



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

UCH-FC
Biotecnología
F 634d
c.1

Memoria de Título:

“DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DIAGNÓSTICO BASADO EN PCR-ELISA PARA LA DETECCIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis*”

Para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular



Alumno:

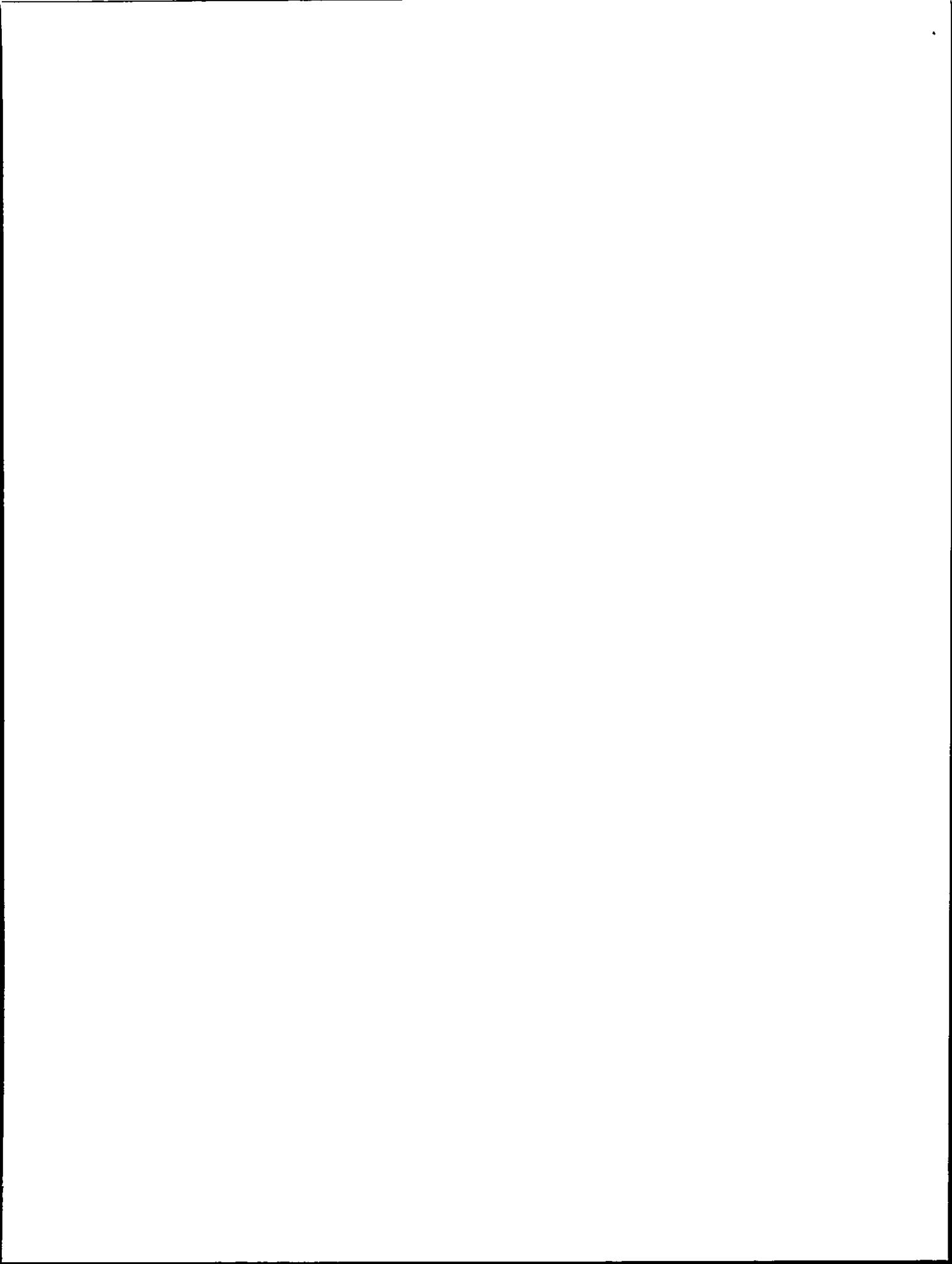
Cristian Flores Leiva

Profesor:

Dr. Luis O. Burzio 
Director Científico de BiosChile I.G.S.A. e
Investigador Instituto Milenio de Biología
Fundamental Aplicada MIFAB

Profesor Patrocinante:

Dra. María Rosa Bono



Agradecimientos.

Antes que nadie, Constanza, tú eres mi gran fuente de energía, valor y perseverancia. Te agradezco todo el cariño, amor y paciencia. Te agradezco por estar siempre en los momentos más difíciles.

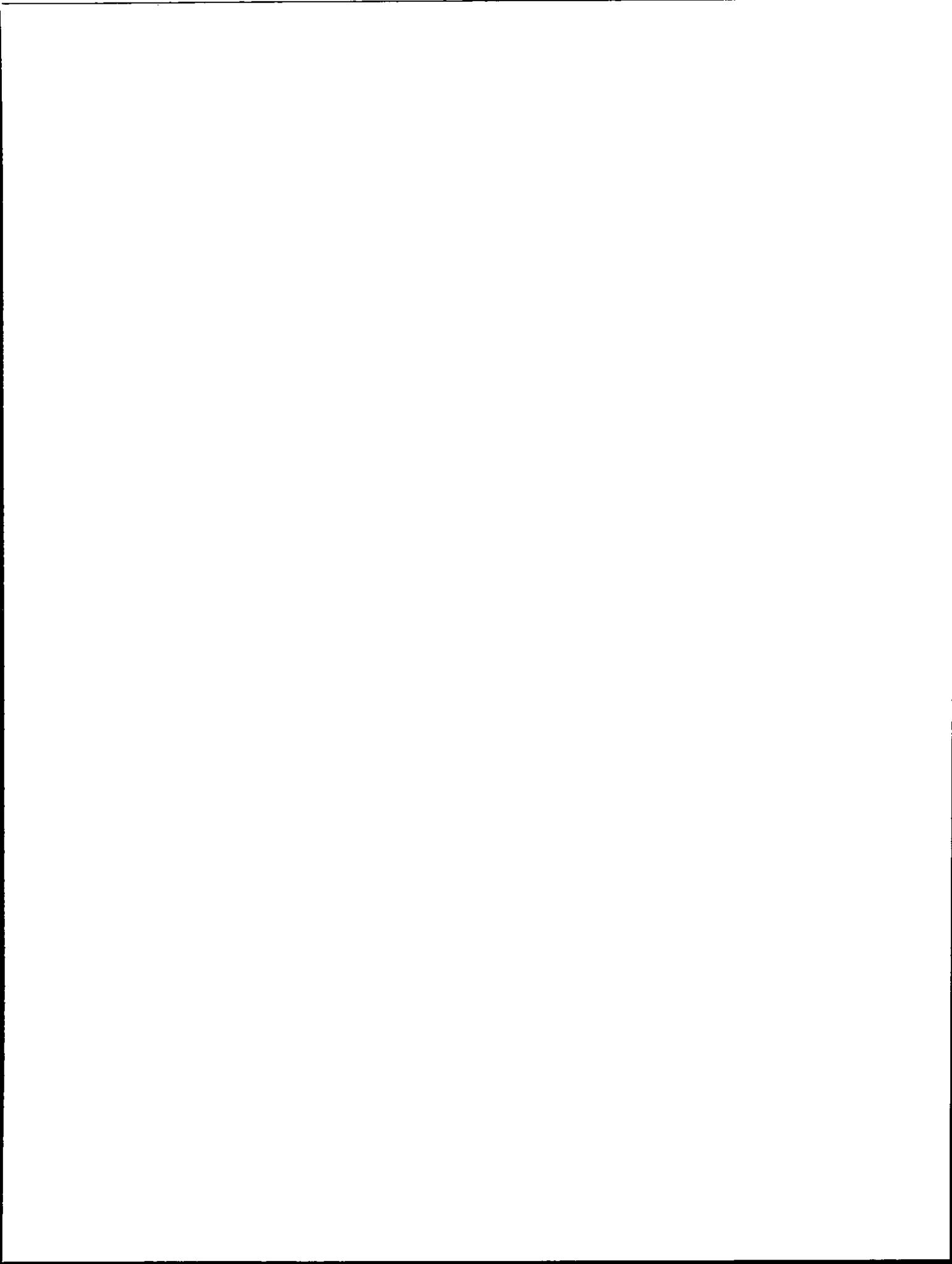
A mis padres, Norma y Rolando, por su tremendo apoyo y paciencia, por todo su cariño y amor. A mis hermanos: Paola, Evelyn e Icaro, gracias por todo.

Agradezco al Dr. Luis Burzio, por su apoyo y dirección. Al Dr. Pablo Valenzuela, por su apoyo y soporte. A Ilse Muller, Rodolfo Soto, por su ayuda y dirección en mis comienzos.

A Soledad Barros, por su apoyo, soporte y paciencia. A Victor, Toño, Julio y a todos los amigos y compañeros de BiosChile y Fundación, gracias.

Un agradecimiento especial a mis grandes amigos de Tropic of Invocation: Cristián "Krytium" Rodríguez, Limón (Limosh), Ricardo "Corpse" Marambio y Felipe "Fleshipe" Sánchez.

Y finalmente, a todo el resto de mis amigos, gracias.



Índice de materias

ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Epidemiología de la enfermedad.....	5
1.1.1. Situación Nacional.....	6
1.2. Diagnóstico de la tuberculosis.....	9
2. Objetivo General.....	13
2.1. Objetivos específicos.....	13
3.1. MATERIALES.....	14
3.1.1. Materiales para PCR.....	14
3.1.2. Materiales para la electroforesis en gel de agarosa.....	15
3.1.3. Materiales para ELISA.....	16
3.1.4. Estandarización de la concentración de formamida.....	17
3.1.5. Materiales para la construcción del control positivo de PCR.....	18
3.1.6. Ensayos de especificidad.....	18
3.1.7. Instrumentos y equipos.....	18
3.1.8. Programas computacionales.....	19
3.2. MÉTODOS.....	19
3.2.1. Extracción de ADN a partir de muestras clínicas.....	19
3.2.2. Reacción de Polimerización en Cadena (PCR)	20
3.2.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	20
3.2.4. ELISA.....	21
3.2.5. Construcción del control positivo.....	25
3.2.6. Secuenciación del fragmento IS43-IS41.....	26
3.2.7. Linearización del plasmidio recombinante con la enzima de restricción <i>Bgl II</i>	27
3.2.8. Relación entre el número de copia y la masa del control positivo.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. La Reacción de Polimerización en Cadena.....	28
4.2. Titulación de la digoxigenina-dUTP.....	29
4.3. Comparación de los tres oligonucleótidos de captura.....	31
4.4. Titulación de TBO3.....	32
4.5. Estandarización de la concentración de formamida en la solución de hibridación.....	33
4.6. Construcción del control positivo.....	35
4.7. Estudio de la capacidad de detección del test.....	36
4.8. Ensayo de la especificidad del test.....	38
4.9. Estudio de la sensibilidad del test.....	41
4.10. Ensayo de recarga de muestras de sangre y orina.....	42
5. DISCUSIÓN.....	45
5.1. Titulación de la digoxigenina-dUTP.....	45
5.2. Oligonucleótidos de captura.....	46
5.3. Titulación del oligonucleótido de captura.....	47
5.4. Efecto de la concentración de formamida en la etapa de hibridación.....	47
5.5. Control positivo.....	48
5.6. Capacidad de detección y especificidad del ensayo.....	49
5.7. Sensibilidad y evaluación de muestras.....	51
5.8. PCR-ELISA versus otros test.....	52
6. CONCLUSIONES.....	53
7. BIBLIOGRAFÍA.....	54

ABREVIATURAS

Ag	Atogrammo
B	Biotina
BCG	Bacilo de Calmette y Guerin
DATP	2'-deoxy-adenina-5'-trifosfato
DCTP	2'-deoxy-citonina-5'-trifosfato
DGTP	2'-deoxy-guanina-5'-trifosfato
dig-dUTP	Digoxigenina-11-2'-deoxy-uridina-5'-trifosfato
DTTP	2'-deoxy-timidina-5'-trifosfato
DUTP	2'-deoxy-uracilo-5'-trifosfato
EDTA	Acido etilendiamino-tetraacético
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida
fg	Femto gramo
h	Horas
I.S.P.	Instituto de Salud Pública
K _D	Constante de disociación
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mV	MiliVolts
N	Normal
ng	Nanogrammo
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción de polimerización en cadena
pH	Log 1/[H ⁺]
pmol	Picomol
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SSC	Solución de sodio citrato salino
TAE	Tampón de electroforesis Tris-acetato/EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBC	Tuberculosis
T _m	Temperatura de disolución
TM	Trade Mark
TMB	3,3', 5,5'-Tetrametil benzidina
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
UV	Ultravioleta
μM	Micromolar
μL	Microlitro

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad crónica, altamente infecciosa que ha cobrado más vidas humanas que ninguna otra enfermedad en el mundo a lo largo de la historia del hombre. El principal causante de la tuberculosis en humanos es *Mycobacterium tuberculosis*. Según una estimación hecha por la Organización Mundial de la Salud, un tercio de la población mundial está infectada por este patógeno, por lo tanto esta enfermedad todavía es de importancia global.

Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un sistema de la más alta sensibilidad para la detección colorimétrica de *M. Tuberculosis* y mucho más económico que los actualmente existentes. La tecnología elegida fue PCR-ELISA ya que de acuerdo a resultados obtenidos previamente para la detección de algunos patógenos de salmón, es altamente específica, sensible y tiene una capacidad de detección excelente. Además el resultado se obtiene en no más de 8 horas desde haber obtenido la muestra, lo que es comparable al tiempo que toman los tests actualmente desarrollados para la detección de esta enfermedad y que incorporan tecnologías tan innovadoras como esta.

En una primera etapa, la reacción de PCR se usó para amplificar un fragmento proveniente de la región IS6110 del genoma de *M. tuberculosis*. Luego, la incorporación de digoxigenina-11'-dUTP en la mezcla de reacción permitió la detección de los productos de PCR en una microplaca de ELISA. Para esto, se utilizó un oligonucleótido biotinilado en el extremo 3' que tiene la secuencia complementaria a una de las hebras del producto de amplificación, que se une a la proteína streptavidina adherida a la superficie de la placa mediante el uso de un adhesivo biológico extraído a partir de molusco. Una vez hibridado el producto de amplificación con el oligonucleótido biotinilado, se logró la detección mediante el uso de un anticuerpo antidigoxigenina conjugado a la enzima peroxidasa. Con la utilización de este sistema fue posible la detección de una copia del fragmento amplificado. Además, el método mostró un 100% de correlación con resultados obtenidos con el kit de detección de *M. Tuberculosis* TBfast® de Pharmagen S.A. en la detección de muestras doble ciego provenientes del Instituto de Salud Pública.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad crónica, altamente infecciosa que ha cobrado más vidas humanas que otras enfermedades a lo largo de la historia del hombre. Ya desde los tiempos de la antigua Grecia, en la época de Hipócrates se conocía como tisis. En el siglo XIX, Robert Koch logró cultivar y aislar el principal patógeno causante de ella y, en 1882, describió las bases de esta enfermedad ante la Sociedad Científica de Alemania (1). Este microorganismo es conocido como *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch y su tamaño puede variar entre 1 a 4 μm con forma de grano de arroz. La pared le confiere la propiedad de ser resistente a la mezcla ácido-alcohol (2, 3).

Existen varios factores que hacen de *M. tuberculosis* un organismo difícil de estudiar en el laboratorio. Primero, esta bacteria se multiplica muy lentamente, dividiéndose una vez cada 24 h y necesita un mes para formar una colonia. Además tiende a formar aglomeraciones en los medios de cultivo, lo que hace que su manipulación y conteo sea aún más difícil. Finalmente, este organismo es un patógeno muy peligroso que puede encontrarse suspendido en el ambiente en pequeñas gotitas o aerosoles formadas por la tos, el estornudo o inclusive una respiración fuerte. En estas condiciones es capaz de sobrevivir durante varios meses (2, 4).

1.1 Epidemiología de la enfermedad.

M. tuberculosis es el principal causante de la tuberculosis en humanos, pero también existen otras micobacterias a veces asociadas a esta enfermedad. Estas son, *M. bovis*, principal patógeno que produce esta enfermedad en el ganado bovino, *M. africanum* y *M. microti*, siendo los dos últimos de muy baja incidencia en los casos clínicos humanos (5, 6). Estas cuatro micobacterias forman el llamado complejo tuberculosis.

