



## **FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA PCR-ELISA PARA LA DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA  
A RIFAMPICINA EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

**Línea de investigación:**

**Genética, bioquímica y biotecnología**

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

**Autor:**

Bellido Pantoja, Rosa Marí

**Asesor interno:**

Salas Asencios, Ramsés  
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**Asesor externo:**

Cáceres Rey, Omar Alberto  
(ORCID: 0000-0003-1529-2475)

**Jurado:**

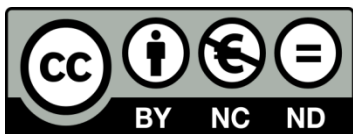
Scotto Espinoza, Carlos Jesús  
Iannacone Oliver, José Alberto  
Rodrigo Rojas, Maria Elena

**Lima - Perú**

**2021**

**Referencia:**

Bellido, R. (2021). *Optimización de la técnica PCR-ELISA para la detección de la resistencia a Rifampicina en Mycobacterium tuberculosis* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5514>



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA PCR-ELISA PARA LA DETECCIÓN DE LA**  
**RESISTENCIA A RIFAMPICINA EN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Línea de investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para Optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autor(a):

Bellido Pantoja, Rosa María

Asesor Interno:

Salas Asencios, Ramsés

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Asesor Externo:

Cáceres Rey, Omar Alberto

(ORCID: 0000-0003-1529-2475)

Jurado:

Scotto Espinoza, Carlos Jesús

Iannacone Oliver, José Alberto

Rodrigo Rojas, Maria Elena

**Lima-Perú**

**2021**

## **DEDICATORIA**

A mi hermano por su gran apoyo a lo largo de mi vida y a su amor de padre para conmigo. A mi madre por siempre confiar en mí y su amor infinito.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por no permitirme sentirme sola en mis momentos de angustia por darme la fortaleza de seguir y no claudicar.

También quiero agradecer a mi hermano Elmer que siempre estuvo para mí como un padre, por sus consejos, sus bromas y ser mi referente profesional por enseñarme esa pasión por la profesión. A mi madre por preocuparse siempre por mi salud y mi bienestar alentándome a descansar y que cuide de no mantenerme tanto despierta en las madrugadas. Este logro es para ambos con mucho cariño y es una muestra de lo agradecida que estoy por darme los recursos, la educación y el amor, que sin ello no hubiera sido posible.

Quiero contar que mi etapa de Tesista fue una de las más enriquecedoras para mi vida personal y profesional ya que pasé por muchos momentos de aprendizaje, pesé que al inicio me ganaron los nervios y la presión por hacer bien las cosas me di cuenta que debo ser mesurada y confiar en mí. Hubo momentos que pensé que no lo lograría porque había ensayos que no salían al inicio de esta tesis, pero fue mi tenacidad que me hizo seguir. Por ello es realmente importante nunca rendirse e intentar, y saber que en la ciencia todo es ensayo y error.

Agradezco al Instituto Nacional de Salud (INS) por permitirme utilizar las instalaciones de los laboratorios del Centro Nacional de Salud Pública.

Quiero agradecer especialmente a mi asesor externo de Tesis Mg. Blgo. Omar Cáceres Rey. Por su paciencia conmigo por no enojarse cuando se me cayó el conjugado lo cual fue una anécdota que me hizo ser más responsable. Agradecer también la confianza que me brindo para poder realizar esta Tesis bajo su tutoría, sus recomendaciones y ayudarme a forjar un criterio a la hora de analizar los resultados obtenidos de los ensayos de laboratorio. Además de sus consejos parentales que siempre fueron bien recibidos para mí. Este logro también es para usted a quien admiro, respeto y aprecio como el profesional que quisiera lograr ser.

A mi asesor interno, Mg. Ramsés Salas Asencios, quien estuvo pendiente de mis avances de mi Tesis y por aportar sus recomendaciones durante la revisión del proyecto. Además de agradecer por sus enriquecedoras clases durante mi etapa de pregrado.

Quiero agradecer al gran grupo de investigadores del LBBM: Mg. Blgo Henri Bailón y Blgo. Carlos Padilla de quienes agradezco mucho su conocimiento, su gentileza, y amabilidad en todo momento y además al Blgo Marco Galarza.

