. Además, se ha reportado que esta secuencia es altamente específica para *M. tuberculosis*, por lo que su aplicación como secuencia diana es altamente recomendable [Aryan *et al.*, 2010].

2. JUSTIFICACIÓN

La TB es una enfermedad con altos índices de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, principalmente en los países en vías de desarrollo. En México, sigue ubicándose entre las principales infecciones que afectan a la población. *M. tuberculosis*, el principal agente infeccioso, prevalece vigente gracias a diversos factores contribuyentes: (i) la virulencia propia del patógeno, (ii) el sistema inmune individual, (iii) la presencia de enfermedades concomitantes, (iv) un deficientemente apego al tratamiento, (v) la aparición de cepas multi-drogo-resistentes, y (vi) un diagnóstico tardío.

Por lo tanto, para disminuir el número de nuevos casos de TB, y reducir su incidencia, es esencial el desarrollo e implementación de una herramienta diagnóstica que favorezca la intervención médica oportuna y la aplicación de un tratamiento anti-TB apropiado. En este sentido, la técnica LAMP ofrece cuatro de las principales características deseables: rapidez, sensibilidad, especificidad, y robustez.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Implementar un protocolo de amplificación isotérmica (LAMP) de la secuencia IS6110 como sistema de detección rápido y eficiente de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas.

3.2. Objetivos específicos

1. Validar un protocolo LAMP típico mediante el uso de 6 iniciadores IS6110-específicos, una mezcla de reacción estándar y las condiciones de amplificación óptimas en un termobloque convencional.
2. Verificar los resultados del protocolo LAMP típico mediante un procedimiento estándar de electroforesis en gel de agarosa y contrastar su congruencia con el análisis visual (SYBR Green I y azul de hidroxinaftol).
3. Determinar el límite de detección del protocolo LAMP típico mediante un ensayo experimental ciego simple, usando diferentes cantidades de un ADN de referencia.
4. Validar el protocolo LAMP típico mediante la detección de ADN micobacteriano en muestras clínicas (esputo), con baciloscopía positiva, colectadas de pacientes con sospecha de padecer TB.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos, materiales y equipos

4.1.1. Reactivos

Todos los reactivos fueron obtenidos de diferentes proveedores y casas comerciales. *Biorad*: agarosa. *Cellgro*: solución amortiguadora 1X de fosfatos salina, modificación de Dulbecco (DPBS), libre de calcio y magnesio. *Fermont*: etanol. *IBI*: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), glicerol, tris[hidroximetil]aminometano] (Tris). *Invitrogen*: reactivo DNAzoI®, reactivo 10,000X SYBR® Green I. *JT Baker*: aceite mineral, ácido acético, hidróxido de sodio (NaOH), sulfato de magnesio (MgSO₄). *New England Biolabs*: 100-bp Ladder, λDNA-HindIII, ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (*Bst* ADN-pol), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), solución amortiguadora 10X para amplificación isotérmica. *Qiagen*: solución maestra 2X *Taq Mix*. *Sigma*: azul de bromofenol, azul de hidroxinaftol, azul de xilencianol, betaína, bromuro de etidio (BrEt).

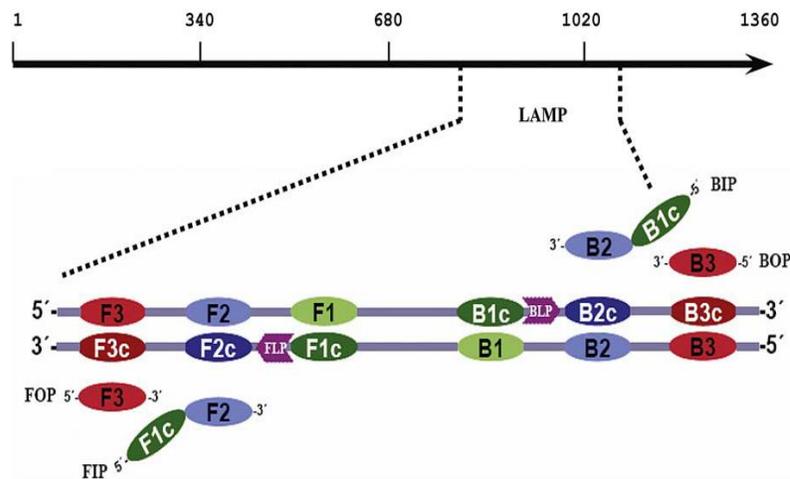


Figura 4-1. Regiones de hibridación de cada oligonucleótido LAMP en la secuencia IS6110 de *M. tuberculosis*.

Representación esquemática de la secuencia de Mt-IS6110 como flecha negra numerada (superior). La parte inferior muestra las ocho regiones de hibridación de los oligonucleótidos LAMP. Los iniciadores externos FOP y BOP son idénticos a las secuencias de las regiones F3 y B3, respectivamente. El iniciador interno FIP contiene la secuencia de la región F2, en el extremo 3', unida directamente a la secuencia de la región F1c (complementaria a la región F1), en el extremo 5'. El iniciador interno BIP contiene la secuencia de la región B2, en el extremo 3', unida directamente a la secuencia de la región B1c (complementaria a la región B1), en el extremo 5'. Los iniciadores de bucle (*loop*) FLP y BLP contienen secuencias complementarias a una parte de las secuencias entre F1-F2 y B1-B2, respectivamente. Tomada y conservada en su formato original de Aryan (2010).