Según una estimación hecha por la Organización Mundial de la Salud (OMS), un poco más de un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* (7, 8) y cada año aparecen 8 millones de casos de tuberculosis activa. De estos, 3 millones concluyen con la

muerte del paciente, encontrándose el 95% de los casos nuevos y el 98% de los fallecimientos en países subdesarrollados. A pesar de esto, la mayoría de la gente (más del 90%) que se ha infectado con el bacilo tuberculoso nunca desarrolla la tuberculosis activa, ya que su organismo moviliza una efectiva respuesta inmune que puede controlar la infección (9), de esta forma la enfermedad permanece en forma latente o no activa (10)

A partir de 1955, con la aplicación de antibióticos como estreptomina, isoniacida y el ácido paraminosalicílico, la tuberculosis comenzó a decaer de manera importante (11). Sin embargo, la tendencia a la disminución y desaparición de la enfermedad se invirtió en la década de los ochenta a nivel mundial (12, 13). Este hecho se correlacionó con el crecimiento de la epidemia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Personas infectadas con el VIH son particularmente vulnerables a la reactivación de la tuberculosis latente, como también a desarrollar una tuberculosis activa por la infección con *M. tuberculosis* por primera vez (14). En un sujeto normal, la infección con *M. tuberculosis* gatilla la liberación por parte de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de citoquinas como el interferón- γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factores que estimulan a las células fagocitarias (monocitos), favoreciendo así la destrucción de las bacterias. De esta forma, la respuesta inmune es adecuada para controlar la enfermedad, pero en la mayoría de la gente aparentemente no es capaz de eliminar el patógeno en su totalidad (10). Esto explica que la enfermedad, en estos casos, se encuentre en forma latente. En contraste, un sujeto portador del virus VIH carece de linfocitos T CD4⁺, lo cual podría explicar la activación de la tuberculosis (10, 15).

1.1.1. Situación Nacional.

Al finalizar el año 2000, el país habría entrado en una etapa avanzada de eliminación de la tuberculosis. De acuerdo al criterio de clasificación de la OMS, del estado epidémico de la tuberculosis por país, Chile habría alcanzado el umbral de eliminación correspondiente a una tasa de 20 casos por cien mil habitantes (16). Ante esta situación, el Programa Nacional

de Control de la Tuberculosis (PCT) se plantea como objetivo mantener los esfuerzos necesarios para llegar a etapas avanzadas de la eliminación de la enfermedad, como la eliminación final o erradicación, lo que significa tasas tan bajas como 10 casos por cien mil habitantes (17). Esta postura se sustenta en tres hechos importantes:

- a. El número de personas enfermas en la población o morbilidad se encuentra en declinación sostenida. A partir de 1990 se supera la etapa de estancamiento de la disminución de la enfermedad observada en la década de los ochenta, lo que ha permitido un decrecimiento sostenido del 8% anual de la enfermedad en todas sus formas. Mientras la morbilidad en 1989 es de 52,2, llega a 22,2 por cien mil habitantes en 1999. Además, en el período de 1989 a 1998 la mortalidad desciende de 5,9 a 2,4 casos por cien mil habitantes (16, 18).
- b. Chile tiene, entre 1990 y 1998, un descenso sostenido de las tasas de tuberculosis en todas sus formas, el que alcanza una reducción aproximada de un 50% (19). Además, según el informe de la reunión regional de Directores de Control de la Tuberculosis de 1998, Chile, Cuba y Uruguay conforman un grupo especial dentro del contexto latinoamericano por su tendencia a pasar a etapas avanzadas del control de la tuberculosis (20) y en conjunto con Costa Rica y Venezuela se definieron como países de baja prevalencia de la tuberculosis.
- c. En los modelos de endemia en declinación, la morbilidad y mortalidad se desplaza progresivamente hacia edades más avanzadas y además se produce un incremento en la razón sexo masculino/femenino que contrae la enfermedad, tendencia que está ocurriendo en Chile (21).

A pesar de la favorable situación actual de Chile con respecto a la enfermedad, las tasas de morbilidad y mortalidad varían notablemente entre regiones, entre provincias e inclusive entre comunas (16). Según los informes de los Servicios de Salud a lo largo del país, en algunas comunas la incidencia es tan alta en relación con el promedio nacional, que podrían contribuir a sostener el nivel de la endemia y a retardar el proceso general de reducción de la

mortalidad. Además esta situación está ligada a sectores de bajos estratos socioeconómicos, los que son considerados como grupos de alto riesgo y su prevalencia estaría más ligada a la falta de mantención de un programa de control efectivo, que a otros problemas como la co-infección TBC/VIH o la tuberculosis multiresistente. Con respecto a lo último, según un estudio hecho en 1997, la existencia de la multiresistencia alcanza sólo al 0,4% de todos los casos diagnosticados (22), lo que indica que esto no es un problema importante para el control de la tuberculosis.

Para atacar esta situación, la OMS propone estrategias de intervención diferenciadas en materia de recursos y control, de acuerdo al grupo socioeconómico y al grado de avance de la enfermedad (16). De éstas cabe señalar el desarrollo de métodos de búsqueda activa, prevención al riesgo de multiresistencia y tratamiento adecuado de los casos presentes. En este sentido es importante señalar que la interrupción de los tratamientos con antibióticos, la falta de un control médico riguroso y efectivo, inciden directamente en la aparición de tuberculosis multiresistente (23). Además, debe estratificarse el problema de acuerdo a los niveles de riesgo y condiciones epidemiológicas, para así poder formular acciones diferenciadas como son la integración de los programas de control de la tuberculosis y del SIDA, vacunación BCG, etc.

En resumen, para disminuir las altas tasas de morbilidad en algunas zonas de Chile y además para llegar a etapas avanzadas de la eliminación de la tuberculosis, los aspectos más importantes que deben considerarse para el control de esta enfermedad son el diagnóstico, la prevención y el tratamiento, como ha sido propuesto por la OMS.

1.2. Diagnóstico de la tuberculosis

El diagnóstico clínico de la tuberculosis nunca ha sido una tarea fácil, ya que infecciones activas pueden no producir signos visibles ni síntomas. Usualmente los primeros exámenes corresponden a radiografías por rayos X y pruebas subcutáneas de reacción alérgica con un purificado de proteínas micobacteriales o PPD (derivativo de proteínas purificadas), conocido como el ensayo de la tuberculina (2, 4). Estos suelen dar las primeras pistas de la presencia de la enfermedad, pero nunca han podido usarse como pruebas definitivas. El ensayo de la tuberculina, cuyo resultado positivo es la aparición de una hinchazón de la piel en la zona de la inyección, no necesariamente indica la presencia de una tuberculosis activa. Como se basa en la reacción inmunogénica entre los anticuerpos antimicobacteria y las proteínas purificadas, las personas que hayan sido expuestas a micobacterias relacionadas o que hayan sido infectadas con alguno de los patógenos de la enfermedad, pero que son no sintomáticas, pueden dar un resultado positivo. La radiografía por rayos X sólo puede detectar la tuberculosis en estados avanzados de la enfermedad donde se observa la destrucción del tejido pulmonar; con la formación de granulomas producidos por la acumulación de células muertas y tejidos con la consistencia de queso derretido y la aparición de cavidades (24).

La examinación microscópica de tinciones de esputo, flúidos corporales, médula ósea o muestras de tejido permite obtener la primera evidencia, pero puede tener entre un 20 y 50% de falsos negativos (25). Luego, cada uno de los negativos tiene que ser confirmado por cultivo, lo que constituye la evidencia definitiva de la presencia de la enfermedad. Sin embargo, el gran inconveniente que presenta este método es que el resultado puede demorarse entre 4 a 8 semanas debido al lento crecimiento de la bacteria (5, 25).

Se han desarrollado otros procedimientos para la detección *M. tuberculosis*, los que han reducido considerablemente el tiempo de detección. En uno de ellos el crecimiento bacteriano es medido por la evolución de dióxido de carbono ^{14}C (26), lo que puede reducir el tiempo de detección a dos semanas o menos (27). Análisis cromatográfico de un aislado

de ácido micólico o el uso de sondas de ácido nucleico especie-específica pueden identificar cultivo del bacilo en sólo horas, pero desde que se colecta la muestra hasta que se obtiene el resultado se necesitan alrededor de 10 a 14 días (25).

Con el objeto de contar con ensayos de mayor sensibilidad, especificidad y con una mayor reducción de los tiempos de detección, la atención se ha centrado en tecnologías que se basan en la amplificación de ácidos nucleicos.

La reacción de amplificación en cadena o PCR fue incorporada tempranamente desde su creación en la detección de *M. tuberculosis* (28, 29, 30). Más tarde, la empresa Roche Molecular Systems desarrolló un método de detección sobre la base de PCR-ELISA, llamado comercialmente AMPLICOR MTB. Mediante partidores biotinilados específicos se amplifica una región del gen de ARN ribosomal 16S de 584 pb. Luego estos productos de PCR son inmovilizados en una microplaca por medio de oligonucleótidos unidos a la superficie. Posteriormente, se agrega el conjugado avidina-peroxidasa que reconoce el amplicón biotinilado. Finalmente, la peroxidasa cataliza la oxidación de 3,3',5,5'-tetrametibenzidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno que se manifiesta por la aparición de color. La reacción es detenida con la adición de un ácido débil (31). Con respecto al performance de este sistema, el tiempo necesario para obtener el resultado es de 8 horas aproximadamente y el límite de detección es de 800 UFC/mL de *M. tuberculosis*, lo que equivale al límite de detección del medio de cultivo. (32) La sensibilidad y la especificidad de este sistema, comparadas con el medio de cultivo son de 95% y 100%, respectivamente (31).

Por su parte, la empresa Gen-Probe, desarrolló un método innovador para la detección de la enfermedad (33), conocido comercialmente como Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test (AMTDT). Este sistema se basa en la tecnología de Amplificación Mediada por Transcripción o TMA (34), patentada por la misma empresa, en la cual a través de una amplificación isotérmica, se obtienen múltiples copias del ARN ribosomal específico de *M. tuberculosis* las que son hibridadas a una sonda de oligonucleótidos, y detectadas por medio

de quimioluminiscencia. A pesar de que este sistema reduce el tiempo de detección a 4 horas aproximadamente, la sensibilidad de este sistema es de 87.2% y la especificidad es de 70% cuando se compara con el medio de cultivo (35)

Desde la creación del AMPLICOR MTB, la tecnología del PCR-ELISA ha sido mejorada en función de su sensibilidad y límite de detección. Este es el caso del kit TBfast® (32) desarrollado por la empresa Pharma Gen S.A, España. Entre sus principales características se encuentran: el límite de detección es de 5 fg de ADN genómico, que se estudió sobre diluciones de ADN genómico de *M. tuberculosis* extraído de bacterias en cultivo. Al añadir las mismas diluciones a muestras clínicas respiratorias negativas y realizando el procedimiento de extracción de ADN del kit, el límite de detección es de 50 bacterias/mL de muestra, que es alrededor de 20 veces menos que el del medio de cultivo. La sensibilidad es de 100% y la especificidad es de 88% (32).

A partir de 1998, BiosChile I.G.S.A., en conjunto con Fundación Ciencia para la Vida, desarrollaron un procedimiento de PCR-ELISA como método de diagnóstico de rutina. De los estudios realizados se obtuvo un método de diagnóstico para la detección del patógeno de salmón *Piscirickettsia salmonis* (36). Posteriormente, y en conjunto con Fundación Chile, se desarrolló un ensayo de PCR-ELISA para la detección del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa de salmón (IPNV), el cual dio origen a un producto de diagnóstico comercializado como IPNV-Genotest I (37) Ambos métodos tienen un 100% de sensibilidad y un 100% de especificidad, además de una capacidad de detección de 1 a 2 células bacterianas o partículas virales, respectivamente.

Como objetivo de la presente memoria de título se planteó el desarrollo de un sistema de diagnóstico para la detección de *M. tuberculosis* mediante PCR-ELISA con una alta sensibilidad, especificidad y capacidad de detección. Para lograr este objetivo se tomaron como modelo los procedimientos utilizados en el montaje del PCR-ELISA desarrollado para la detección de *P. Salmonis*, debido a la alta especificidad y sensibilidad alcanzadas (36). Se

decidió utilizar los partidores IS43 e IS41 que amplifican un fragmento de 316 pares de bases perteneciente a la secuencia de inserción IS6110 de *M. tuberculosis*, que ha sido utilizada como marcador de polimorfismo genético (40, 41). Esto permitiría discriminar a los patógenos que conforman el complejo tuberculosis de las micobacterias no relacionadas a la enfermedad (42). Además esta secuencia de inserción se presenta en el genoma del patógeno, en un número de copias que varían entre 10 a 20, lo que permitiría una mayor capacidad de detección de las bacterias, ya que por cada una de ellas, existe una mayor cantidad de ADN templado para la reacción de PCR. Para la etapa de amplificación, se utilizó el procedimiento desarrollado para *P. Salmonis* (36), cuya mayor ventaja es el uso de bajas cantidades de digoxigenina-11-dUTP (1 a 5 μM) lo que se traduce en costos más bajos para el ensayo. En la etapa de detección del amplicón, se utilizó la unión de estreptavidina a una placa de ELISA previamente recubierta con la proteína polifenólica aislada del molusco bivalvo *Aulacomya ater* y conocida como Pegotina (38). Esta estrategia no sólo se traduce en una inmovilización más eficiente de la streptavidina sino que además confiere a la proteína una mayor estabilidad frente a condiciones de temperatura y fuerza iónica más estrictas, lo que favorecería la especificidad del ensayo en la etapa de captura del amplicón (39).

2. OBJETIVO GENERAL

Desarrollo de un sistema de diagnóstico basado en PCR-ELISA para la detección de la Tuberculosis en forma rápida, específica y altamente sensible.

2.1. Objetivos específicos

1. Desarrollo de una reacción de PCR específica para *M. tuberculosis*.
2. Obtención de un control positivo para PCR y ELISA.
3. Diseño de un oligonucleótido de anclaje adecuado para PCR-ELISA.
4. Montaje y estandarización del PCR-ELISA.
5. Estudiar la especificidad del test.
6. Estudiar la sensibilidad del test en comparación con el kit TBfast[®].
7. Pruebas de campo: utilización del sistema de PCR-ELISA en muestras clínicas de pacientes sanos y con tuberculosis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Materiales para PCR

3.1.1.1. Materiales Biológicos

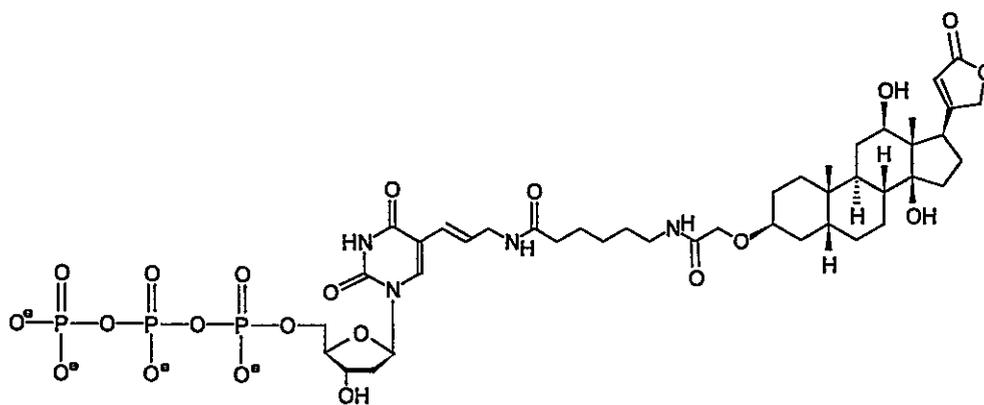
ADN de *M. Tuberculosis*, aislado con anterioridad mediante extracción fenólica, fue obtenido del Centro de Diagnóstico Molecular de BiosChile I.G.S.A. Muestras humanas de orina y sangre fueron obtenidas del Centro de Diagnóstico Molecular de BiosChile I.G.S.A. Muestras problemas fueron obtenidas gracias a la gentileza del Dr. Winston Andrade Lillo del Instituto de Salud Pública (ISP).

3.1.1.2. Reactivos y Soluciones

El tampón de PCR, cloruro de magnesio, dNTP's, *Taq* DNA polimerasa fueron de Gibco BRL/Life Technologies Rockville MD, USA.

Los partidores IS43 (5'TCAGCCGCGTCCACGCCGCCA 3') e IS41 (3'GGCTGCGGATGCGAGCGTCC 5') (36) fueron sintetizados en Chiron Corp. Emeryville, California, USA y en el Centro de Síntesis de la Universidad de Chile.