Quiero agradecer al técnico de laboratorio David Garcia por enseñarme muchas cosas como hacer mi primera electroforesis de poliacrilamida por sus recomendaciones y sugerencias cuando preparaba buffers, por su apoyo en todo momento. Agradecer también su forma de ser tan animosa, graciosa y por sus bromas que me hacían reír. Gracias por corregirme a tu manera y ser parte importante en el desarrollo de esta tesis.

Agradecer a la TM. Lic. Silvia Capristano y a la Blga. Verónica Yaniro por su apoyo y consideración además de los gratos momentos compartidos en el laboratorio con ambas.

Además de agradecer al administrativo el Lic. Harry Montejo quien me ayudó mucho en mi documentación y asesoramiento cuando requería para mis tramites.

Un especial agradecimiento al Lic. Miguel Verastegui encargado de Grados y títulos de la UNFV que me orientó muchísimo para mis tramites de Egresada, Bachiller y ahora mi Titulación.

Por último, agradecer a mis amistades por sus palabras de apoyo y a mi novio por estar siempre a mi lado en el proceso de todo este camino de aprendizaje este logro también es para ustedes con mucho cariño.

A Bobby por estar estos 10 años y estar conmigo a lo largo de mi adolescencia y juventud como en mis noches de desvelo haciendo mis proyectos o estudiando para exámenes.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Descripción y formulación del problema.....	1
1.2 Antecedentes .....	5
1.3 Objetivo.....	9
1.3.1 Objetivo General.....	9
1.3.2 Objetivos Específicos.....	9
1.4 Justificación.....	10
1.5 Hipótesis.....	12
<b>II. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
2.1 Bases Teóricas.....	13
2.1.1 La tuberculosis y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	13
2.1.1.1 Sistema de numeración consenso asociado a la resistencia a Rifampicina. ....	14
2.1.2 Diagnóstico de la enfermedad.....	16
2.1.2.1 Diagnóstico por Baciloscopia.....	16
2.1.2.2 Diagnóstico Microbiológico.....	18
2.1.2.3 Diagnóstico Molecular .....	18
2.1.3 Tratamiento de la enfermedad .....	20
2.1.3.1 Perfil de Resistencia a medicamentos antituberculosis (anti-TB).....	20
2.1.3.2 Mecanismos de Resistencia a medicamentos antituberculosos en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
2.1.3.3 Mecanismos de Resistencia.....	23
2.1.4 Métodos de determinación de la resistencia a drogas de primera línea en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	27
2.1.4.1 Métodos Microbiológicos.....	27
2.1.4.2 Métodos Moleculares .....	31
<b>III. MÉTODO .....</b>	<b>38</b>
3.1 Tipo de investigación .....	38
3.2 Ámbito temporal y espacial.....	38
3.3 Variables.....	38
3.4 Población y Muestra.....	38
3.4.1 Población.....	38
3.4.2 Muestra .....	38

3.5	Instrumentos .....	39
3.5.1	Equipos de laboratorio .....	39
3.6	Procedimientos .....	40
3.6.1	Estandarización de la técnica .....	40
3.6.1.1	Extracción de ADN de las muestras de esputos por CTAB-Lisozima .....	41
3.6.1.2	Cuantificación de la concentración de ADN de las muestras de esputos .....	41
3.6.1.3	Electroforesis de ADN y Productos de PCR .....	42
3.6.1.4	Estandarización del PCR .....	42
3.6.1.5	PCR de las muestras extraídas .....	45
3.6.1.6	Secuenciamiento de una región del gen rpoB .....	45
3.6.1.7	Análisis de Secuencias .....	46
3.6.1.8	Estandarización del PCR- ELISA .....	47
3.6.1.9	Evaluación de la Sensibilidad del PCR-ELISA .....	52
3.6.1.10	Evaluación de la Especificidad del PCR-ELISA .....	54
3.6.2	Ensayo Piloto del PCR-ELISA .....	55
3.7	Análisis estadísticos .....	56
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
4.1	Extracción de ADN de los controles y muestras de esputo .....	58
4.1.1	Cuantificación de la concentración de ADN de los controles .....	58
4.1.2	Electroforesis de los ADN extraídos controles y muestras de esputo .....	60
4.2	Estandarización del PCR para el gen rpoB .....	61
4.2.1	Estandarización de la temperatura de Hibridación de los primers .....	61
4.2.2	Estandarización de la Concentración de MgCl <sub>2</sub> .....	62
4.3	Electroforesis de los productos de PCR .....	63
4.3.1	Electroforesis de los productos de PCR de los controles .....	63
4.3.2	Electroforesis de los productos de PCR de las muestras sensibles .....	64
4.3.3	Electroforesis de los productos de PCR de las muestras del ensayo Piloto .....	65
4.4	Secuenciamiento de la región rpoB de 255pb .....	66
4.5	Estandarización del PCR-ELISA .....	68
4.5.1	Evaluación de las diferentes temperaturas de hibridación del producto de PCR con la sonda .....	68
4.5.2	Evaluación de las diferentes astringencias del Buffer de Hibridación: Solución Salina Fosfato EDTA (SSPE) .....	70