Tabla 4-1. Oligonucleótidos sintéticos utilizados en el estudio.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
IS-FOP	AGACCTCACCTATGTGTCGA
IS-BOP	TCGCTGAACCGGATCGA
IS-FIP	ATGGAGGTGGCCATCGTGGAAGCCTACGTGGCCTTTGTCAC
IS-BIP	AAGCCATCTGGACCCGCCAACCTACGTGGCCTTTGTCAC
IS-FLP	AGGATCCTGCGAGCGTAG
IS-BLP	AAGAAGGCGTACTCGACCTG

4.1.2. Oligonucleótidos sintéticos y ADN de referencia

Las amplificaciones fueron realizadas usando los oligonucleótidos diseñados y reportados por Aryan *et al.*, 2010 (Figura 4-1). La hibridación con la secuencia IS6110 (GenBank X17348) fue verificada usando el programa BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). La Tabla 4-1 enlista la secuencia de los oligonucleótidos sintéticos, los cuales fueron obtenidos de la compañía *Operon Technologies, Inc.* Una muestra de ADN genómico a 0.14 mg/mL de *M. tuberculosis* H37Rv fue amablemente proporcionada por la Dra. Johana Bernáldez de la Unidad de Desarrollo Biomédico del CICESE.

4.1.3. Estuches comerciales y equipo

El estuche *BBL™ MycoPrep™ Specimen Digestion/Decontamination Kit* de Becton-Dickinson fue utilizado para la clarificación de especímenes clínicos. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo utilizando un termociclador *C1000 Touch™ Thermal Cycler (Biorad)* y un termobloque *VWR® Digital Heatblock (VWR International)*. La visualización y digitalización de los geles de agarosa teñidos con BrEt fue realizada utilizando el fotodocumentador *GelDoc™ EZ Imager (Biorad)*.

4.2. Muestras clínicas de *M. tuberculosis*

Los cultivos sólidos y especímenes clínicos fueron obtenidos del Laboratorio de TB del Hospital General de Tijuana (HGT), en conformidad con el protocolo aprobado (10/05/2016) por el Comité de Ética en Investigación del HGT. Todos los procedimientos relacionados con el manejo de las muestras clínicas fueron realizados en el laboratorio de TB (BSL2) del HGT, siguiendo las recomendaciones y disposiciones pertinentes.

4.3. Digestión y descontaminación de esputo

En la cabina BSL2, usando un tubo cónico estéril de 50 mL, se mezclaron cantidades iguales (10 mL) del esputo y de la solución NALC-NaOH (*MycPrep*[™]). La mezcla fue agitada (vórtex) hasta que se logró una mezcla homogénea. La digestión fue permitida durante 15 min a temperatura ambiente, agitando suavemente de vez en cuando. Enseguida, la mezcla fue equilibrada con 1-2 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos (*MycPrep*[™]) y clarificada mediante centrifugación (20 min a 3000 Xg). El sobrenadante fue cuidadosamente descartado y la pastilla celular fue resuspendida en el mínimo volumen (0.5-2.0 mL) de solución amortiguadora de fosfatos.

4.4. Extracción de ADN genómico

En un microtubo estéril de 1.7 mL, conteniendo 0.5 mL de DPBS, se añadieron: (i) 1-3 asadas de colonias micobacterianas provenientes de medio de cultivo LJ, o (ii) 200 µL de la suspensión, digerida y descontaminada, de esputo. La lisis celular fue favorecida durante 10 min a 80 °C, mezclando por inversión ocasionalmente. Después de enfriarse a temperatura ambiente, 1 mL de reactivo DNAzol[®] fue añadido y mezclado por inversión (5-10 veces). Los restos celulares fueron separados mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 10 min. Cuidadosamente, el sobrenadante fue transferido a otro microtubo estéril de 2.0 mL, mezclado con dos volúmenes de etanol absoluto frío, para favorecer la precipitación de ADN genómico, e incubado durante 10 min a temperatura ambiente. El ADN genómico fue separado mediante centrifugación a 14,500 rpm durante 10 min y lavado, en dos ocasiones, con 0.5 mL de etanol al 70% (1 min a 14,500 rpm). La pastilla, deshidratada a temperatura ambiente, fue resuspendida con 30 µL de NaOH 8 mM y mantenida en refrigeración hasta su uso.

4.5. Amplificaciones de Mt-IS6110 usando un termociclador

4.5.1. PCR típico

Las reacciones típicas de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL, conteniendo 10 picomoles de cada oligonucleótido externo (IS-FOP/IS-BOP) y 1 µL de ADN molde en solución maestra 1X *Taq Mix*. Las condiciones de termociclado fueron: un ciclo de desnaturalización inicial [2 min a 94 °C], 45 ciclos de amplificación exponencial [20 seg

a 94 °C, 20 seg a 55 °C, y 20 seg a 72 °C], y un ciclo de extensión final [7 min a 72 °C]. Al finalizar, las reacciones fueron mantenidas a 12 °C hasta ser retiradas del equipo.

4.5.2. LAMP típico

Las reacciones típicas se realizaron en un volumen final de 25 µL, conteniendo 40 picomoles de cada iniciador interno (IS-FIP/IS-BIP), 5 picomoles de cada iniciador externo (IS-FOP/IS-BOP), y 20 picomoles de cada iniciador de bucle (FLP/BLP), 0.8 M de betaína, 2 mM de deoxirribonucleótidos trifosfatados, 4 mM de MgSO₄, 8 U de *Bst* ADN-pol y 1 µL de ADN molde en solución amortiguadora 1X para amplificación isotérmica. Las condiciones de amplificación fueron: 90 min a 63 °C, seguidos de 10 min a 80 °C (inactivación enzimática).