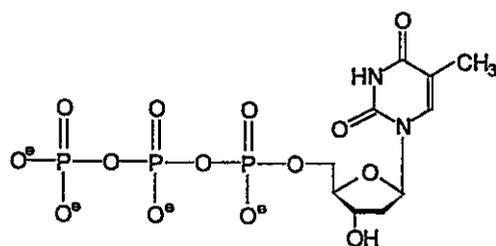
En los ensayos de PCR-ELISA se utilizó digoxigenina, compuesto químico necesario para determinar el producto de amplificación de PCR mediante el ELISA de captura. Este compuesto de naturaleza esteroidal es unido covalentemente a dUTP (digoxigenina-11-dUTP, figura 1), lo que permite incorporarlo en el producto de amplificación, conjuntamente con los otros nucleótidos.



x 4 Li⁺

Peso Molecular: 1090,7

Figura 1. Estructura de la digoxigenina-11-2'-desoxy-uridina-5'-trifosfato



x 4 Li⁺

Peso Molecular: 505,9

Figura 2. Estructura de la 2'-desoxy-timidina-5'-trifosfato

3.1.2. Materiales para la electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó agarosa de Sigma Chemical Co., St Luis, USA, ADN estándar de 100 pb en escalera que fue obtenido de Gibco Life Technologies, Rockville, MD, USA, film Polaroid polapan 667 que fue adquirido de Polaroid Cambridge, MA, USA. El buffer de corrida contiene 20% v/v de glicerol, 25 mM EDTA, 0,1% de azul de bromofenol, 0,1% de sarcosil (pH 8,0). El bromuro de etidio se obtuvo de Sigma Chemical Co., St Luis, USA.

3.1.3. Materiales para ELISA

Para el ELISA se utilizaron microplacas de ELISA Polysorp™ de 96 pocillos (Nalge Nunc INTL. Illinois, USA), proteína polifenólica Pegotina (BiosChile I.G.S.A.), streptavidina (Gibco Life Technologies). Mediante el uso del programa OLIGO 4.1 (ver punto 3.1.8), página 19), se diseñaron 3 oligonucleótidos de 25 nucleótidos y con un contenido de G + C de alrededor de un 60%, para la etapa captura del ELISA. Además se escogió usar oligonucleótidos biotinilados en el extremo 3' para capturar una de las hebras del fragmento IS43-IS41 amplificado por PCR (figura3).

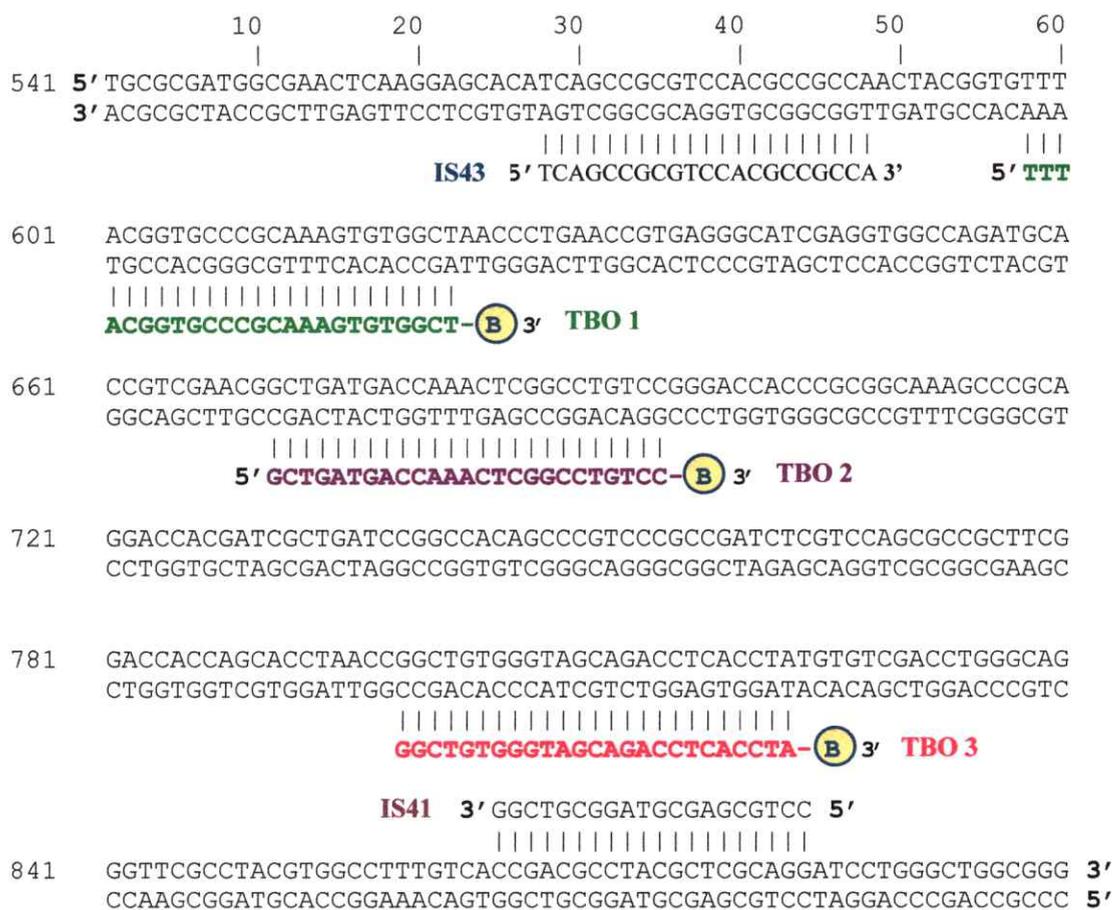


Figura 3. Ubicación de los partidores y de los oligonucleótidos de captura en la secuencia de inserción IS6110. La letra B se refiere a la biotina en la posición 3'.

Estos fueron sintetizados en Chiron Corporation Emeryville, California, USA y en Operon Technologies, Inc. California, USA.

Las soluciones utilizadas fueron: PBS 1x sin sales de potasio (15 mM NaH₂PO₄ • H₂O, 150 mM NaCl, pH 7,5); solución de bloqueo (Caseína de sodio 2%, sacarosa 2%, EDTA 0,5 mM, Tween 20 0,05%); solución Denhart 50x (5g Ficoll Type400, 5g polyvinilpirrolidona, 5 g de suero de albúmina de bovino y H₂O hasta 500 mL); SSC 20x (3 M NaCl, 300 mM citrato de sodio • 2 H₂O, pH 7,0), solución de hibridación (5 a 40% de formamida, 4x SSC, 1x de solución Denhart, 100 µg/mL de tARN de levadura, sulfato de dextrano 10%, EDTA 2 mM pH 8,0); solución de lavado post-hibridación (SSC 0,2x, Tween 20 0,05%), solución de dilución de conjugado (caseína de sodio 2%, sacarosa 2%), solución de lavado post-conjugado (PBS 1x, Tween 20 0,05%). Para la detección de la digoxigenina se utilizó un fragmento Fab antidigoxigenina conjugado con peroxidasa obtenido de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania. Los sustratos de la peroxidasa son 3,3', 5,5'-tetrametil benzidina (TMB) y H₂O₂ fueron obtenidos de los Laboratorios Kirkegaard Perry, Gaitherburg, Maryland, USA.

3.1.4. Estandarización de la concentración de formamida.

En este ensayo se utilizó rDNA mitocondrial de ratón de 16S para incorporarlo como templado de la reacción de PCR y obtener un fragmento de 439 pares de bases. En la figura 4 se muestra la secuencia del amplicón del gen 16S mitocondrial.

```

541 AGTTTAGATT ATAGCCAAAA GAGGGACAGC TCTTCTGGAA CGGAAAAAAC CTTTAATAGT
601 GAATAATTAA CAAAACAGCT TTTAACCATT GTAGGCCTAA AAGCAGCCAC CAATAAAGAA
      sentido 5' GTAGGCCTAA AAGCAGCCAC CAA 3'

661 AGCGTTCAAG CTCAACATAA AATTTCAATT AATTCCATAA TTTACACCAA CTTCCTAAAC
721 TTAAAATTGG GTTAATCTAT AACTTTATAG ATGCAACACT GTTAGTATGA GTAACAAGAA
781 TTCCAATTCT CCAGACATAC GCGTATAACA ACTCGGATAA CCATTGTTAG TTAATCAGAC
841 TATAGGCAAT AATCACACTA TAAATAATCC ACCTATAACT TCTCTGTTAA CCCAACACCG
901 GAATGCCTAA AGGAAAAGATC CAAAAGATA AAAGGAACTC GGCAAACAAG AACCCCGCCT
961 GTTTACCAA AACATCACCT CTAGCATTAC AAGTATTAGA GGCCTGCCT GCCCAGTGAC
1021 TAAAGTTTAA CGGCCGCGGT ATCCTGACCG TGCAAAGGTA GCATAATCAC TTGTTCTTTA
      3' TGGC ACGTTTCCAT CGTATTAGT 5'
      antisentido
1081 ATTAGGGACT AGCATGAACG GCTAAACGAG GGTCCAACCTG TCTCTTATCT TTAATCAGTG

```

Figura 4. Fragmento de 16S mitocondrial de ratón. El fragmento de 439 pb delimitado por los partidores sentido y antisentido entre la posición 631 y 1069 del gen de 16S mitocondrial de ratón, se utilizó como control negativo para el ensayo de estandarización de la formamida.

3.1.5. Materiales para la construcción del control positivo de PCR

3.1.5.1 Materiales biológicos

Se utilizaron células competentes de *Escherichia coli* de la cepa JM109 obtenidos del laboratorio de Biología Molecular de la Dra. María Inés Vera de la Universidad Nacional Andrés Bello. Se utilizó el vector de clonamiento pCR[®] 2.1 del Kit TA Cloning[®] (Invitrogen, California, USA).

3.1.5.2. Reactivos y soluciones.

La preparación de ADN de plasmidios se realizó usando el Kit de purificación plasmidial Qiagen tipo Maxiprep (Qiagen Inc., California, USA). Para el crecimiento de los clones se utilizó medio Luria-Bertani (LB, 1% bacto-triptona, 0,5% extracto bacto-levadura, 1% NaCl, pH 7.0).

Para determinar la presencia de colonias transformantes, se utilizó Isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil β -D-tiogalactopiranosido (X-Gal), Sigma Chemical Co. St Luis, USA.

3.1.6. Ensayos de especificidad.

Con este fin, se utilizó ADN extraído a partir de células polimorfonucleares de plasma de pacientes con carga viral positiva de VIH en estado de provirus; ADN de virus de Hepatitis B; ARN de virus de Hepatitis C; ADN de *Helicobacter pylori* (gentileza del Centro de Diagnóstico Molecular de BiosChile I.G.S.A.). Los ADN extraídos a partir de *Salmonella sp.* (aislada a partir de pollo), *Salmonella sp.* (aislada a partir de yema de huevo), *Proteus vulgaris*, *Vibrio sp.* (V57 98); *Yersinia sp.*, *Pseudomonas putida*, *P. versicularis*, *P. malei*, *P. diminuta*, *Alteromonas sp.*, *Aeromonas salmonicida*, fueron obtenidos de Fundación Ciencia para la Vida.

3.1.7. Instrumentos y equipos

Se utilizaron los siguientes instrumentos y equipos: termociclador programable PTC 200 MJ Research Inc., vortex Fischer Genie 2 G-650, centrifuga Eppendorf 5415 C, fuente de poder

Biorad powerpack 200, cámaras de electroforesis DNA Plus USA Scientific, balanza analítica AA-160 Denver Instruments Company, horno de hibridación PersonalHyb[®] Stratagene, estufa de incubación Memmert tipo BM300, freezers de -20°C y -80°C , lector de microplacas de ELISA Tibertec Multiscan Plus MK II Labssystem, espectrofotómetro Shimadzu UV-160^a, campana de bioseguridad Factomet modelo BS 24242, centrífuga Beckan-Dickinson, transiluminador Foto/Phoresis I, cámara Fotodyne Polaroid Copal.

3.1.8. Programas computacionales.

OLIGO 4.1 Primer Analisis Software, National Biosciences, Inc. USA

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre y orina.

Se desarrolló un método de extracción de ADN a partir de muestras de sangre y orina, con la finalidad de obtener el ADN de manera rápida y sencilla. Este método se describe a continuación: cada muestra se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Al pellet que contiene las células, se le agregó 1 mL de agua milliQ y se invirtió el tubo varias veces hasta obtener homogeneidad. Luego se centrifugó durante 10 min en las condiciones descritas y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 50 μL de NaOH 0,2N y se incubó a 70°C durante 30 min. Después se agregó 12 μL de Tris-HCl 1,64 mM y 5 μL de HCl 2N para neutralizar la base. El lisado preparado de la forma descrita se guardó a -20°C .

Alternativamente, se utilizó el sistema de purificación de ADN del kit TBfast[®] de PharmaGen S.A., Madrid, España. Una vez agregado el Tris-HCl y el HCl, se agregó 1 mL de Resina de Purificación, se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. El contenido del tubo se transfirió a una jeringa de 3 cc (Temuro Medical Corporation, USA) que tenía unida en su extremo una columna de purificación de ADN. Después de presionar el émbolo de la jeringa, el material eluido se descartó. Luego se

lavó la columna con 2 mL de Solución de Lavado de Columnas y se colocó en un tubo Eppendorf nuevo. Se centrifugó durante 5 min a 14.000 rpm. Nuevamente se colocó la columna en un tubo Eppendorf estéril, se agregó 50 μ L de agua estéril y se incubó por 5 min. para permitir que el ADN fuera liberado de la resina. Finalmente se centrifugó a 14.000 rpm por 2 min. y se guardó el eluido a 4°C o -20°C hasta su utilización en la PCR.

3.2.2. Reacción de Polimerización en Cadena (PCR).

La amplificación por PCR de la secuencia IS6110 de 316pb de *M. tuberculosis* con los partidores IS43-IS41 (figura 3) se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: en un volumen final de 50 μ L se preparó una mezcla de PCR al agregar tampón de PCR 1x, 1,50 mM de $MgCl_2$, 0,20 mM de dATP, dCTP, dGTP, 0,049 mM de dTTP, 0,001 mM de dig-dUTP, 0,20 μ M de cada partidor y 2,50 unidades de *Taq* DNA polimerasa. A esta mezcla se le agregó 0,1 ng de ADN de control positivo para evaluar la amplificación, 5 μ L de ADN de muestras clínicas o 5 μ L de H₂O como control negativo sin templado.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador PCT 200 MJ Research que se programó como sigue: 5 minutos a 95°C para la desnaturación inicial, 1 minuto a 94°C para la etapa de desnaturación de cada ciclo, 1,5 minutos a 72°C para la etapa de alineamiento de los partidores y para la etapa de extensión, por un total de 30 ciclos. Finalmente se programó una extensión final de 10 min a 72°C. Después de la PCR los tubos se guardaron a -20°C hasta su uso.

3.2.3. Electroforesis en geles de agarosa.

Los geles de agarosa se prepararon disolviendo 2 g de agarosa en 100 mL de Buffer TAE 1x a 80°C. Luego a 100 mL de esta solución se le agregó 10 μ L de bromuro de etidio de 100 μ g/mL y se colocó en la bandeja de la cámara de electroforesis. Una vez gelificado, se agregó 8 μ L del ADN estándar de 100 pb en escalera (100 ng/ μ L), 10 μ L del ADN obtenido mediante PCR y 10 μ L del control negativo de PCR sin ADN templado. La electroforesis se

realizó aplicando un campo eléctrico de 65 mV durante 90 min. Finalmente, el gel de agarosa se fotografió con la cámara Fotodyne de Polaroid sobre un transiluminador.

3.2.4. ELISA

Las microplacas de ELISA se incubaron con 100 μL de una solución 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína polifenólica (38) en ácido acético 0,1% y CuSO_4 1 mM. Después de incubar por 20 min a temperatura ambiente, se eliminó el contenido de las microplacas y se secaron a 37°C durante 30 a 60 min. Se agregaron 100 μL de una solución de streptavidina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1x a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a 37°C. Después de esto se lavaron los pocillos con 200 μL de PBS y se secaron. Posteriormente se agregaron 300 μL de solución de bloqueo y se incubaron por 1 h a 37°C. Se eliminó el contenido de cada pocillo de la microplaca y se secó a 37°C por 1 h, para luego guardar las microplacas a 4°C hasta su uso.

A cada pocillo se agregaron 100 μL de solución de oligonucleótido de captura marcado con biotina 10 pmol/mL en PBS, se incubó a temperatura ambiente por 20 min, se agregó 200 μL de PBS y la mezcla se eliminó totalmente. En forma paralela, se tomaron 15 μL de producto de PCR, se mezclaron con 85 μL de solución de hibridación (5% de formamida, 4x SSC, 1x de solución Denhart, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tARN de levadura, sulfato de dextrano 10%, EDTA 2 mM pH 8.0), para luego incubar a 100°C durante 10 min. Inmediatamente los tubos se colocaron en hielo durante 3 min, se agitaron en vortex por 5 s y se centrifugaron durante 10 s a 14.000 rpm para recuperar la totalidad del volumen en el fondo del tubo.