4.5.3	Estandarización de la Concentración de Estreptavidina .....	71
4.5.4	Estandarización de la Concentración de Sonda .....	72
4.5.5	Estandarización de la Concentración de Producto de PCR .....	73
4.5.6	Estandarización de la Concentración de Conjugado anti-Dig-POD.....	75
4.6	Evaluación de la Sensibilidad y la Especificidad del PCR-ELISA.....	77
4.6.1	Evaluación de la sensibilidad del PCR- ELISA.....	77
4.6.1.1	Sensibilidad directa del ELISA .....	78
4.6.2	Evaluación de la Especificidad del PCR-ELISA .....	80
4.6.2.1	Evaluación de la especificidad entre las sondas .....	83
4.7	Ensayo Piloto del PCR-ELISA .....	84
4.7.1	Determinación de la línea de corte (CUT OFF).....	84
4.7.2	Evaluación Piloto .....	88
4.7.3	Resultados del análisis de concordancia (Índice Kappa de Cohen).....	91
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>94</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>107</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>108</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>109</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>120</b>

## RESUMEN

**Introducción:** La tuberculosis es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Este bacilo ha mostrado resistencia a los fármacos antituberculosis, principalmente Rifampicina (RIF) e Isoniacida (INH), generando un problema de salud pública en nuestro país. La necesidad de utilizar técnicas moleculares, como el PCR-ELISA, permitirá detectar la resistencia a RIF de forma rápida, sencilla y económica. **Objetivo:** Optimizar un PCR-ELISA para detectar la resistencia a RIF en muestras de pacientes con tuberculosis. **Método:** Se estandarizó un PCR-ELISA para amplificar una región del gen *rpoB* de 255pb que codifica la resistencia a RIF. Se optimizaron diferentes parámetros: temperaturas de hibridación, diferentes astringencias del buffer de hibridación, concentración de sonda entre otros. Se evaluó la sensibilidad, la especificidad y la concordancia del PCR-ELISA frente al GenotypeMDRTBplus utilizando 20 muestras en un ensayo piloto. **Resultados:** Se optimizó un PCR-ELISA para la detección de las mutaciones H445D, H445Y y S450L que confieren resistencia a RIF, lográndose un límite de detección de 400 pg para las sondas H445D y H445Y y de 40pg para la sonda S450L. El PCR-ELISA tiene una especificidad del 100% únicamente para *Mycobacterium tuberculosis* y una sensibilidad de 86.7%. Se encontraron 2 mutaciones S450W y L452P, que no fueron detectadas por el sistema. En el ensayo piloto se obtuvo una “concordancia buena” ( $k=0.737$ ) entre el GenotypeMDRTBplus y el PCR-ELISA. **Conclusiones:** Se estandarizó un PCR-ELISA para la detección de las 3 mutaciones más frecuentes en el Perú asociadas a la resistencia a RIF de manera simultánea, siendo la más frecuente la S450L.