4.6. Análisis de los productos de amplificación

Los productos de amplificación, PCR y LAMP, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.0%, conteniendo 0.5 µg/mL de BrEt (como agente fluorogénico intercalante de ADN) en solución amortiguadora 1X TAE (40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético, 1 mM de EDTA), y contrastadas usando marcadores de peso molecular (100-bp Ladder o λDNA-HindIII). Ocasionalmente, los productos de amplificación LAMP fueron analizados visualmente usando: (i) SYBR[®] Green I [concentración final: 100X], agente fluorogénico que se añade al finalizar la reacción, o (ii) azul de hidroxinaftol [concentración final: 120 µM], agente cromogénico que se incluye en la mezcla de reacción.

4.7. Amplificación de Mt-IS6110 mediante LAMP en termobloque

La reacción típica en termobloque fue preparada de manera similar al ensayo en termociclador; sin embargo, para esta variante técnica, el tubo de reacción fue suplementado con aceite mineral (20-25 µL) para evitar evaporación.

4.7.1. Límite de detección

La cantidad mínima de material genético detectable en condiciones estándar de LAMP en termobloque fue determinada realizando mezclas de reacción típicas conteniendo diferentes cantidades de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv.

4.7.2. Análisis comparativo LAMP - PCR (ciego simple)

La eficiencia diagnóstica de LAMP en termobloque en comparación con PCR de punto final fue determinada realizando de manera paralela ambos ensayos. En condiciones estándar, se prepararon mezclas de reacción típicas conteniendo diferentes cantidades de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv.

4.8. Validación de LAMP en termobloque usando muestras clínicas

Los ensayos LAMP en termobloque y PCR de punto final fueron realizados de manera paralela, preparando mezclas de reacción típicas conteniendo 1 μ L del extracto de ADN genómico obtenido de micobacterias contenidas en medio sólido o esputo clarificado.

4.9. Análisis estadístico

El grado de concordancia entre dos ensayos fue estimado mediante un análisis estadístico kappa (κ) usando el módulo *QuickCalcs* del servidor GraphPad (www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1). El desempeño diagnóstico: sensibilidad, especificidad, y valores predictivos (positivo y negativo), fue determinado usando el módulo *Diagnostic Test Evaluation* del servidor OpenEpi (www.openepi.com/DiagnosticTest/DiagnosticTest.htm). La razón de momios del diagnóstico fue calculada considerando la fórmula estándar [Glas *et al.*, 2003].

4.10. Declaración ética

El presente estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital General de Tijuana, Baja California (México). Las muestras de esputo, extractos de ADN, y cultivos bacterianos se analizaron anónimamente. El manejo de muestras y todos los procedimientos subsecuentes se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité antes mencionado y con estricto apego a las normas éticas que se aplican a los procedimientos experimentales en las instituciones involucradas en el estudio. Todos los pacientes participaron de manera voluntaria. La privacidad individual fue garantizada mediante la eliminación de los datos personales del tubo de muestra antes de realizar cualquier análisis. Toda investigación médica fue realizada de acuerdo con la Declaración de Helsinki y Buenas Prácticas Clínicas.

5. RESULTADOS

5.1. Amplificación del gen Mt-IS6110 en termociclador

5.1.1. Amplificación mediante PCR de punto final

Como procedimiento de validación de los insumos materiales (ADN genómico e iniciadores externos), que serían utilizados en la amplificación LAMP de Mt-IS6110, se realizó una reacción de PCR típica conteniendo 140 ng de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y 10 picomoles de cada iniciador externo. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

Como se observa en la Figura 5-1, un fragmento menor a 0.56 kb fue amplificado (carril 3), sugerente de la talla esperada (233 pb). Además, como era deseado, no se observó amplificación en el control negativo (carril 2), corroborando la especificidad de los oligonucleótidos IS-FOP e IS-BOP, requeridos para la fase inicial de la amplificación LAMP.

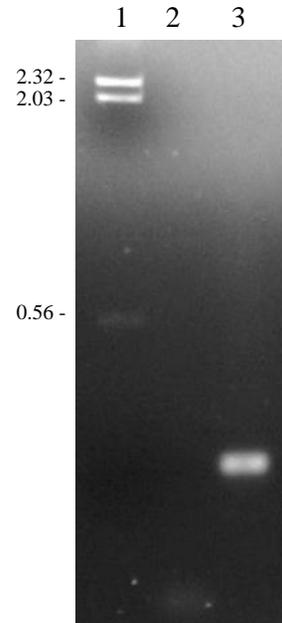


Figura 5-1. Análisis del producto de la amplificación de Mt-IS6110 mediante un ensayo PCR de punto final.

Gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. PM, marcador λ DNA-HindIII (kb); 1, reacción negativa (sin ADN molde); 2, reacción positiva; 3.

5.1.2. Amplificación mediante LAMP en termociclador

Para corroborar la reproducibilidad de un protocolo de amplificación isotérmica previamente reportado [Aryan *et al.*, 2010], se realizó un ensayo LAMP conteniendo 1 ng de ADN de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv). Esta reacción fue llevada a cabo en un termociclador usando las condiciones típicas recomendadas para una amplificación isotérmica. Inicialmente, los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio.

El panel A de la Figura 5-2 muestra los resultados obtenidos. Como se observa en el carril 1, la reacción positiva generó el perfil de amplificación esperado; es decir, un producto primario (± 170 pb) y varios secundarios en escalera. Además, como era esperado, no se observó amplificación en el control negativo (carril 2), corroborando la especificidad de la reacción.