Se agregó 100 μL de la mezcla anterior a cada pocillo de la microplaca de ELISA y se incubó a 50°C durante 1 h. Se descartó el contenido y se lavó con 300 μL de solución de lavado post-hibridación (SSC 0.2x, Tween 20 0.05%) durante 5 min a temperatura ambiente, seguido de un segundo lavado con la misma solución pero realizado a 50°C durante 5 min, para mantener las estringencia del sistema, disminuyendo al máximo posibles apareamientos inespecíficos. Finalmente la placa se lavó nuevamente con la solución descrita y a temperatura ambiente. Posteriormente se secó la placa rigurosamente, se agregó 100 μL del

conjugado anti-digoxigenina-peroxidasa diluido 1:1000 con solución de dilución de conjugado (caseína de sodio 2%, sacarosa 2%) y se incubó a 37°C durante 30 min. Después de esto, se lavó 4 veces con 300µL de solución de lavado post-conjugado (PBS 1x, Tween 20 0,05%) a temperatura ambiente. Luego se agregó a cada pocillo de la microplaca 50 µL de TMB y 50 µL de H₂O₂ y se incubó en oscuridad durante 15 min. Finalmente se agregó 100 µL de H₂SO₄ 3 N a cada pocillo y se determinó la absorbancia a 450 nm (ver figura 5 A y B). Como control negativo de ELISA, se utilizó pocillos a los que no se les agregó producto de PCR y sólo solución de hibridación (100 µL). Además, como control negativo de los ensayos de estudio de los oligonucleótidos de captura, se utilizó pocillos en los que se les agregó sólo PBS 1X (100 µL).

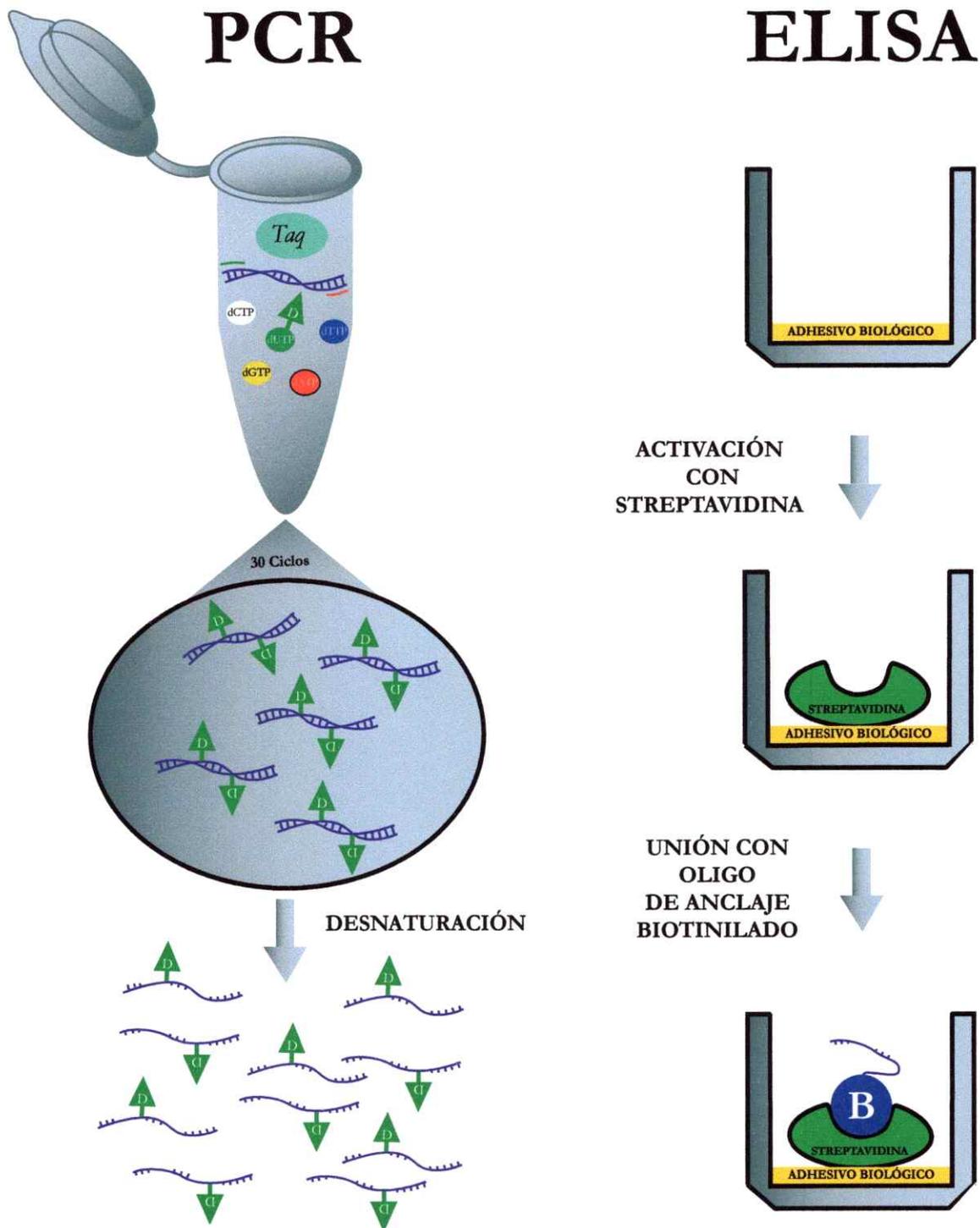


Figura 5 A. PCR-ELISA. La amplificación del fragmento de 316 pb de la secuencia de inserción IS6110 mediante PCR permite incorporar en el producto resultante, digoxigenina-11'-dUTP. En forma paralela la activación de una microplaca de ELISA con streptavidina, permite el anclaje de un oligonucleótido de 23 bases, biotinilado en el extremo 3', debido a la alta afinidad entre biotina y streptavidina. En la figura *Taq* representa la enzima *Taq* polimerasa, D representa digoxigenina-11'-dUTP y B representa biotina.

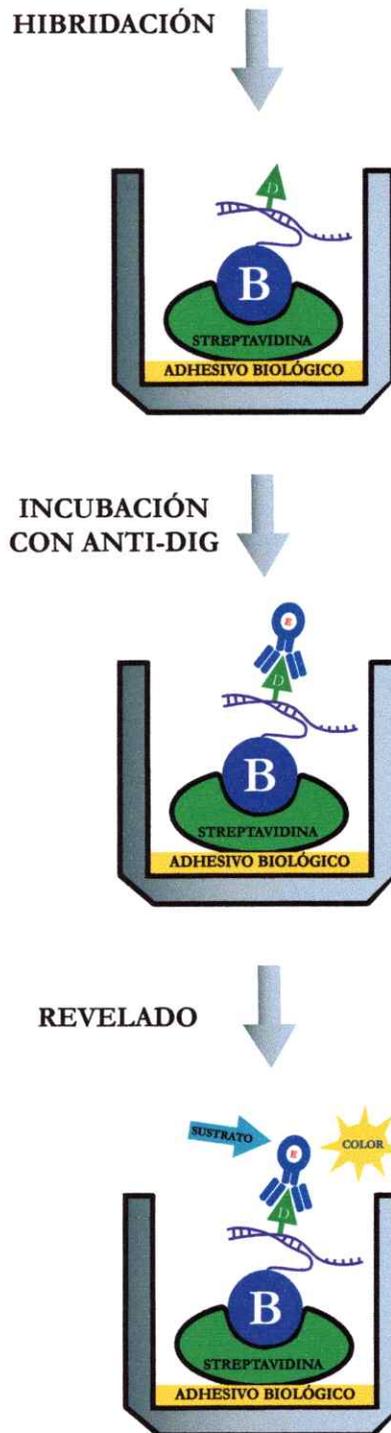


Figura 5 B. PCR-ELISA (Continuación). En una etapa posterior, el oligonucleótido es hibridado a una de las hebras del fragmento de 316 pb debido a la complementariedad entre ambos. Esto permite la captura del producto de amplificación en forma específica. Finalmente, al agregar un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con la enzima peroxidasa, se produce una reacción colorimétrica, sólo en presencia del producto de amplificación.

3.2.5. Construcción del control positivo

La secuencia IS6110 de *M. tuberculosis* se amplificó por PCR como se describió anteriormente pero sin digoxigenina-11-dUTP. El producto de amplificación obtenido se ligó al plásmido pCR 2.1™ del kit TA Cloning®. Esta reacción es posible debido a que durante la PCR, la enzima *Taq* polimerasa incorpora en cada extremo 3' de los productos de amplificación una desoxyadenosina. Esta base es complementaria a la timidina desapareada presente en cada extremo 3' del plásmido pCR 2.1 linearizado, por lo tanto la utilización de la enzima T4 DNA ligasa, permite la ligación del producto de PCR con el plásmido. De acuerdo a las especificaciones del kit TA cloning, 3 µL del producto de PCR se mezclaron con 1 µL de tampón de ligación 10X, 2 µL del plásmido pCR 2.1 (25 ng/µL), 1 µL de T4 DNA ligasa (4 unidades Weiss) y 3 µL de agua estéril. Esta mezcla se incubó a 14 °C durante 16 h. Luego, el producto de ligación, se utilizó para la transformación de células de *E. coli* cepa JM109. Para ello 100 µL de células competentes recién descongeladas se mezclaron con 4 µL de la mezcla de reacción de ligación y la mezcla se incubó en hielo por 30 min. Se dió un shock térmico a 42°C por 30 s y se dejó en hielo por 2 min. A esta mezcla se agregaron 500 µL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y se incubó a 37°C por 1 h, con una agitación de 225 rpm y posteriormente se dejó en hielo. Se tomaron 100 a 200 µL de esta mezcla y se esparcieron sobre placas con medio LB sólido, 5 µL de IPTG 840 mM y 80 µL de X-Gal 20 mg/mL. Después de esto, las placas se incubaron a 37°C toda la noche. Finalmente se trasladaron a 4°C por 2 h para permitir el desarrollo de color apropiado.

Para confirmar la presencia del inserto correspondiente en las colonias blancas se tomó con un asa una muestra de ellas y se agregaron a un tubo eppendorf de 500 µL que contenía 50 µL de una mezcla de PCR (43) como la que se describió más arriba, pero sin la incorporación de digoxigenina-dUTP y con la misma concentración de dTTP que el resto de los dNTP's. Una vez concluida la reacción de PCR, se tomaron 10 µL de la mezcla resultante y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las colonias con el inserto

correspondiente, se trasladaron a placas de agar con medio LB mas ampicilina 100 µg/mL y se incubaron a 37 °C por 16 h. Estas colonias se guardaron a 4 °C para su posterior uso y extracción del ADN plasmidial. El ADN plasmidial se preparó a partir de cultivos de 5 mL en medio líquido LB mas ampicilina (Miniprep) o en volúmenes mayores (Maxiprep). El ADN plasmidial se purificó utilizando el procedimiento de Qiagen, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez obtenido el ADN plasmidial purificado se guardó a -80 °C hasta su utilización como control positivo del ensayo de PCR-ELISA. Hay que hacer notar que la amplificación del elemento IS6110, el clonamiento en el vector pCR 2.1, la transformación de las células competentes JM109 y la miniprep se realizaron en el laboratorio de la Dra. María Inés Vera de la Universidad Nacional Andrés Bello. La maxiprep se realizó en el laboratorio de la Dra. Rosalba Lagos y en el laboratorio del Dr. Carlos Jerez de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Esto con el objeto de eliminar posibles contaminaciones con bacterias transformadas o con productos del ADN plasmidial en el laboratorio, lo cual podría traducirse en serios problemas de especificidad del ensayo de PCR-ELISA.

3.2.6. Secuenciación del fragmento IS43-IS41.

Para obtener la secuencia del fragmento IS43-IS41, 500 ng del control positivo se enviaron al Centro de Diagnóstico Molecular de BiosChile. El procedimiento realizado fue el siguiente: en un volumen final de 20 µL, el ADN templado se amplificó con los partidores M13 sentido y antisentido (3 pmoles/uL), en presencia de dNTP y didesoxinucleótidos marcados con moléculas fluorescentes (44), durante 25 ciclos de 95°C por 10 s y 60°C por 4 min. Luego se realizó una precipitación diferencial con isopropanol al 60% en ausencia de luz y centrifugación a 14.000 rpm por 15 min. Se descartó el sobrenadante. Después se agregó isopropanol al 75%, se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante para eliminar los didesoxinucleótidos en exceso. Finalmente, se resuspendieron los productos de la amplificación en buffer de carga y se realizó una

electroforesis capilar en un equipo ABI Prism 310 Genetic Analyzer. El resultado fue obtenido y procesado mediante el programa Sequence Analysis en un computador PowerG3 de Macintosh.

3.2.7. Linearización del plasmidio recombinante con la enzima de restricción *Bgl II*

Con el objeto de linearizar el plasmidio recombinante, se preparó una mezcla de reacción de 10 μL de volumen total que contenía 1 μL de tampón de reacción 10X, 2 μL de ADN plasmidial recombinante ($\sim 1 \mu\text{g}$), 6 μL de H_2O y 1 μL de enzima de restricción *Bgl II*. La mezcla se incubó durante toda la noche a 37°C y posteriormente se incubó a 70°C durante 10 min para inactivar la enzima de restricción. Luego se tomó 1 μL de la mezcla y se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El plásmido resultante se utilizó como templado en la reacción de PCR.

3.2.8. Relación entre el número de copia y la masa del control positivo

Para caracterizar el estudio de la capacidad de detección del PCR-ELISA desarrollado, fue necesario realizar la determinación del número de copias correspondientes a una masa determinada del control positivo. Para este fin, se tomaron en cuenta dos consideraciones iniciales. La primera es que la masa promedio de un par de bases es de 678 g/mol (45), y la segunda es que el tamaño total del control positivo construido es de aproximadamente 4200 pares de bases. A partir de esto, se puede decir que la masa total del control positivo es de $2,8 \times 10^{21}$ femto gramos por mol de moléculas de ADN.

La secuenciación del control positivo mostró que por cada unidad del plasmidio recombinante existe una única copia del fragmento de 316 pb IS43-IS41 (ver Resultados, página 36). Por lo tanto, por cada mol de moléculas del control positivo existen $6,02 \times 10^{23}$ copias del fragmento IS43-IS41. Lo que está contenido en una masa total del plasmidio recombinante de $2,8 \times 10^6 \text{ g}$ o $2,8 \times 10^{21} \text{ fg}$ de ADN. De esto se puede deducir fácilmente que una copia de control positivo que contiene una copia del fragmento de 316 pb, corresponde a 4,6 ag de ese ADN.

4. RESULTADOS

4.1. La Reacción de Polimerización en Cadena.

Las condiciones en que se realizó la reacción de PCR (Métodos, página 20) resultaron ser óptimas para la obtención de productos de amplificación a partir del ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*. Como se muestra en la Figura 6, se obtuvo una banda de tamaño esperado de 316 pb que representa la amplificación del segmento delimitado por los partidores IS43 e IS41 de la secuencia de inserción IS6110 de la bacteria (ver figura 3, página 15).



Figura 6. Productos de PCR de 316 pb resultantes de la amplificación a partir del ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* y de los partidores IS43 e IS41. El gel de agarosa al 2% muestra la banda de tamaño esperado de 316 pb. Carril 1. ADN estándar en escalera de 100 pb, Carriles 2. Productos de PCR de 316 pb.

4.2. Titulación de la digoxigenina-dUTP

Una vez optimizadas las condiciones de amplificación del fragmento de 316 pb, se procedió a determinar las concentraciones de digoxigenina-11-dUTP que dieran una respuesta óptima en el ELISA. Esta es una etapa importante del desarrollo del ensayo ya que la dig-dUTP es uno de los reactivos de mayor costo de este test. Por lo tanto fue muy importante determinar la concentración mínima que podría ser usada, sin afectar la capacidad de detección del sistema. Se utilizaron las siguientes razones de dTTP/dig-dUTP para la amplificación de 10ng de ADN: 200/0 μ M, 49/1 μ M, 47,5/2,5 μ M, 45/5 μ M, 95/5 μ M y 190/10 μ M. La concentración de los otros dNTPs fue de 200 μ M.

El análisis de los geles de agarosa al 2% reveló que existe un mayor retraso en la migración de los productos de PCR resultante del aumento de tamaño del fragmento (figura 7), ya que a medida que aumenta la razón dTTP/dig-dUTP existe un mayor número de residuos de digoxigenina en ese fragmento. Cabe recordar que la digoxigenina-11'-dUTP tiene un peso molecular mayor, comparado con el del dTTP (ver figura 1 y 2, página 14). No obstante, lo anterior no alteró la intensidad de las bandas indicando que las reacciones de amplificación y la incorporación de dig-dUTP fueron igualmente eficientes para cada razón utilizada.