**Palabras Clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, Rifampicina, PCR-ELISA.

## ABSTRACT

**Introduction:** Tuberculosis is a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. This bacillus has shown resistance to anti-tuberculosis drugs, mainly Rifampicin (RIF) and Isoniazid (INH), generating a public health problem in our country. The need to use molecular techniques, such as PCR-ELISA, will detect resistance to RIF quickly, easily and cheaper. **Objective:** To optimize a PCR-ELISA to detect resistance to RIF in samples from patients with tuberculosis. **Method:** A PCR-ELISA was standardized to amplify a 255bp *rpoB* gene region that encodes resistance to RIF. Different parameters were optimized: hybridization temperatures, different hybridization buffer stringency, probe concentration, among others. The sensitivity, specificity, and concordance of the PCR-ELISA against GenotypeMDRTBplus were evaluated using 20 samples in a pilot assay. **Results:** A PCR-ELISA was optimized for the detection of the H445D, H445Y and S450L mutations that confer resistance to RIF, achieving a detection limit of 400 pg for the H445D and H445Y probes and 40pg for the S450L probe. The PCR-ELISA has a specificity of 100% only for *Mycobacterium tuberculosis* and a sensitivity of 86.7%. Two mutations S450W and L452P were found, which were not detected by the system. In the pilot test, a “good agreement” ( $k = 0.737$ ) was obtained between the GenotypeMDRTBplus and the PCR-ELISA. **Conclusions:** A PCR-ELISA was standardized for the detection of the 3 most frequent mutations in Peru associated with resistance to RIF simultaneously, the most frequent being S450L.

**Key Words:** *Mycobacterium tuberculosis*, Rifampicin, PCR-ELISA

## I. INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis (TB) es conocida desde la antigüedad como la peste blanca (Turco & Byrd, 2001) y, es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Esta bacteria que casi siempre se aloja en los pulmones es causante de miles de muertes a nivel mundial. La infección se transmite de persona a persona a través de gotitas de Flügge que son partículas diminutas expelidas por un enfermo de tuberculosis al hablar, toser, estornudar, respirar y escupir (Murillo-Godínez, 2009).

En un estudio reciente realizado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2017), se señala que la TB es un problema de salud pública asociado a la pobreza y a las malas condiciones de vida que, sumado a las dificultades de acceso a los servicios de salud, y a factores como la desnutrición (Ortega Alvelay et al., 2010), personas con VIH, habitantes de barrios marginales y personas con adicción a las drogas, potencian y mantienen el contagio en poblaciones vulnerables (OPS, 2017).

### 1.1 Descripción y formulación del problema

La (OMS, 2018) menciona que la tuberculosis afecta principalmente a los adultos en los años más productivos de su vida, esto no significa que el resto de grupos etarios estén exentos de riesgo, las muertes por TB se concentran en los países en vías de desarrollo; por lo cual se busca la acción multisectorial para prevenir nuevos casos mediante el combate a la pobreza que es uno de sus determinantes (OPS, 2017).

A nivel mundial, se estima que 10 millones de personas enferman de TB para el 2019, cifra que ha ido disminuyendo muy lentamente en los últimos años (World Health Organization, 2020) siendo el 56% eran hombres, el 32% mujeres y el 12% niños (<15 años); y el 8,2% de las personas con tuberculosis vivían con el VIH (World Health Organization, 2020).

Cabe mencionar que la pandemia de COVID-19 tuvo un impacto negativo en el acceso al diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis (World Health Organization, 2020).

El reporte global de Tuberculosis del 2020 revela que los países están progresando en la atención a los pacientes, debido a que se informó que 7.1 millones de personas con TB para 2019, recibieron atención de calidad en el diagnóstico y su notificación, en comparación con 7.0 millones en 2018, y los 6.4 millones en 2017 (World Health Organization, 2020).

Además, las muertes relacionadas con la tuberculosis fueron para el 2019 de 1.4 millones y disminuyeron a 1.2 millones en 2018, por tuberculosis entre personas VIH negativas (World Health Organization, 2020) Sin embargo, la TB sigue siendo la enfermedad infecciosa más prevalente en todo el mundo (World Health Organization, 2020).

El Perú es uno de los países con mayor número de casos de incidencia de TB multidrogorresistente (TB-MDR) a diferencia de Brasil, que posee mayor incidencia de casos de TB y TB-VIH en la región de las Américas durante el período 2016-2020 (World Health Organization, 2020).

En el 2020, nuestro país reportó una tasa de morbilidad de TB a nivel nacional de 75.3 x 100 000 hab. con una incidencia de 65.7 x 100 000 hab., además se reportó 24 581 casos de TB a nivel nacional, de los cuales 21 443 son casos nuevos de TB; de ellos 1441 casos fueron de TB-VIH representando un 5.9 % y 2833 casos fueron de TB- Diabetes Mellitus representando un 11.5% (MINSa, 2020).