De manera adicional, como LAMP ofrece la ventaja técnica de permitir la evaluación cualitativa (a simple vista) del producto de la reacción, se realizó un análisis visual usando SYBR[®] Green I (como agente fluorogénico) y el indicador azul de hidroxinaftol (como indicador cromogénico).

SYBR[®] Green I emite un color verde brillante cuando se intercala en el ADN de doble cadena [Zipper *et al.*, 2004]; en caso contrario, permanece de color café marrón. Azul de hidroxinaftol desarrolla una coloración azul fuerte (casi violeta) cuando se acompleja con

una alta cantidad de iones Mg^{2+} libres; sin embargo, cuando la concentración de éstos disminuye (por formación del complejo pirofosfato-magnesio), el color decae hacia azul claro (azul cielo) [Goto *et al.*, 2009]. Como se distingue en los paneles B y C de la Figura 5-2, los resultados obtenidos coinciden con el patrón de coloración esperado.

De manera global, los resultados indican que la reacción LAMP puede ser aplicada para amplificar un fragmento del gen Mt-IS6110 en condiciones reproducibles. Además, el resultado puede ser valorado usando métodos clásicos (como electroforesis en gel de agarosa) o mediante indicadores (como SYBR[®] Green I o azul de hidroxinaftol).

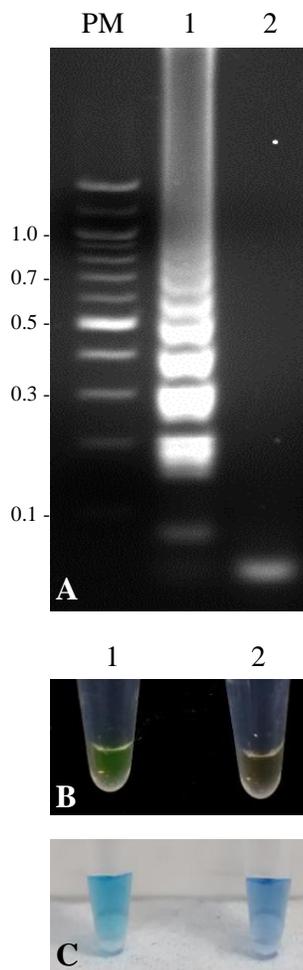


Figura 5-2. Análisis de la amplificación de Mt-IS6110 mediante un ensayo LAMP en termociclador.

(A) Gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. PM, marcador 100-bp Ladder (kb); 1, reacción positiva; 2, reacción negativa (sin ADN molde). Visualización simple, en microtubo, usando los indicadores coloridos SYBR[®] Green I (B) y azul de hidroxinaftol (C).

5.2. Amplificación del gen Mt-IS6110 mediante LAMP en termobloque

5.2.1. Reacción típica

La amplificación isotérmica de Mt-IS6110 fue extrapolada a un termobloque de mesa con el fin de valorar la factibilidad de trasladar esta técnica a un laboratorio de análisis clínicos rutinarios e integrarla al conjunto de protocolos para el diagnóstico temprano de TB activa.

Las condiciones fueron similares a las utilizadas en el termociclador, con la única diferencia de que se incorporó una capa de aceite mineral a la mezcla de reacción para reducir la posibilidad de pérdida de volumen por evaporación de agua.

Como se aprecia en la Figura 5-3, se obtuvieron los resultados esperados, tanto en el análisis electroforético (panel A) como visual (panel B).

5.2.2. Límite de detección

El límite mínimo de detección del gen Mt-IS6110 mediante LAMP en termobloque fue determinado utilizando diferentes cantidades, 1 ng a 0.1 fg, de ADN de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv).

Como se distingue en la Figura 5-4, las condiciones ensayadas permiten la detección hasta 100 fg de material genético, equivalente a 20 genomas micobacterianos (considerando 5 fg para *M. tuberculosis* H37Rv), [Aryan *et al.*, 2010].

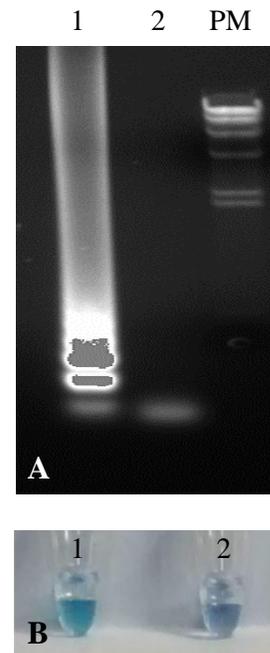


Figura 5-3. Análisis del producto de la amplificación de Mt-IS6110 mediante el ensayo LAMP en termobloque.

(A) Gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. 1, reacción positiva; 2, reacción negativa (sin ADN molde); PM, marcador λ DNA-HindIII. (B) Visualización simple con azul de hidroxinaftol.

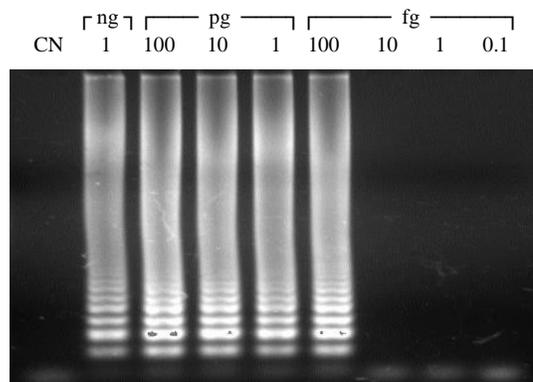


Figura 5-4. Límite de detección de Mt-IS6110 mediante el ensayo LAMP en termobloque.

Gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. La cantidad de material genético en cada reacción se indica en la parte superior. CN, control negativo.

5.3. Comparación de LAMP en termobloque y PCR de punto final

Como parte de los análisis de sensibilidad de LAMP en termobloque, se realizó un diseño experimental ciego simple. 10 muestras con diferentes cantidades de ADN de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv) fueron proporcionadas, de manera ciega y aleatoria, al ejecutor. Además de los respectivos controles, las muestras fueron analizadas de manera simultánea mediante LAMP y PCR.

Los resultados de ambos ensayos se presentan en la Figura 5-5. Como se puede notar, de manera inequívoca, LAMP logra detectar hasta 1.4 pg; en contraste, PCR distingue hasta 14 pg. Con esto, es posible suponer que LAMP es cuanto menos 10 veces más sensible que PCR.

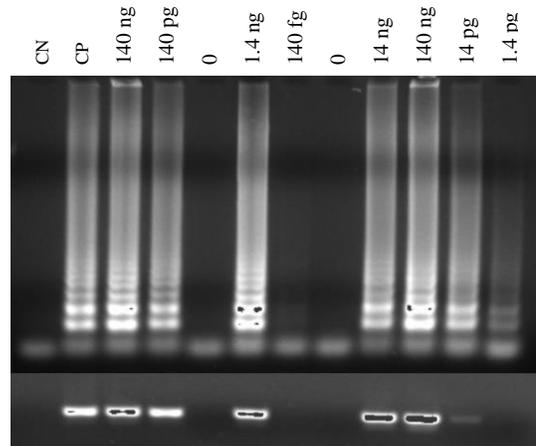


Figura 5-5. Análisis comparativo de los ensayos LAMP en termobloque (superior) y PCR de punto final (inferior) en la detección de Mt-IS6110.

Gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. La cantidad de material genético incorporado en cada reacción se indica en la parte superior. CN, control negativo; CP, control positivo.

5.4. Análisis y validación de LAMP en termobloque usando muestras clínicas

Para valorar a LAMP en termobloque como ensayo para la detección rápida y temprana de *M. tuberculosis* en muestras clínicas, se utilizaron dos fuentes biológicas para la extracción de ADN: cultivo sólido y esputo clarificado, provenientes de muestras con baciloscopia positiva, colectadas de pacientes con sospecha de padecer TB (amablemente proporcionadas por personal de la Clínica de TB del HGT).

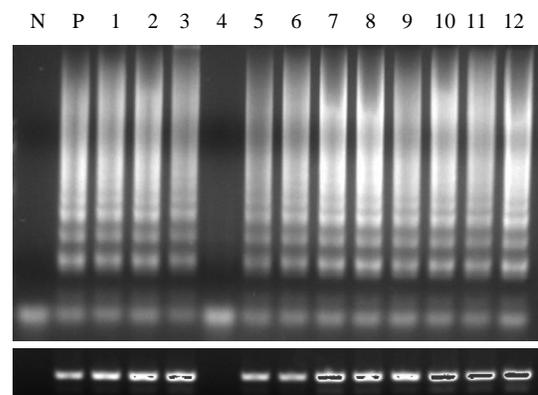


Figura 5-6. Análisis comparativo de los ensayos LAMP en termobloque (superior) y PCR de punto final (inferior) en la detección de Mt-IS6110 en extractos de cultivos sólidos.

Gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. CN, control negativo; P, control positivo. El código asignado a cada muestra se indica en la parte superior. N, negativo; P, positivo. Cabe destacar que sólo se presenta el análisis de las 12 primeras muestras.

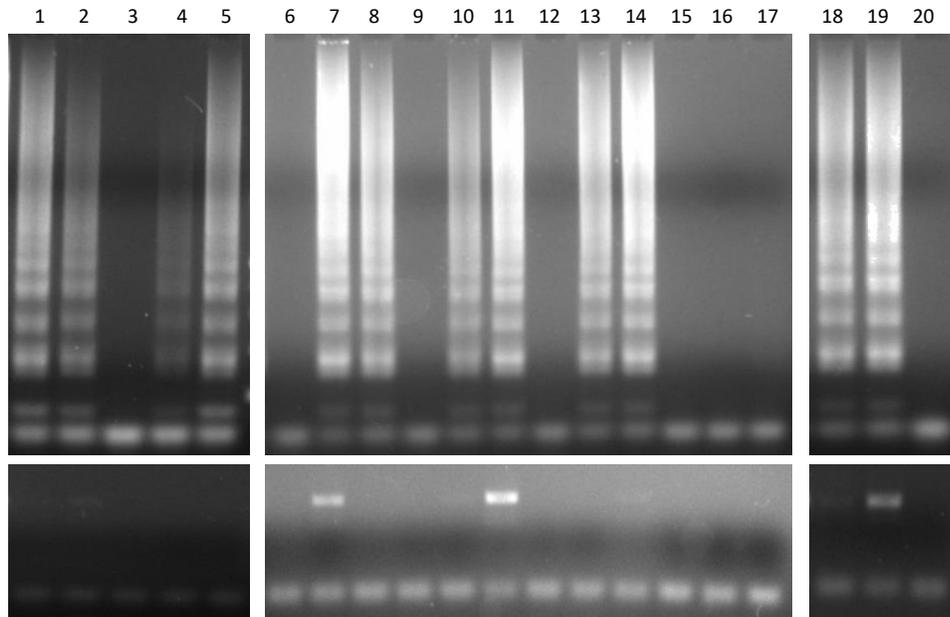


Figura 5-7. Análisis comparativo de los ensayos LAMP en termobloque (superior) y PCR de punto final (inferior) en la detección de Mt-IS6110 en extractos de esputos clarificados.

Gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. El código asignado a cada muestra se indica en la parte superior.

5.4.1. Detección de ADN micobacteriano en extractos de cultivos solidos

A partir de 15 cultivos viables, se llevó a cabo una extracción de ADN y se realizó un análisis comparativo de detección de Mt-IS6110 mediante los ensayos LAMP en termobloque y PCR de punto final. Como se observa en los resultados de la Figura 5-6, se detectó amplificación positiva en 14 cultivos y una concordancia de 100% para ambos ensayos. De manera sorprendente, se notó que la muestra 4 no rindió amplificación en lo absoluto, lo que sugiere: (i) una extracción deficiente de material genético, o (ii) un posible crecimiento bacteriano que no corresponde a *M. tuberculosis* (lo cual puede ser confirmado por otros procedimientos moleculares, bioquímicos o celulares).

5.4.2. Detección de ADN micobacteriano en extractos de esputo clarificado

A partir de 20 especímenes clínicos (esputo) digeridos y descontaminados, se realizó una extracción de ADN y se llevó a cabo un análisis comparativo de detección de Mt-IS6110 mediante los ensayos LAMP en termobloque y PCR de punto final. Como se distingue en la Figura 5-7, LAMP mostró amplificación positiva en 12 muestras de esputo (panel superior: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 18, y 19); en tanto, PCR reveló 3 muestras

claramente positivas (panel inferior: 7, 11, y 19) y 4 dudosas (panel inferior: 2, 10, 14, y 18). De manera notoria, ambos ensayos presentan diferencias en la detección de ADN micobacteriano, siendo LAMP el que exhibe mejores resultados.

Sin embargo, para determinar el desempeño diagnóstico de LAMP en termobloque, fue necesario realizar un análisis comparativo utilizando los resultados del cultivo bacteriano en medio sólido (LJ) como estándar de oro. Aunque el análisis de resultados de cultivos no había sido incluido en los objetivos planteados inicialmente, y dado que dicha información se encuentra disponible para los fines académicos del presente estudio, por ello se discuten a continuación.

6. DISCUSIONES

TB sigue siendo una de las principales amenazas para la salud pública. A nivel mundial, las tasas de morbilidad y mortalidad indican que la erradicación permanece fuera del alcance [Raviglione *et al.*, 2016; Sulis *et al.*, 2014]. En el año 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó 10.4 millones de nuevos casos [WHO, 2016], lo que indica que el diagnóstico erróneo y la detección tardía de los individuos con infección activa ha mantenido su prevalencia [Yuen *et al.*, 2015]. Para reducir la frecuencia de nuevas infecciones, en particular en las poblaciones con una alta incidencia, es esencial implementar un sistema de detección temprana y precisa que favorezca el inicio de la farmacoterapia [WHO, 2016; Pai *et al.*, 2016; Caulfield y Wengenack, 2016].

Mycobacterium tuberculosis, el principal agente causal de TB en humanos, se ha detectado tradicionalmente con dos métodos principales: baciloscopía y cultivo bacteriano [Caulfield y Wengenack, 2016]. A pesar de sus desventajas intrínsecas, estos métodos son actualmente válidos como pruebas de rutina: la baciloscopía es rápida y económica, pero presenta baja sensibilidad; mientras que, el cultivo bacteriano (el estándar de oro) es altamente sensible, pero tarda hasta 6 semanas en presentar un resultado confiable [Gelaw *et al.*, 2017; Ou *et al.*, 2014; Bi *et al.*, 2012].

La demanda actual de una prueba sensible, rápida y específica para detección de TB ha sido atendida por varias técnicas de amplificación de ácidos nucleicos [Gelaw *et al.*, 2017; Caulfield y Wengenack, 2016]. Por ejemplo, *PCR* (la técnica más común) permite la detección directa de micobacterias en muestras clínicas sin depender del crecimiento bacteriano. Sin embargo, éstas requieren equipos sofisticados, lo que representa una restricción significativa para laboratorios con limitaciones económicas [Gelaw *et al.*, 2017; Caulfield y Wengenack, 2016; Cudahy y Shenoj, 2016; Ou *et al.*, 2014].

Como alternativa, se desarrolló una técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (denominada *LAMP*) [Notomi *et al.*, 2000]. Esta técnica ofrece la amplificación de grandes cantidades de un ADN específico (hasta mil millones de réplicas) a partir de unas cuantas copias de la molécula diana. Además, puede llevarse a cabo en un termobloque de mesa convencional, ya que la reacción se desarrolla a una temperatura definida [Fernández-Soto *et al.*, 2014; Notomi *et al.*, 2000]. Recientemente, un procedimiento *LAMP* específico y eficiente para la detección de TB fue desarrollado de manera exitosa utilizando la secuencia de inserción repetitiva IS6110 como diana [Aryan *et al.*, 2010]. Más aún,

después de una reunión en el año 2012, el Grupo de Expertos de la OMS acordó que LAMP tiene gran potencial como herramienta de diagnóstico rápido para TB [WHO, 2013].