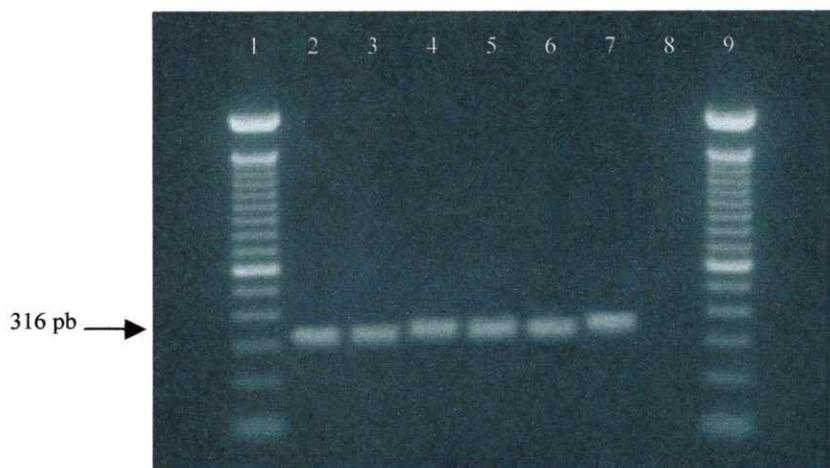


Figura 7. Incorporación de Digoxigenina-dUTP. Gel de agarosa al 2% que muestra la amplificación por PCR del ADN de *M. tuberculosis* con los partidores IS41-IS43 y con diferentes razones dTTP:dig-dUTP, en μ M. En cada carril se colocó 10 μ L de producto de PCR. **Carriles 1 y 9**, ADN estándar de 100 pb en escalera, **2**, 200:0; **3**, 49:1; **4**, 47,5:2,5; **5**, 95:5; **6**, 190:10; **7**, 45:5; **8**, Control negativo, mezcla de reacción sin ADN templado y una proporción de dTTP:dig-dUTP de 95:5.

Para el ensayo de ELISA de captura, las razones de dTTP/dig-dUTP fueron las mismas utilizadas en los experimentos que se muestran en la Figura 4. Después de la amplificación los productos de PCR se diluyeron 250 veces y 15 μ L se aplicaron a cada pocillo en cuadruplicado (ver Métodos). Como se observa en la Figura 8, hay un aumento de la lectura a 450 nm proporcional al aumento de la razón digoxigenina-11-dUTP. A pesar de que la lectura con la razón 49:1 fue menor que las otras proporciones, hay que considerar que el tiempo de revelado fue sólo de 7,5 min. En los estudios que se muestran a continuación se utilizó la razón 49:1 y un tiempo de revelado con los sustratos de la peroxidasa de 30 min.

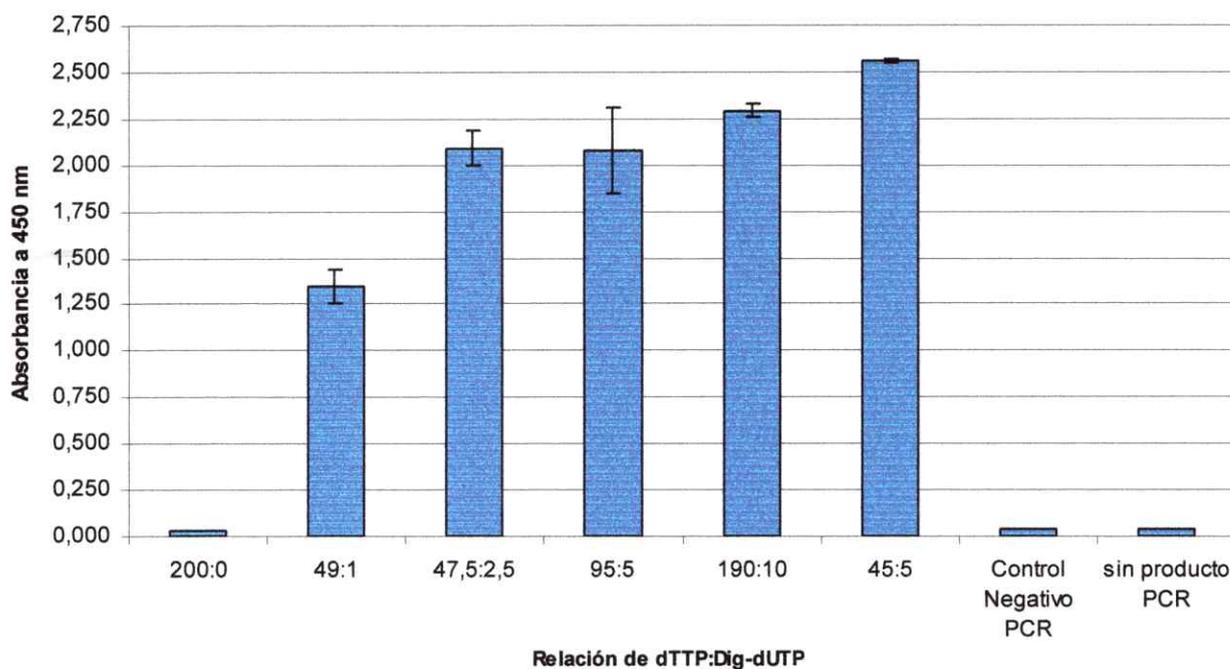


Figura 8. Resultado del PCR-ELISA, tomando los productos de PCR mencionados en la figura 6. Tiempo de revelado 7,5 min. **Control Negativo PCR** significa que el producto de PCR tomado no tiene ADN de TBC, y **sin producto PCR** significa que al pocillo sólo se le agregó solución de hibridación.

Los resultados anteriores nos permitieron optimizar las condiciones de la etapa de amplificación respecto a la temperatura de apareamiento, la concentración de los partidores, número de ciclos y tiempo de desnaturalización, apareamiento y extensión, como se describió en Métodos. La etapa siguiente fue determinar cómo la razón dTTP/dig-dUTP afecta la

determinación de la cantidad de productos de amplificación mediante un ensayo de ELISA. Previamente se había determinado las concentraciones más efectivas del oligonucleótido de captura, la concentración de formamida, las diluciones del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa, y los tiempos de incubación de cada etapa (ver más adelante).

4.3. Comparación de los tres oligonucleótidos de captura

Para comparar la eficiencia de los oligonucleótidos TBO1, TBO2 y TBO3 en la etapa de captura, los pocillos se activaron con 1 pmol de cada uno de ellos por separado y el ELISA se ensayó con 15 μ L del producto de PCR previamente diluido 1/500. En la Figura 9 se observa que la absorbancia obtenida a 450 nm de los 3 oligonucleótidos no muestra una diferencia significativa entre ellos.

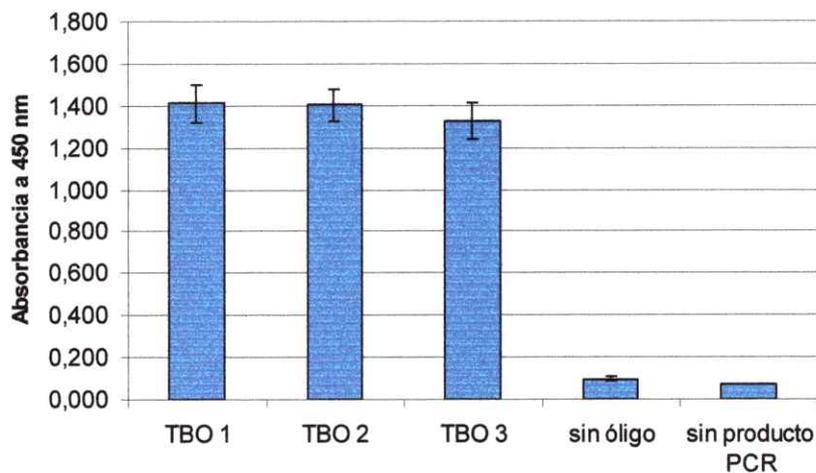


Figura 9. Análisis comparativo de la eficiencia de captura de los diferentes oligonucleótidos TBO. En la etapa de ELISA de captura, cada pocillo se activó con los diferentes oligonucleótidos, en triplicado. Se incluyó además, pocillos **sin óligo**, en los que se agregó sólo PBS 1X y pocillos **sin producto de PCR**, como controles negativos de ELISA.

A pesar de que existen diferencias en las secuencias del fragmento IS43-IS41 en que cada oligonucleótido hibrida (ver figura 3, página 16), esto no tendría un efecto significativo en la eficiencia de capturar los productos de PCR (figura 9). Sin embargo, al determinar la frecuencia de estructura secundaria o capacidad de formar dímeros de estos oligonucleótidos utilizando el programa OLIGO versión 4.1, se encontró que tanto el oligonucleótido TBO 1 como el TBO 2, con una T_m alrededor de 60°C, presentan una estructura secundaria bastante estable. En contraste, el oligonucleótido TBO 3, a pesar de poder formar una estructura secundaria, la T_m fue bastante menor (26°C), posiblemente por formar una asa de sólo 6 nucleótidos. Basado en estos resultados, el desarrollo del ensayo se continuó con el oligonucleótido TBO 3 (Figura 10).

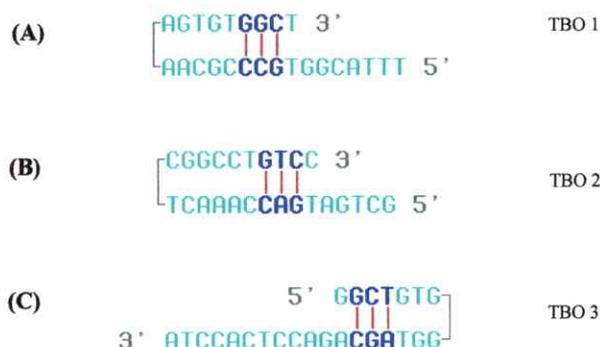


Figura 10. Estructuras secundarias de los oligonucleótidos de captura TBO1, TBO2 y TBO3.

4.4. Titulación de TBO 3.

Para determinar la concentración óptima del oligonucleótido de captura, pocillos de la microplaca de ELISA se activaron con 0,01; 0,1; 0,4; 0,8; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 y 50,0 pmoles del oligonucleótido TBO 3. La reacción de PCR se realizó con 10 ng del ADN de *M. tuberculosis* y los productos de PCR se diluyeron 1/250 para poder obtener una relación lineal entre la concentración de oligonucleótido versus la absorbancia a 450 nm, evitando

que los valores obtenidos sobrepasen la escala lineal de lectura del lector de microplacas de ELISA.

Los resultados muestran que alrededor de 10 pmoles por pocillo se observa la mayor absorbancia, por lo que dicha concentración se utilizó en los ensayos futuros (figura 11).

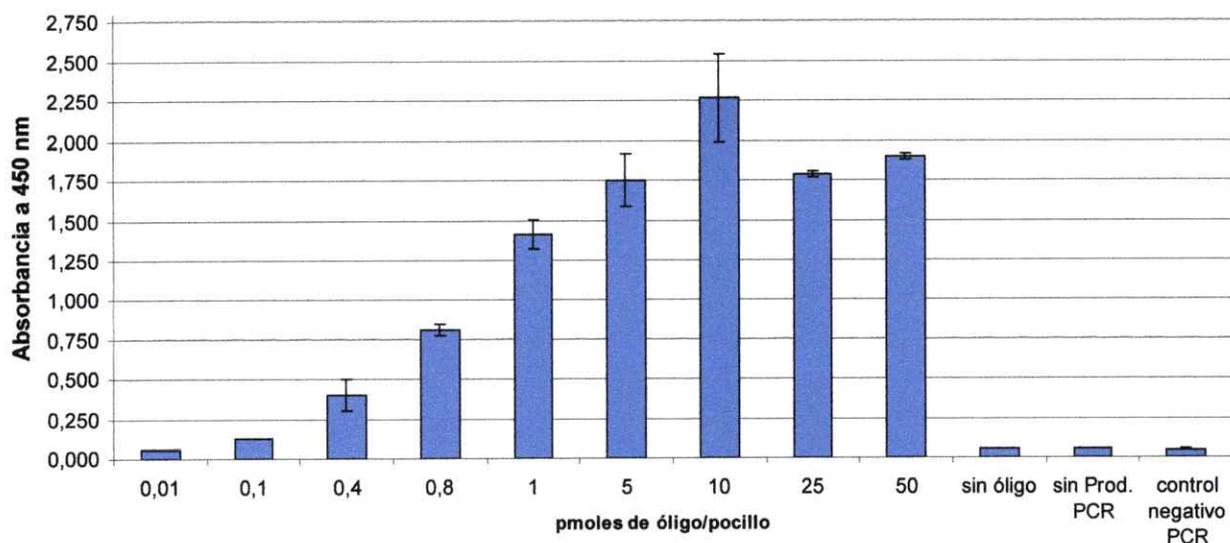


Figura 11. Titulación del oligonucleótido de anclaje TBO 3. Los pocillos de la microplaca se activaron con diferentes diluciones de TBO3, desde 0,01 a 50 pmoles por pocillo, en triplicado. Como controles negativos de ELISA se utilizaron pocillos que no fueron activados con TBO3 (**sin óligo**) y pocillos que fueron activados con 1 pmol de TBO3 pero que no se les agregó el producto de PCR (**sin Prod. PCR**). Como **control negativo de PCR**, se utilizó un producto de PCR al que no se le agregó ADN templado.

4.5. Estandarización de la concentración de formamida en la solución de hibridación

Los productos de PCR después de la desnaturación y enfriamiento a temperatura ambiente o la temperatura de hibridación, podrían formar estructuras secundarias relativamente estables, las cuales también podrían influir negativamente en la etapa de captura. Además de la temperatura de hibridación, otra forma clásica de evitar la formación de estructuras secundarias anómalas, es mediante el uso de formamida (46). Con el objeto de estudiar el efecto de la concentración de este compuesto, la reacción se realizó con soluciones de hibridación que contenían 5, 10, 15, 20, 30, 40% de formamida final. El producto de PCR se

mezcló en las soluciones con las distintas concentraciones de formamida, se desnaturó y 100 μ L de la mezcla se aplicaron a cada pocillo en duplicado. La mezcla se incubó a 50°C durante 1 h para permitir la hibridación. Como control negativo se utilizó una mezcla de PCR sin templado y un producto de PCR de 439 pb del rDNA mitocondrial de ratón de 16S (ver figura 4, página 17) amplificado también en presencia de dig-dUTP.

Como se observa en la Figura 12, a concentraciones de hasta 10% de formamida la absorbancia fue semejante a la obtenida sin el agente denaturante, aunque a concentraciones mayores de 20% a 40% se observó una caída progresiva de la lectura.

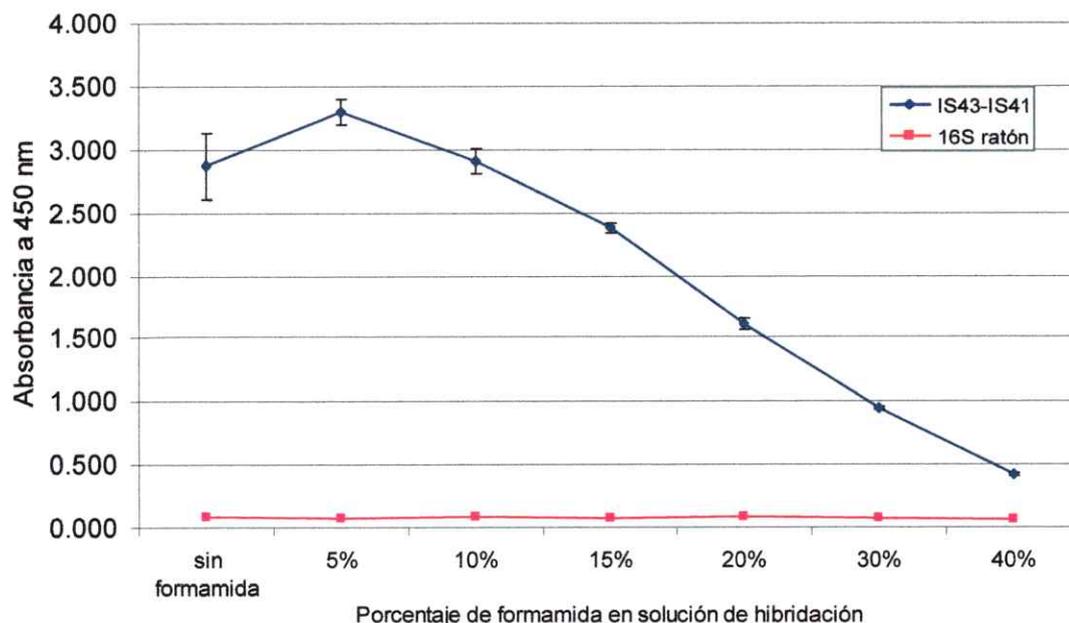


Figura 12. Efecto de la concentración de formamida en el PCR-ELISA. Se probaron diferentes porcentajes de formamida en la solución de hibridación, siendo 5% la concentración óptima para el PCR-ELISA. Para descartar la posibilidad de hibridaciones inespecíficas, se incorporó un control negativo correspondiente a un fragmento de 439 pb del gen 16S mitocondrial de ratón.

4.6. Construcción del control positivo.

En el desarrollo de cualquier test de diagnóstico es importante contar con un control positivo. Sin embargo, en este tipo de ensayo basado en PCR, es importante contar con un templado que pueda identificar muestras que sean falsos negativos. La *Taq* polimerasa es una enzima que puede ser inhibida por una gran variedad de compuestos (heminas, heparina, polisacáridos, metales pesados, etc.), lo cual puede traducirse en una nula amplificación a pesar de estar presente el templado que se desea amplificar. Este falso negativo puede corregirse agregando el control positivo, el cual tampoco será amplificado en presencia del o de los inhibidores. Con este objeto, el fragmento de 316 pb se ligó al plasmidio pCR 2.1[®] y posteriormente se transformaron células competentes JM109 como se describió en Métodos. A partir de las colonias blancas se realizaron cultivos de 5 mL y la presencia del inserto se verificó mediante PCR (Figura 14), utilizando los partidores descritos anteriormente. Una vez seleccionados los clones que contenían el inserto, se realizó un cultivo mayor con uno de estos clones, denominado St5, para aislar el plasmidio recombinante que constituiría el control positivo.

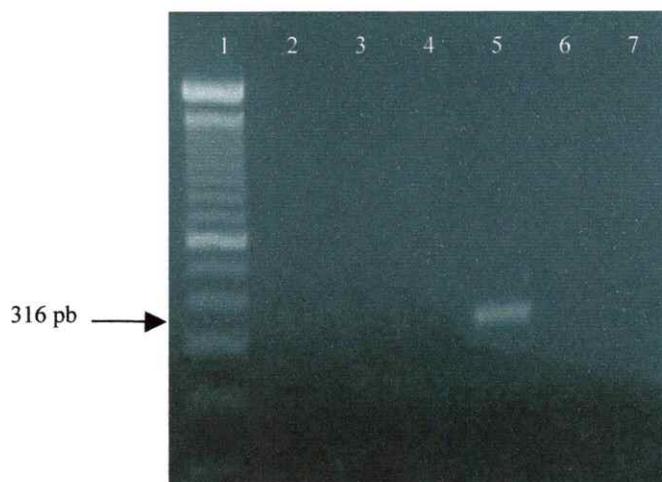


Figura 14. Resultado de la Transformación. Gel de agarosa al 2%, en el cual se aplicó 10 μ L de producto de PCR. De las 7 colonias transformantes obtenidas sólo una presenta el fragmento de 316 pb (carril 5).

Finalmente el plásmido obtenido a partir de St5 se secuenció (ver Métodos, página 26) y el resultado mostró 100% de identidad con los 316 pb correspondientes a la secuencia de inserción IS6110 de *M. tuberculosis* (NCBI, número de acceso X17348 y M29899).

4.7. Estudio de la capacidad de detección del test.

Para determinar el límite de detección del test PCR-ELISA se amplificaron cantidades conocidas del control positivo obtenidas a través de dilución seriada. A partir de una concentración de 1 ng/ μ L del control positivo determinada por electroforesis en gel de agarosa y confirmada por espectrofotometría, se realizaron las diluciones, considerando que 1 copia de control positivo corresponde a aproximadamente 4,6 ag de ADN (ver Métodos, sección 3.2.8.). La amplificación se realizó usando entre 1×10^5 a 0,1 copias correspondientes al fragmento IS43-IS41.

Del volumen total de la reacción de PCR de 50 μ L, se tomaron 15 μ L los cuales fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa y teñido con bromuro de etidio. Como se observa en la Figura 16 A, el fragmento de 316 pb se visualiza claramente hasta el carril 5, que corresponde a 100 copias del control positivo. En contraste, al analizar 15 μ L de la misma reacción de amplificación mediante ELISA (Figura 16 B), el ensayo fue capaz de detectar eficientemente 1 copia del control positivo.

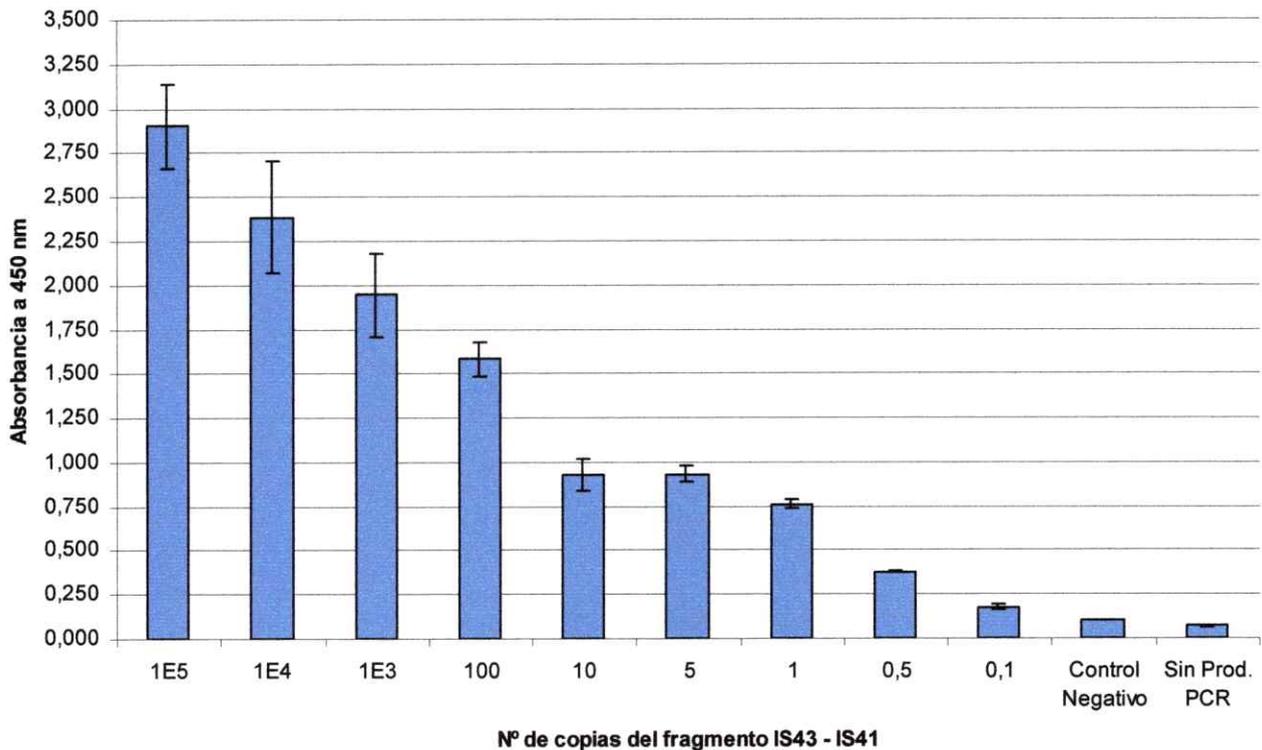
A**B**

Figura 16. Estudio de la capacidad de detección del PCR-ELISA. (A) Gel de agarosa al 2% con los productos de PCR del control positivo de PCR en diferentes números de copias del fragmento IS43-IS41. En cada carril se colocó 15 μ L de los productos de PCR. Carril 1, ADN escalera de 100 pb.; 2, 10^5 copias; 3, 10^4 copias; 4, 10^3 copias; 5, 10^2 copias; 6, 10 copias; 7, 1 copia; 8, control negativo de PCR (B) ELISA usando 15 μ L de los productos de PCR mencionados en A. Además se incluyeron los productos de PCR obtenidos a partir de 5 copias, 0,5 copias y 0,1 copias. Como control negativo de ELISA se incluyó pocillos sin producto de PCR.

4.8. Ensayo de la Especificidad del test.

Una manera para determinar la especificidad del test PCR-ELISA es utilizar como templado para la reacción de PCR el ADN de otros patógenos, tales como VIH (en estado de provirus), *H. pylori*, virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C (cDNA), *Salmonella sp.* (aisladas de pollo y de yema), *Yersinia sp.*, *Vibrio sp.*, *Proteus vulgaris*, *P. putida*, *P. versicularis*, *P. malei*, *P. diminuta*, *Alteromonas sp.* y *A. salmonicida*. En una primera fase, los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en agarosa. Como se muestra en la Figura 17 (a y b) sólo se detectó el fragmento de 316 pb en la muestra que contiene ADN de *M. tuberculosis*. Para confirmar la ausencia de productos de amplificación inespecíficos que pudiesen haberse encontrado a una concentración por debajo del límite de detección del gel de agarosa, se realizó la etapa de ELISA. Como se muestra en la Figura 18, las lecturas obtenidas con los templados de otros patógenos fue baja y semejante al control negativo, en contraste con la lectura del control positivo que fue superior a 2 unidades de absorbancia.

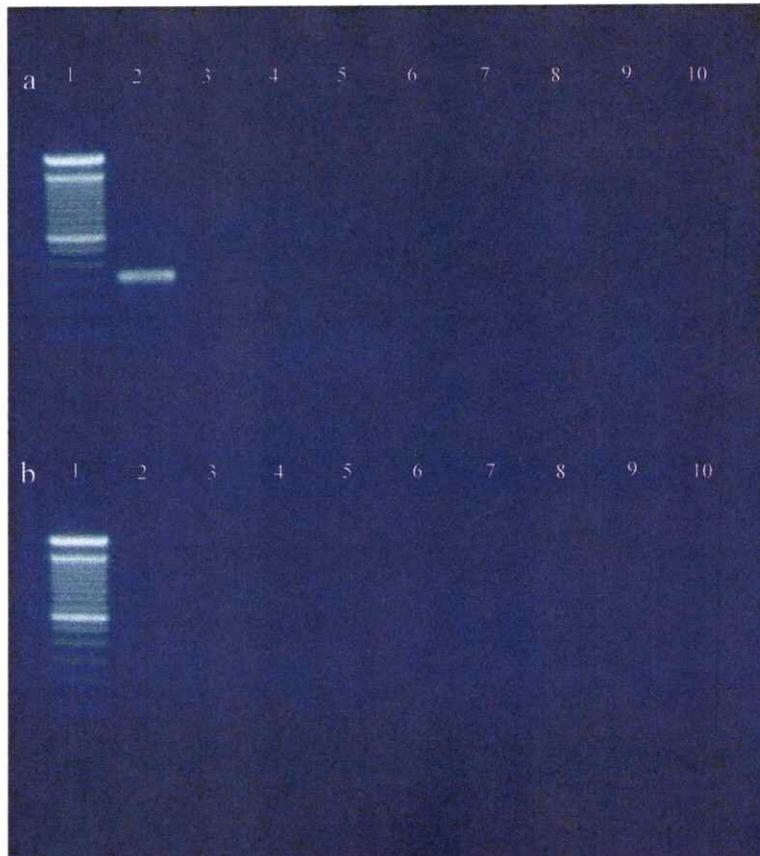


Figura 17. Ensayo de Especificidad. Gel de agarosa al 2%. Se observa la amplificación del fragmento de 316 pb sólo en presencia del ADN de *M. tuberculosis*. Carril 1a y 1b, estándar de ADN escalera de 100 pb; 2a, *M. tuberculosis*; 3a, control negativo (PCR sin ADN templado); 4a, VIH; 5a, *H. pylori*; 6a, HBV; 7a, HCV; 8a, *Salmonella sp.* (aislada de pollo); 9a, *Salmonella sp.* (aislada de huevo); 10a, *P. vulgaris*; 2b, *Vibrio sp.*; 3b, *Yersinia sp.*; 4b, *P. putida*; 5b, *P. versicularis*; 6b, *Alteromonas sp.*; 7b, *P. malei*; 8b, *P. diminuta*; 9b, *A. salmonicida*. Se cargó 10 μ L de cada producto de PCR

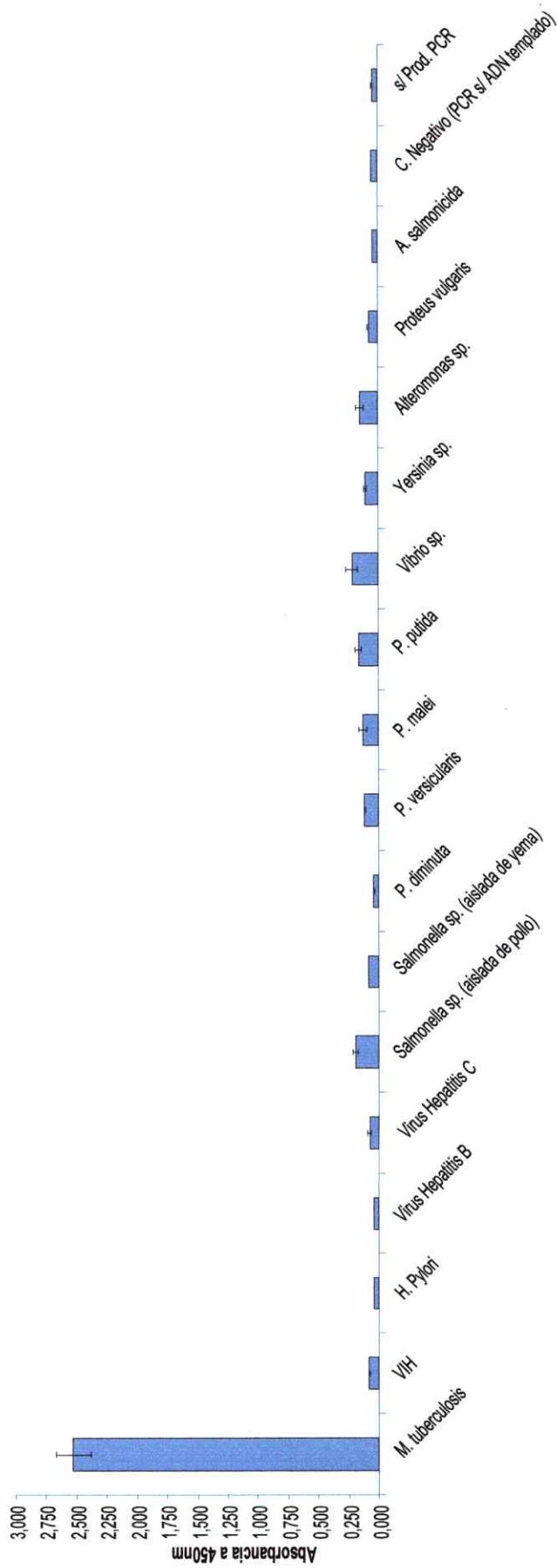


Figura 18. Especificidad del PCR-ELISA. Una vez realizado el PCR utilizando el ADN de diferentes bacterias relacionadas y no relacionadas a la patogenicidad en humanos, se hizo el ELISA para observar la especificidad de manera más sensible que en el gel de agarosa.

4.9. Estudio de la sensibilidad del test.

El Instituto de Salud Pública entregó 8 muestras problemas para su análisis. Una fracción de cada muestra se analizó mediante el sistema de diagnóstico para tuberculosis TBfast® de Pharmagen S.A. La otra fracción se procesó para obtener el ADN según lo descrito en Métodos y se ensayó mediante el test PCR-ELISA desarrollado en esta memoria de título. El resultado obtenido se resume en la tabla 4.1., el que muestra un 100% de correlación con los resultados obtenidos con el método de TBfast® o del Instituto de Salud Pública.

Muestra	PCR-ELISA	TBfast®	ISP
A	+	+	+
B	+	+	+
C	-	-	-
D	-	-	-
F	-	-	-
G	-	-	-
H	-	-	-
I	-	-	-

Tabla 4.1. Estudio de la sensibilidad con muestras incógnitas. El resultado del PCR-ELISA para la detección de tuberculosis en muestras provenientes del ISP mostró 100% de correlación con los resultados obtenidos con el método TBfast® o con los resultados del ISP. El signo + corresponde a un resultado positivo y el signo - corresponde a un resultado negativo.

4.10. Ensayo de recarga de muestras de sangre y orina.

Se tomaron muestras de sangre y orina de diferentes personas presuntamente sanas. Las muestras de sangre se almacenaron a 4°C en tubos en presencia de EDTA para evitar la coagulación.

Fuera de las muestras del ISP, todos los ensayos anteriormente descritos se realizaron utilizando el control positivo como templado. Con el objeto de determinar si los componentes de la muestra podrían interferir en el ensayo, se hicieron recargas del control positivo en muestras de sangre de diferentes personas presuntamente sanas. En este estudio, las recargas se realizaron agregando una cantidad predeterminada de *E. coli* transformada y correspondiente al clon St5. Un cultivo estándar de este clon en medio LB con ampicilina se diluyó a una concentración final aproximada de 30 bacterias/100 µL. Para confirmar el número exacto de bacterias, alícuotas de estas diluciones se sembraron en triplicado en placas de agar en medio LB con ampicilina. Así por ejemplo, la dilución de 30 bacterias/100 µL produjo $23 \pm 6,9$ colonias en el medio sólido.