En el año 2015, México reportó una incidencia de 21 casos por cada 100.000 habitantes [WHO, 2016], lo que sugiere que TB sigue prevalente en la población actual. A nivel regional, las tasas de incidencia más altas se encuentran en los estados del norte del país (región fronteriza entre México y Estados Unidos). En el año 2010, esta región representó casi el 30% de todos los casos nacionales, donde Baja California fue el estado con mayor número de casos [Oren *et al.*, 2016; PAHO 2012].

Para contribuir a reducir la incidencia nacional de TB; particularmente en el estado de Baja California, se implementó un procedimiento LAMP para la detección rápida y oportuna de *M. tuberculosis* en muestras de esputo de pacientes atendidos en la Clínica de TB del Hospital General de Tijuana. Como ensayo introductorio, este procedimiento fue evaluado en 20 muestras de esputo con baciloscopía positiva. Después de dos etapas consecutivas: extracción de ADN y amplificación isotérmica, los resultados fueron analizados.

Las muestras de esputo fueron recolectadas apropiadamente por personal calificado del Laboratorio de Diagnóstico de TB del HGT. Siguiendo los procedimientos rutinarios, todas las muestras se sometieron a baciloscopía y cultivo bacteriano. Paralelamente, el material genético fue extraído usando el reactivo comercial DNAzol® Invitrogen, siguiendo el protocolo estándar con modificaciones menores. La amplificación isotérmica de ADN micobacteriano fue realizada mediante el ensayo LAMP específico para Mt-IS6110 [Aryan *et al.*, 2010]. Los productos de amplificación fueron teñidos con bromuro de etidio y examinados siguiendo el protocolo típico de electroforesis en gel de agarosa.

Adicionalmente, el resultado de cada reacción fue evaluado visualmente

Tabla 6-1. Resultados de los ensayos LAMP en termobloque y cultivo bacteriano durante la detección de TB en muestras de esputo con baciloscopía positiva (n = 20).

Muestra	LAMP	Cultivo
01	+	+
02	+	+
03	-	+
04	+	+
05	+	-
06	-	-
07	+	+
08	+	-
09	-	-
10	+	+
11	+	+
12	-	-
13	+	-
14	+	+
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	+	-
19	+	+
20	-	-

utilizando el colorante azul hidroxinaftol como indicador cromogénico [Goto *et al.*, 2009]. Sin embargo, como el juicio positivo (azul) o negativo (violeta) representó un esfuerzo adicional con resultado dubitativo en reacciones con un grado de amplificación pobre, este enfoque no fue considerado para este estudio. Para superar este inconveniente técnico, se propone utilizar otro indicador cromogénico ya validado: el verde de malaquita [Lucchi *et al.*, 2016; Nzelu *et al.*, 2016], el cual será considerado en futuros ensayos.

Los resultados correspondientes LAMP-cultivo se enlistan en la Tabla 6-1. El rendimiento diagnóstico de LAMP en termobloque, en comparación con el cultivo bacteriano (como estándar de oro), se presenta en la Tabla 6-2. De manera interesante, se observó que ambos ensayos muestran un grado razonable de concordancia (75%) y un moderado valor de coeficiente kappa (0.51 ± 0.18). Además, la sensibilidad y la especificidad del ensayo LAMP fueron de 88.9 y 63.6%, respectivamente, mientras que la razón de momios para diagnóstico fue de 14.

Nuestro método DNAzol-LAMP mostró un valor de sensibilidad dentro del intervalo de valores reportados en otros estudios (80-100%) [Gelaw *et al.*, 2017; WHO, 2013; Aryan *et al.*, 2013; George *et al.*, 2012]. Sin embargo, la identificación de una muestra negativa para LAMP, pero positiva para cultivo sugiere que el protocolo para la extracción de ADN debe ser optimizado. Más aún, la detección de cuatro muestras positivas para LAMP, pero negativas para cultivo indica que algunas muestras de esputo pueden tener un bajo título de bacterias viables.

Tabla 6-2. Comparación de resultados entre LAMP y cultivo durante la detección de TB en muestras de esputo con baciloscopía positiva (n = 20).

Comparación de resultados		
LAMP	Cultivo	
	Positivo	Negativo
Positivo	8	4
Negativo	1	7
Estadística kappa (κ)		
Concordancia	75%	
Coefficiente κ	0.51 ± 0.18	
Desempeño diagnóstico de LAMP		
Sensibilidad	88.9%	
Especificidad	63.6%	
VPP	66.7%	
VPN	87.5%	
RMD	14.0	

VPP, valor predictivo positivo; VNP, valor predictivo negativo; RMD, razón de momios de diagnóstico.

7. CONCLUSIONES

El procedimiento implementado, DNAzol-LAMP, es un método confiable para la detección temprana de TB en muestras de esputo con frotis positivo, mostrando un valor de sensibilidad satisfactorio para fines prácticos. Sin embargo, la apreciación de un valor moderado para especificidad indica imprecisiones en el desarrollo experimental. Por tal motivo, es recomendable estandarizar el procedimiento para garantizar la calidad de los resultados y evitar la práctica controvertida de repetir la prueba o solicitar una muestra fresca.

Finalmente, teniendo en cuenta las recomendaciones recientes emitidas por la OMS, sobre el uso de LAMP para el diagnóstico de TB en adultos [WHO, 2016], es imperante valorar su confiabilidad en muestras con baciloscopía negativa. Inclusive, su desempeño diagnóstico debe ser evaluado en un estudio a gran escala para establecer apropiadamente su sensibilidad y especificidad.