Para descartar la posibilidad de amplificación inespecífica entre los partidores IS43 e IS41 y la secuencia del plásmido pCR 2.1[®] que no incluye el fragmento de 316 pb, se utilizó un control negativo que consistió en un clon de *E. coli* (clon T) que contiene el plásmido pCR 2.1[®] más un inserto de 154 pb correspondiente al gen del ARN ribosomal mitocondrial 16S de ratón (47). El clon T se creció en medio de cultivo LB con ampicilina durante toda la noche a 37°C y se diluyó en forma seriada hasta obtener alrededor de 50 bacterias/100 µL. Al cultivar 100 µL de esa dilución en agar-LB en triplicado, durante toda la noche, se obtuvieron $85 \pm 38,7$ colonias.

Se tomó 1 mL de cada muestra de orina o de sangre a las cuales se le agregó 100 μ L del clon St5 (23 bacterias del clon positivo) o 100 μ L de PBS como control (muestra sin recarga). Una muestra al azar de sangre y una de orina fueron recargadas con el control negativo (recarga con clon T), correspondientes a 85 bacterias del clon T. En forma paralela, tanto a una muestra de 1 mL de sangre como de orina se recargaron con 10 ng de ADN del control positivo justo antes de agregar 50 μ L de NaOH 0,2 N e incubar por 30 min a 70 °C.

Como se observa en la Figura 19 a y b, tanto las muestras de orina como de sangre dieron absorbancias a 450 nm que fluctuaron alrededor de 0,1 y que fueron similares al control negativo. Esto confirma que todas las muestras eran negativas para *M. tuberculosis*. Por otro lado, las muestras de orina y de sangre que se recargaron con el clon St5, fueron todas positivas (Figuras 19 a y b).

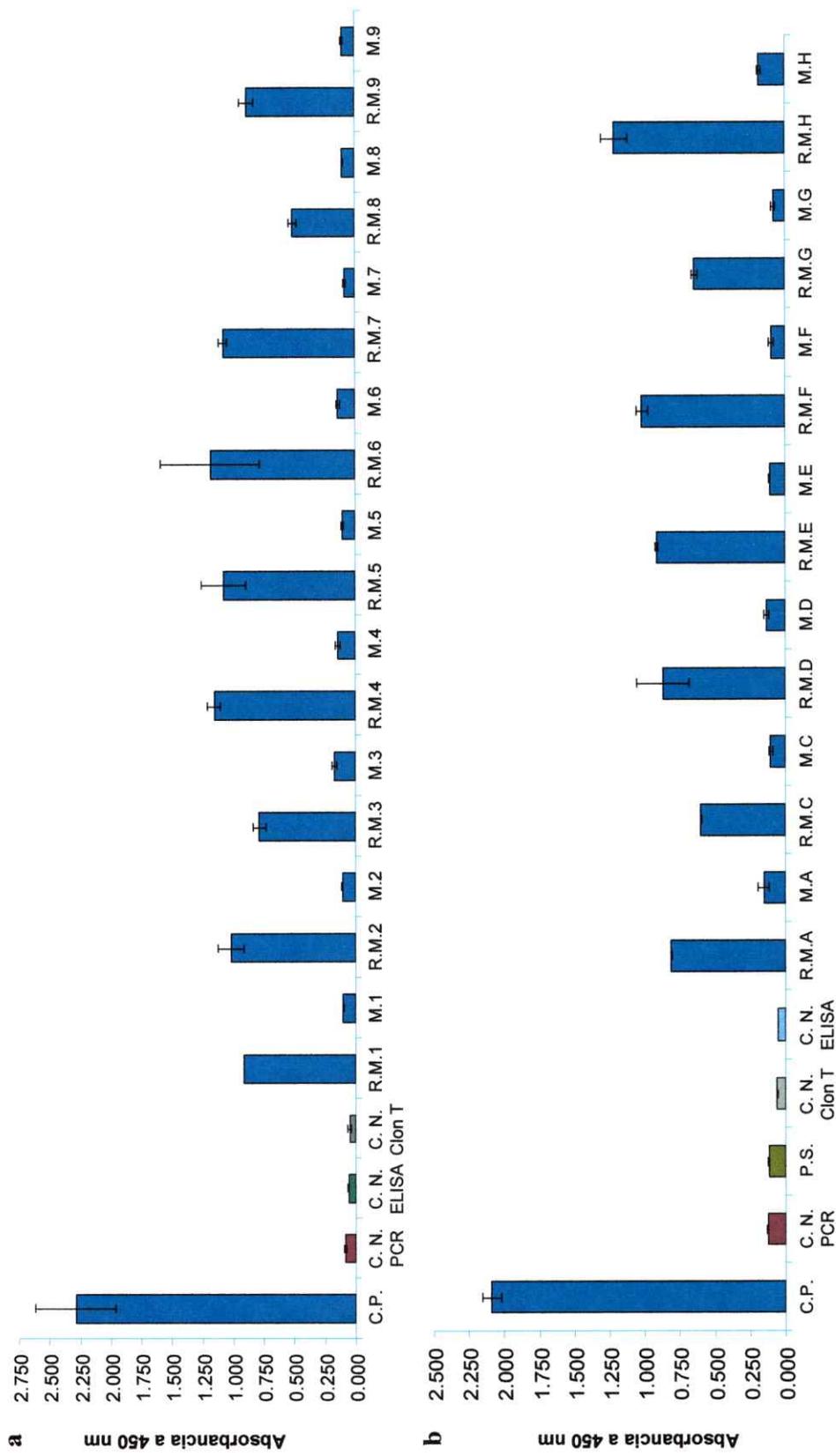


Figura 19. Ensayo de recarga en muestras de orina (a) y sangre (b). Muestras de personas aparentemente sanas (M.1 a M.9, en el caso de las muestras de orina y M.A a M.H, en el caso de muestras de sangre) fueron tomadas y recargadas con St5 (R.M.1 a R.M.9, en el caso de las muestras de orina y R.M.A a R.M.H, en el caso de muestras de sangre, ver texto) y con clon T (este último al azar en una de ellas), como control negativo (C.N. Clon T). Luego se extrajo el ADN de las muestras recargadas y sin recargar que fue tomado para realizar el PCR-ELISA. El ensayo mostró que las muestras recargadas resultaron positivas y que ninguna de las muestras sin recargar dio positivo. Se incluyó además el Control positivo amplificado mediante PCR en presencia de dig-UTP (C.P.); Control negativo de PCR que corresponde al producto de PCR sin ADN templado (C.N. PCR); Control negativo de ELISA, que se obtuvo al cargar los pocillos sólo con solución de hibridación (C.N. ELISA) y en el caso del análisis de muestras de sangre se utilizó sangre de una persona sana (P.S.), confirmado mediante el kit de diagnóstico TBfast por el Centro de Diagnóstico Molecular de BiosChile I.G.S.A.

5. DISCUSIÓN.

El desarrollo del PCR-ELISA para la detección de *M. tuberculosis* cubrió varios aspectos necesarios para obtener un sistema de detección sensible y específico y con un costo apropiado. Para ello no solo se estandarizaron las concentraciones óptimas de los componentes de la etapa de PCR como del ELISA de captura, sino que además se desarrolló un método simple de extracción alcalina del ADN templado. Por otro lado, se ensayó el efecto de la formamida en la hibridación del oligonucleótido de captura y el producto de PCR, la cual se traduce en una mayor estrictez del ensayo, aumentando por lo tanto su especificidad.

5.1. Titulación de la digoxigenina-dUTP.

Como se mostró en la Figura 7 (página 29), existe un patrón de migración diferenciado que depende de la razón dTTP/dig-dUTP y del porcentaje de dig-dUTP incorporado en la hebra que hibrida con el oligonucleótido de captura. El aumento aparente en pares de bases del amplicón se debe al alto peso molecular de la digoxigenina incorporada lo que se traduce en un retraso en la migración del ADN frente al campo electroforético. Dig-dUTP es un componente del ensayo de alto costo. Para bajar la concentración de este nucleótido se recurrió a dos estrategias complementarias. Por un lado se bajó la concentración de dTTP (dTTP + dig-dUTP en relación a las concentraciones de dATP, dCTP y dGTP (0,2 mM cada uno) que corresponden a concentraciones saturantes para la *Taq* polimerasa. De esta forma la reacción de amplificación se hacía dependiente de la concentración de dTTP + dig-dUTP. En este sentido y según el resultado mostrado en las figuras 7 y 8 (páginas 29 y 30), la reacción de PCR resultó ser tan eficiente cuando la concentración total de la pareja dTTP/dig-dUTP era la cuarta parte de la concentración de cada uno del resto de los nucleótidos, como cuando la concentración de dTTP era 0,2 mM, pero sin incluir dig-dUTP. Por otro lado, cuando se utilizaba la misma razón de dTTP/dig-dUTP, 47,5/2,5 μ M, 95/5 μ M y 190/10 μ M, pero en diferentes concentraciones en relación con los otros nucleótidos,

el resultado obtenido en el gel de agarosa mostró que la migración de los productos de PCR era la misma, lo que sugiere que la incorporación de la dig-dUTP depende de la razón dTTP/digdUTP y no de la cantidad disponible de dig-dUTP y dTTP en el medio de reacción. Luego, el ELISA de captura confirmó este resultado ya que las lecturas obtenidas con las diferentes razones fueron prácticamente iguales (figura 8, página 30). Por lo tanto, este experimento demostró que lo más importante para obtener mayores lecturas en el ELISA de captura, es aumentar la razón dTTP/dig-dUTP y no necesariamente la concentración de dig-dUTP final en el medio de reacción.

La segunda estrategia fue capturar del amplicón, aquella hebra que tuviere un mayor contenido de T, que resultó ser la hebra antisentido que tiene 57 timidinas, contra 51 que tiene la hebra sentido en los 316 pb. De esta estrategia también dependió el diseño de los oligonucleótidos de captura.

El resultado de estos estudios reveló que la relación dTTP/dig-dUTP de 49:1 da una lectura en el ensayo de ELISA que corresponde a 15 veces el control negativo sin templado en la PCR. Aunque ese valor fue la mitad del valor de la lectura obtenida con la razón 95/5, al aumentar el tiempo de incubación de los sustratos de la peroxidasa desde 7,5 a 30 min fue posible en definitiva detectar hasta una copia del fragmento del 316 pb proveniente del repetido IS6110 de *M. tuberculosis*, confiriéndole al ensayo desarrollado de PCR-ELISA una capacidad de detección excelente. Al ser la digoxigenina-11-dUTP uno de los reactivos más caros de este sistema de detección, su uso en la menor cantidad posible optimiza este sistema desde el punto de vista de costo, sin afectar la sensibilidad del sistema.

5.2. Oligonucleótidos de captura.

Como se discutió anteriormente, para desarrollar la etapa de captura del ELISA, se escogió la hebra antisentido del amplicón de 316 pb obtenido por PCR, debido a un mayor contenido de T. Para escoger los oligonucleótidos de captura se eligieron zonas del amplicón con contenido relativamente bajo de C + G (14 o 15 de 25 nucleótidos), en relación con la alta concentración de G y C de la secuencia IS6110, y en especial, del fragmento de 316 pb.

Mediante este análisis se diseñaron 3 oligonucleótidos TBO1, TBO2, TBO3. Los dos primeros presentan horquillas bastantes estables con Tm que varían entre 60°C y 67°C (ver figura 10, página 32). Por otro lado, TBO3 adopta una estructura secundaria menos estable con una Tm de 26°C. Como se mostró en la figura 9 (página 31) los tres oligonucleótidos funcionaron en forma equivalente en la etapa de captura del ELISA, pues las absorbancias obtenidas fueron similares, sin embargo, se escogió el oligonucleótido TBO3 para el desarrollo del PCR-ELISA, porque la población de este oligonucleótido formando horquillas a la temperatura de hibridación, sería más baja en comparación con los otros dos oligonucleótidos.

5.3. Titulación del oligonucleótido de captura.

La determinación de la concentración óptima de TBO3 mostró que el aumento de captura del amplicón desnaturado era proporcional a la concentración del oligonucleótido entre 0.01 y 10 pmoles/pocillo. A concentraciones mayores de 10 pmoles/pocillo se observó una caída progresiva de la lectura, indicando una inhibición de la captura del amplicón. Es difícil explicar este resultado, pero podría deberse a un efecto de impedimento estérico. Con una mayor cantidad de oligonucleótido de captura en el pocillo podría dificultarse la hibridación de las hebras desnaturadas del fragmento amplificado de *M. tuberculosis*. En definitiva se eligió una concentración de 10 pmoles/pocillo para el formato definitivo del ensayo.

5.4. Efecto de la concentración de formamida en la etapa de hibridación.

La formamida es un reactivo que se utiliza habitualmente en la de hibridación de ácidos nucleicos para que las condiciones sean más estrictas, disminuyendo así la posibilidad de que existan apareamientos inespecíficos entre el oligonucleótido de anclaje y los productos de PCR. Esto se explica debido a que la formamida es un eficiente formador de puentes de hidrógeno, por lo que la hibridación entre las dos hebras de ácidos nucleicos se ve favorecida sólo si existe una alta complementariedad entre ellas, aumentando la especificidad del ensayo.

Con este objeto se ensayaron diferentes concentraciones del reactivo, entre 5% a 40%. Los resultados mostraron que la absorbancia obtenida fue similar al hibridar la misma cantidad del producto de amplificación en presencia de 0% a 15% de formamida. Sobre esta concentración y fundamentalmente entre 20% a 40 % de formamida se encontró una progresiva disminución de la lectura (figura 12, página 34). Esta disminución es esperable, pues a dichas concentraciones de formamida se modifica progresivamente el valor real de Cot (concentración molar de nucleótidos por segundo) (48), lo que afecta la reacción de hibridación entre una hebra del amplicón y el oligonucleótido de captura.

Otra explicación sería un efecto del reactivo sobre la estreptavidina. Como se describió en resultados, la unión de la sonda de captura al pocillo es mediada por la alta afinidad ($K_D=10^{15}$) de la estreptavidina a la biotina (49) presente en el extremo 3' de la sonda de captura. Por lo tanto, uno esperaría que a las concentraciones del reactivo utilizadas, la estreptavidina sufriera algún cambio estructural que disminuyera la afinidad por la sonda biotilada, lo cual se traduciría en una lectura del ELISA menor. Sin embargo, llama la atención que la absorbancia obtenida con 10% formamida fuera similar a la lectura del control sin formamida. Una explicación posible es que la estreptavidina unida a la placa mediante su unión a pegotina, establezca la estructura de la proteína como fue demostrado con la gonadotrofina coriónica humana o HCG (39).

5.5. Control positivo.

El clonamiento exitoso del fragmento de PCR permitió incorporar a este sistema de diagnóstico un control positivo de PCR. La secuencia del inserto del clon St5 fue 100% homóloga a la secuencia correspondiente de *M. tuberculosis*.

La utilización de un control positivo es fundamental en un sistema de diagnóstico basado en PCR, sobre todo si se trabaja con muestras en las cuales puedan existir compuestos inhibidores de la *Taq* polimerasa, tales como el grupo hem presentes en la sangre, heparina, metales pesados, melanina, etc (50). En presencia de estos inhibidores, la *Taq* polimerasa no podría amplificar el templado blanco dando origen a falsos negativos. Por otro lado, si en

forma paralela se realizara la reacción de PCR en la misma muestra a la cual se le adicionó un control positivo y esta sigue siendo negativa, se puede demostrar que la muestra está inhibida. En este caso la muestra de ADN debería ser repurificada o recurrir a una nueva muestra.

A pesar de la conveniencia de utilizar el control positivo en el PCR-ELISA también este tiene una desventaja. Como el sistema es tan sensible, la más pequeña contaminación de la o las muestras con dicho control puede generar falsos positivos. Por lo tanto, el manejo de los controles y las muestras tiene que ser muy meticuloso. Una solución a este problema sería reemplazar el control positivo por un control interno que consistiera en un plásmido más un inserto amplificable con un set de partidores diferentes a IS43 e IS41 y que se agregara a la muestra en la misma reacción de PCR. En la fase del ELISA del ensayo se tomarían alícuotas iguales y mientras una se hibrida a la sonda de captura para *M. tuberculosis*, en el pocillo paralelo el amplicón de control interno hibridaría a otra sonda de captura también específica. De esta forma, si el control interno da una lectura francamente positiva y la muestra da una valor de absorbancia semejante al control negativo, uno puede asegurar que la muestra es verdaderamente negativa.