8. REFERENCIAS

- Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011; 2011: 814943.
- Aryan E, Makvandi M, *et al.* A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiol Res*. 2010; 165 (3):211-220.
- Aryan E, Makvandi M, *et al.* Clinical value of IS6110-based loop-mediated isothermal amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *The Journal of Infection* 2013; 66: 487-93.
- Bi A, Nakajima C, *et al.* A rapid loop-mediated isothermal amplification assay targeting hspX for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2012; 65: 247-51.
- Brodie D, Schluger NW. The diagnosis of tuberculosis. *Clin Chest Med*. 2005; 26 (2): 247-71.
- Camus JC, Pryor MJ, *et al.* Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*. 2002; 148 (Pt 10): 2967-73.
- Caulfield AJ, Wengenack NL. Diagnosis of active tuberculosis disease: from microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases* 2016; 4: 33-43.
- Cole ST, Brosch R, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 393: 537-44.
- Cole ST. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett*. 1999; 452 (1-2): 7-10.
- Cudahy P, Shenoi S. Diagnostics for pulmonary tuberculosis. *Postgraduate Medical Journal* 2016; 92: 187-93.
- Delgado-Sánchez G, García-García L, *et al.* Association of pulmonary tuberculosis and diabetes in Mexico: analysis of the national tuberculosis registry 2000–2012. *PLoS ONE*. 2015; 10 (6): e0129312.
- Fernández-Soto P, Mvoulouga PO, *et al.* Development of a highly sensitive loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the detection of *Loa loa*. *PLoS ONE* 2014; 9: e94664.
- Gelaw B, Shiferaw Y, *et al.* Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and smear microscopy with culture for the diagnostic accuracy of tuberculosis. *BMC Infectious Diseases* 2017; 17: 79.
- George G, Mony P, Kenneth J. Comparison of the efficacies of loop-mediated isothermal amplification, fluorescence smear microscopy and culture for the diagnosis of tuberculosis. *PLoS ONE* 2011; 6: e21007.
- Glas AS, Lijmer JG, *et al.* The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *Journal of Clinical Epidemiology* 2003; 56: 1129-35.
- Goto M, Honda E, *et al.* Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. 2009; 46 (3): 167-172.
- Holani AG, Ganvir SM, *et al.* Demonstration of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum and saliva smears of tuberculosis patients using Ziehl Neelsen and fluorochrome staining - A comparative study. *J Clin Diagn Res*. 2014; 8 (7): ZC42-5.
- Hooja S, Pal N, *et al.* Comparison of Ziehl Neelsen & Auramine O staining methods on direct and concentrated smears in clinical specimens. *Indian J Tuberc*. 2011; 58 (2):72-6.
- Law JW, Ab Mutalib NS, *et al.* Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front. Microbiol*. 2015; 5: 770.
- Lucchi NW, Ljolje D, *et al.* Use of malachite green-loop mediated isothermal amplification for detection of *Plasmodium* spp. parasites. *PLoS ONE* 2016; 11: e0151437.
- Notomi T, Okayama H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 2000; 28: e63.
- Nzelu CO, Cáceres AG, *et al.* A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. *Acta Tropica* 2016; 153: 116-9.

- O'Connor JA, B. O'Reilly GD, *et al.* Mycobacterium diagnostics: from the primitive to the promising. *Br. J. Biomed. Sci.* 2015; 72: 32-41.
- Oren E, Fiero MH, *et al.* Detection of latent tuberculosis infection among migrant farmworkers along the US-Mexico border. *BMC Infectious Diseases* 2016; 16: 630.
- Ou X, Li Q, *et al.* Diagnostic accuracy of the PURE-LAMP test for pulmonary tuberculosis at the county-level laboratory in China. *PLoS ONE* 2014; 9: e94544.
- PAHO (Pan American Health Organization). *Health in the Americas: 2012 Edition. Regional Outlook and Country Profiles.* Washington, DC: PAHO/WHO, 2012.
- Pai M, Behr MA, *et al.* Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2016; 2: 16076.
- Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects. *The Journal of Infectious Diseases.* 2015; 211 (Suppl 2): S21-8.
- Parida M, Sannarangaiah S, *et al.* Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* 2008; 18: 407-21.
- Parrish NM, Carroll KC. Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (3): 772–6.
- Raviglione M, Sulis G. Tuberculosis 2015: burden, challenges and strategy for control and elimination. *Infectious Disease Reports* 2016; 8: 6570.
- Rook GA, Dheda K, Zumla A. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5 (8): 661-667.
- Ryu YJ. Diagnosis of pulmonary tuberculosis: Recent advances and diagnostic algorithms. *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2015; 78 (2): 64–71.
- Singhal R, Myneedu VP. Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *Int J Mycobacteriol.* 2015;4 (1): 1-6.
- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003;16 (3):463-96.
- Sulis G, Roggi A, *et al.* Tuberculosis: epidemiology and control. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases.* 2014 ;6 (1): e2014070.
- Thierry D, Brisson-Noël A, *et al.* Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 2668-73.
- Van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002; 15 (2): 294-309.
- WHO (World Health Organization). *Global tuberculosis report 2016.* Geneva, Switzerland: WHO, 2016.
- WHO (World Health Organization). *The use of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay (TB-LAMP) for the detection of tuberculosis: expert group meeting report.* Geneva, Switzerland: WHO, 2013.
- WHO (World Health Organization). *The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: Policy Guidance.* Geneva, Switzerland: WHO, 2016.
- Yuen CM, Amanullah F, *et al.* Turning off the tap: stopping tuberculosis transmission through active case-finding and prompt effective treatment. *The Lancet* 2015; 386: 2334–43.
- Zipper H, Brunner H, *et al.* Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32 (12): e103.