5.6. Capacidad de detección y especificidad del ensayo.

La PCR es una técnica poderosa que teóricamente puede amplificar una copia de ADN templado. Esta propiedad de la técnica fue exitosamente demostrada en esta memoria de título. El método PCR-ELISA desarrollado no solo permitió detectar una copia del inserto del clon St5, sino que además mostró ser 100 veces más sensible que la detección mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

Según estudios realizados por Plikaytis y col. (42), al comparar la amplificación de una única copia del gen *groEL* de *M. tuberculosis* con la amplificación de un fragmento de IS6110, el número de copias de esta última era de al menos 10 en el patógeno. Por lo tanto, si consideramos que el fragmento de 316 pb se encuentra presente en la secuencia de inserción IS6110 una sola vez y que el ensayo desarrollado en esta memoria de título detectó

una copia del elemento de inserción, entonces es posible que este método pueda detectar una bacteria en una muestra determinada.

Utilizando el mismo razonamiento, Plikaytis y col. (42) determinaron que *M. bovis* tenía una a dos copias del fragmento IS6110. Por lo tanto la detección de una copia del fragmento de 316 pb mediante PCR-ELISA, hace posible diagnosticar la presencia de esta bacteria. Esto tiene importancia no sólo por la posibilidad de hacer extensivo el uso de este ensayo de PCR-ELISA en muestras de ganado bovino, sino que también en muestras clínicas humanas, en las que también se ha visto una correlación de la tuberculosis con *M. bovis* (2, 5).

Para evaluar la especificidad del PCR-ELISA se realizaron ensayos con ADN obtenido de diferentes patógenos humanos tales como el provirus de VIH causante del SIDA, *H. pylori* que predispone la aparición de gastritis estomacal e intestinal, *Salmonella sp.* responsable de enfermedades gastrointestinales y algunas especies pertenecientes al género *Pseudomonas*, que se caracterizan por producir enfermedades de manera más frecuentemente en personas con sistema inmunológico deprimido. Dentro de este grupo también se ensayaron como templado muestras positivas al virus de Hepatitis B y C obtenidas del Centro de Diagnóstico Molecular de BiosChile I.G.S.A. Otras muestras incluyeron un panel de patógenos de salmones. El ensayo mostró una absorbancia alta para *M. tuberculosis* y lecturas similares al control negativo para los demás patógenos ensayados.

En el futuro será interesante evaluar otros patógenos e inclusive otras micobacterias relacionadas o no relacionadas a la enfermedad. Por ejemplo, demostrar la detección de *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* mediante el ensayo de PCR-ELISA. También será necesario determinar la especificidad con otros patógenos tales como, *M. avium* y *M. leprae*, causante de la lepra. Probablemente estos resultados serán negativos ya que Plikaytis y col. (42), demostraron que con los mismos partidores IS43-IS41 no se logró amplificación de otras micobacterias.

5.7. Sensibilidad y evaluación de muestras.

Uno de los objetivos cumplidos en esta memoria de título fue aplicar un método simple para extraer ADN de las muestras positivas a *M. tuberculosis* o muestras con recarga del clon St5. El tratamiento con NaOH 0,2 N y posterior neutralización es simple y rápido, y evita el uso de solventes orgánicos como fenol y cloroformo.

No fue fácil conseguir muestras humanas infectadas con *M. tuberculosis*. Sin embargo, y a pesar de que el número de muestras donadas por el Instituto de Salud Pública fue bajo, los resultados obtenidos con el ensayo de PCR-ELISA mostraron un 100% de correlación con el diagnóstico del Instituto y con el ensayo realizado con el test TBfast®. A pesar que esta conclusión se basa en un muestreo pequeño, futuros ensayos con el mismo test permitirían asegurar con más precisión la sensibilidad del PCR-ELISA. Hay que hacer notar que una razón que impidió conseguir más muestras, es la baja tasa de morbilidad en Chile. Así por ejemplo, en el Centro de Diagnóstico Molecular de BiosChile se han detectado sólo 9 muestras TBC positivas desde enero de 1999 a la fecha.

A pesar de estas dificultades, se ensayó el método de diagnóstico con muestras de sangre y orina humana artificialmente infectadas por la adición del clon St5. Se utilizó este enfoque en lugar de hacer recargas con el ADN plasmidial aislado, para evaluar si el tratamiento con NaOH en estas muestras era efectivo para la extracción del templado. También era necesario ensayar si la extracción del templado desde una muestra podía o no extraer potenciales inhibidores de la reacción de amplificación. El resultado de este ensayo fue excelente, ya que todas las muestras de orina y sangre con recarga resultaron positivas. Sin embargo, es prematuro extrapolar estos resultados para muestras que contengan *M. tuberculosis*, ya que esta bacteria posee una pared más resistente, lo cual podría dificultar la extracción de ADN. Por otro lado, los ensayos realizados con las muestras provenientes del ISP demostraron que el método de extracción funcionó bien, lo cual indica que la obtención del ADN a partir de la bacteria no debería presentar dificultades.

5.8. PCR-ELISA versus otros test.

Como se discutió en la introducción los límites de detección de sistemas como AMPLICOR MTB[®] (31) y TBfast[®] (32) son de 800 bacterias/mL y 20 bacterias/mL de muestra, respectivamente. El PCR-ELISA desarrollado en esta memoria de título tiene una capacidad de detección de 1 copia del fragmento IS43-IS41. Debido a que *M. tuberculosis* tiene entre 10 a 20 copias de este fragmento presentes en su genoma, es muy probable que este ensayo sea capaz de detectar la presencia de 1 bacteria/mL de muestra.

En lo relativo al costo del ensayo, podemos compararlo con el precio de venta del kit IPNV Genotest II utilizado para la detección del virus IPN. Este kit tiene un valor de \$3.000 por ensayo, en cuyo costo, además de todos los reactivos comunes al del test desarrollado en esta memoria de título, influyen la transcriptasa reversa y el inhibidor de ribonucleasas, proteínas con un costo significativo, pero que no son necesarias para el ensayo de detección de *M. tuberculosis*. Por otro lado, los precios de venta de AMPLICOR MTB[®] y TBfast[®] varían entre \$20.000 a \$30.000 por ensayo, por lo tanto, el valor del PCR-ELISA para *M. tuberculosis* sería un 90% menor que el valor comercial de estos kits.

En definitiva, producir el sistema de diagnóstico desarrollado en esta memoria de título se justifica completamente tanto desde el punto de vista de capacidad de detección como el de costo de ensayo.

6. CONCLUSIONES.

Mediante la amplificación del fragmento de 316 pb perteneciente a la secuencia de inserción IS6110 con los partidores IS43 e IS41 se obtuvo una PCR específica para *M. tuberculosis*.

Posteriormente a través del diseño de un oligonucleótido biotinilado en su extremo 3' se logró la detección del ADN del patógeno por medio de un sistema de ELISA de captura o PCR-ELISA.

Al clonar el fragmento de 316 pb en el plásmido pCR 2.1™, se obtuvo un control positivo para el PCR-ELISA.

Luego de ajustar y estandarizar sus variables, se obtuvo un sistema que logró detectar hasta una copia del producto de amplificación y con un costo por ensayo mucho más económico que otros kits comerciales.

Al utilizar ADN de diferentes patógenos humanos, se observó además, que este sistema es específico para el ADN de *M. tuberculosis*. Estudios posteriores serán necesarios para determinar si en efecto este sistema es capaz de detectar el ADN de las micobacterias pertenecientes al complejo tuberculosis y no a micobacterias del mismo género no relacionadas a la enfermedad.

Al analizar muestras incógnitas obtenidas del Instituto de Salud Pública el resultado mostró 100% de correlación con los resultados obtenidos por medio del kit Tbfast® y con el resultado del ISP.

Se realizaron pruebas de campo con este sistema de detección en muestras de sangre y orina de pacientes sanos. Para analizar la efectividad del método de extracción de ADN, se realizaron ensayos de recarga de las muestras de sangre y orina con el clon St5 y se determinó que la extracción de ADN fue efectiva. No se logró analizar muestras de pacientes con tuberculosis debido a la dificultad de conseguirlas.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. **The Nobel Foundation.** Robert Koch Biography. The Official Web Site of Nobel Foundation, <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1905/koch-bio.html>
2. **Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.** Procedimientos en microbiología Clínica (Protocolos de la SEIMC). Capítulo 9: Diagnóstico Microbiológico de la Infecciones por Micobacterias. Editor: Juan Picazo. <http://www.seimc.org/protocolos/cap9.htm#3>
3. **Microbiology & Public Health.** Acid-Fast Staining Procedures for Mycobacteria. Department of Mycobacteriology. University of Northern Alberta, Canada. http://bugs.uah.ualberta.ca/mycob/afb_stain/afb_tutorial.htm
4. **Jerome Harms.** Tuberculosis. Department of Animal Health and Biomedical Sciences, University of Wisconsin-Madison. ©2000 Kenneth Todar. <http://www.bact.wisc.edu/MicrotextBook/disease/tuberculosis.html>
5. **Grange J., Yates M., de Kantor I.** Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Second Edition, WHO/EMC/ZOO/96.4
6. **Cousins D.V., Wilton S.D. y Francis, B.R.** Use of DNA Amplification for the Rapid Identification of *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbiol. 1991; 27:1887-195.
7. **Organización Mundial de la Salud.** Informe del Director General sobre los procesos realizados. Programa contra la tuberculosis. Ginebra, 1994 (documento A 47/12).
8. **Valdés E., Ferrer A., Ferrer N.** La Tuberculosis, Otra Vez un Problema de Salud. Rev. Cubana Med. Gen. Integr. 1999; 15:318-27.
9. **Kaplan G., Freedman V., Russell D. y Colston M. J.** Tuberculosis Research Comes of Age. Mol. Med. Today 1998; 98:330-333
10. **Flynn J., Ernst J.** Immune Response in Tuberculosis. Curr. Op. Immunol. 2000; 12:432-436.
11. **Marchal G.** El resurgir de la tuberculosis. Mundo Cient. 1991; 136:520-8.
12. **Kochi A.** The Global Tuberculosis Situation and New Control Strategy of World Health Organization. Tubercle 1991; 72:1-6.
13. **Public Health Services.** Tuberculosis, final date United States, Center for Disease Control. 1996. MMWR 1988; 36:817-20.
14. **Murois F.** La inmunidad bacteriana. Mundo Cient 1992; 120:96-102.
15. **Stenger S. y Modlin R.** T Cell Mediated Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Curr. Op. Microbiol. 1999; 2:89-93.

16. **Zúñiga M.** Chile Inicia la Primera Etapa de la Eliminación de la Tuberculosis. Taller de Actualización "Tuberculosis en Chile. ¿Una Enfermedad Emergente?" Junio 2000.
17. **Styblo K.** "La Eliminación de la Tuberculosis en Holanda". Bol. UICter 1990; 65:2-3.
18. **Zúñiga M.** "Situación Epidemiológica de la Tuberculosis en Chile: Evolución y Perspectivas". Rev Chil. Infect 1998; 15:249-262.
19. **OPS/OMS.** "Reunión Regional de Directores de Programas de Control de la Tuberculosis". Informe final 1998; OPS/HCP/HCT/132:98-99.
20. **OPS/OMS.** "Primera Reunión Sub-regional de Países de Baja Prevalencia de Tuberculosis". Eliminación de la Tuberculosis como Problema de Salud Pública. S. José, Costa Rica. Dic. 1999.
21. **OMS.** Global Tuberculosis Control WHO Report 2000. WHO/CDS/TB/2000-275.
22. **Valenzuela P., Piffardi S., Lepe R., Velasco M.** Panorama Actualizado de la Resistencia a Fármacos Antituberculosis. Rev. Chil. Infect 1998; 15:225-233.
23. **Raiglione M. y Espinal M.** Hacia una Optimización de la Vigilancia de la resistencia a los Fármacos Antituberculosos en Europa. Eurosurveillance 2000; 5:103-4.
24. **Office of Communications and Public Liaison.** Tuberculosis Fact Sheet. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) y National Institutes of Health. U.S. Bethesda, MD 20892. Marzo 1997, <http://www.niaid.nih.gov/factsheets/tb.htm>
25. **Yule A.** Amplification-Based Diagnostics Target TB. Bio/Technology 1994; 12:1335-1337.
26. **Johnston Laboratories, Inc.** BACTEC system. Towson, MD.
27. **Roberts G. D., Goodman N. L., Heifets L., Larsh H. W., Linder T. H., McClatchy J. K., McGinnis M. R., Siddiqi S. H. Y Wright P.** Evaluation of the BACTEC Radiometric Method for Recovery of Mycobacteria and Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* from Acid-fast Smear-positive Specimens. J. Clin. Microbiol. 1983; 18:689-696.
28. **Brisson-Noël A., Lecossier D., Nassif X., Gicquel B., Lévy-Frébault V. y Hance A. J.** Rapid Diagnosis of Tuberculosis by Amplification of Mycobacterial DNA in Clinical Samples. Lancet 1989; 4:1069-1071.
29. **Hermans P. W., Schuitema A. R., Van Soolingen D., Verstynen C. P., Bik E. M., Thole J. E., Kolk A. H., Van Embden J. D.** Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strain by Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:1204-1213.

30. Liébana E., Aranaz A., Mateos A., Vilafrancia M., Gomez-Mampaso E., Tercero J., Alemany J., Suarez G., Domingo M., Domínguez L. Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms in Bovine Tissue Samples by PCR. J Clin. Microbiol. 1995; 33:33-36.
31. Roche Molecular Biochemicals (10/98) PCR Elisa. A versatile Tool for PCR Analysis. AMPLICOR MTB.
32. PharmaGen S.A. Tblast[®] Detección de *Mycobacterium tuberculosis* Mediante Identificación Genómica. Versión 2.0 1999. Madrid, España.
33. Jonas V., Alden MJ., Curry JJ., Kamisango K., Knott CA., Lankford R., Wolfe JM., Moore DF. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:2410-6.
34. Kamisango K., Kamogawa C., Sumi M., Goto S., Hirao A., Gonzales F., Yasuda K., Iino S. Quantitative Detection of Hepatitis B Virus by Transcription Mediated Amplification and Hybridization Protection Assay. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:310-314.
35. Gallina M., Troupioti P., Rocco G., et al. Predicting Culture Results for *Mycobacterium Tuberculosis* Complex. Chest Online 2000; 118:28.
36. Mannherz O., Burzio L. O. Development of an Assay Based in PCR-ELISA to Detect *Piscirickettsia salmonis*. Fundación Ciencia para la Vida, BiosChile I.G.S.A. Septiembre 1999.
37. Aguayo J., Miquel A., Valenzuela P., Burzio L. O. Detección del Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) Mediante ELISA-PCR. Biol. Res. 33: R-89.
38. Burzio L.O. Peptide useful as adhesive, and process for preparation thereof. US Patent N° 5,410,023, April 25, 1995.
39. Burzio V., Silva T., Pardo J., Burzio L.O. Mussel Adhesive Enhances the Immobilization of Human Chorionic Gonadotrophin to a Solid Support. Analytical Biochem., 1996; 241:190-194.
40. Eisenach, K. D., Crawford, J. T. & Bates, J. H. Repetitive DNA Sequences as Probes for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1988; 26:2240-5.
41. Eisenach, K. D., Cave, M. D., Bates, J. H. & Crawford, J. T. Polymerase Chain Reaction Amplification of a Repetitive DNA Sequence Specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infec. Dis. 1990; 161:977-81.
42. Plikaytis B. B., Eisenach K. D., Crawford J. T., Shinnick T. M. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a Polymerase Chain Reaction assay. Mol. Cell. Probes 1991; 5:215-219.

43. **Schillberg S., Schumann D., Fischer R.** PCR-Based Multiplex Method for Rapid Screening of Recombinant Bacteria. *BioTechniques*, 1997; 23:212-216.
44. **Applied Biosystems.** ABI Prism™ 310, Genetic Analyzer. User's Manual, 1998; 1-1 a 1-25. <http://www.appliedbiosystems.com/products/>
45. **Sambrook J., Fritsch., Maniatis T.,** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Second Edition. Págs. C.4 – C.9.
46. **Roche Molecular Biochemicals – Research.** Nucleic Acid Hybridization. General Aspects. Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual, 2000, págs. 29-31. http://www.roche-applied-science.com/prod_inf/manuals/InSitu/InSi_toc.htm
47. **Villegas J., Zárraga A M., Muller I., Montecinos L., Werner E., Brito M., Meneses A. M., Burzio L.O.** A Novel Chimeric Mitochondrial RNA Localized in the Nucleus of Mouse Sperm. *DNA and Cell Biol*, 2000; 19:579-588.
48. **Lewin B.** Genes VI. Oxford University Press and Cell Press. 1997. Págs. 648-54, Cap. 21.
49. **Tijssen P.** Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Vol. 15. © 1985. Elsevier Science Publishers B.V. pág. 21-31, Cap. 3.
50. **Abu Al-Soud W., Radström P.** Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases to Mediate DNA Amplification in the Presence PCR-Inhibiting Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64:3748-53.