En el año 2020, el Perú notificó 51 casos de TB-XDR y 1205 casos de TB-MDR y de los cuales 664 casos fueron notificados en Lima y el Callao lo que representó el 55.1 % de todos los casos, lo que indica una disminución en comparación al año 2019, que reportó 1464 casos de TB-

MDR, de los cuales 817 casos fueron de Lima y Callao representando el 55.8%. En el 2019 se reportó 89 casos TB- XDR (MINSA, 2020).

Para el diagnóstico de la enfermedad se conocen muchas técnicas, pero una de las más utilizadas es la técnica de Baciloscopia la cual consiste en la lectura de láminas con muestras de esputo donde las bacterias son coloreadas por el método de tinción de Ziehl-Neelsen según la Norma Técnica NT N° 104 (MINSA, 2013). Adicionalmente, se hace uso de métodos microbiológicos para el diagnóstico TB, los cuales son de menor costo y de mayor uso, pero debido a la naturaleza de los mismos, como es el caso del cultivo de Lowenstein-Jensen (LJ), Ogawa y agar 7H10 demoran alrededor de 8 semanas a más.

También existen otras técnicas que son más rápidas que las microbiológicas y que se usan para el diagnóstico de la Resistencia como el Método de las Proporciones considerada décadas atrás como el “Gold Standard“ la cual fue descrita por (Canetti et al., 1963), que compara el número de colonias desarrolladas en medios con diferentes diluciones de antibióticos, respecto a las desarrolladas en los medios sin antibióticos (Ugarte-Gil et al., 2008), y otras como el Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) que es un cultivo en medio líquido automatizado en tubos, que permite analizar la susceptibilidad a drogas de primera línea; el Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS), que también permite analizar la susceptibilidad directa a drogas de primera línea en placas; ambas técnicas demoran entre 8-15 días hasta la entrega de resultados.

Debido a esta demora en la detección y entrega de los resultados a los pacientes, desde hace una década atrás, se emplearon diferentes métodos de diagnóstico molecular, los cuales superan a los microbiológicos en su sensibilidad, especificidad y rapidez. En el Perú se utiliza el método automatizado Genexpert desde el 2004, que solo detecta la resistencia a Rifampicina (RIF)

a partir de muestras de esputo y la técnica de Genotype MDRTBplus desde el 2008, que detecta la resistencia a RIF e Isoniacida (INH), pero solo en muestras con baciloscopia positiva. Estos métodos involucran una mejor infraestructura, equipos costosos y capacitación del personal, por ende, es difícil de implementar en postas, hospitales, porque son costosos de adquirir, a excepción de centros de investigación.

Según la (OMS, 2008) el aumento de casos con TB-MDR y TB-XDR, hace que se piense en adoptar o generar medidas rápidas para encontrar un método de diagnóstico de la resistencia rápido, sensible, específico y de menor costo.

Es por todas estas razones que se busca una técnica que cumpla estos requerimientos. En los años 80 se describió una técnica que consistía en realizar un PCR convencional el cual sería revelado mediante un ensayo de inmunoabsorción (ELISA) detectando el ácido nucleico en lugar de la proteína (Sue et al., 2014). Dicha, técnica es conocida como PCR-ELISA, que por sus características es sensible, específica y de bajo costo y que podría ser implementada en centros de salud.

Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue la detección de las mutaciones en el gen *rpoB*, que confieren resistencia a RIF en MTB utilizando la técnica de PCR-ELISA.

## 1.2 Antecedentes

La técnica de PCR-ELISA surgió de varios intentos en la búsqueda de lograr la detección del ADN mediante técnicas inmunoenzimáticas, pese a que ha sido descrita desde hace muchos años se ha hecho muy poca investigación para la detección de drogas anti-tuberculosis.

Es por eso a fines de 1980 hubo un interés en el estudio de la inmunodetección de ADN, siendo publicados varios métodos, entre ellos se resalta el estudio de (Coutlée et al., 1989), el cual detecta el ADN utilizando sondas de ARN biotiniladas. Ellos estudiaron la reactividad de un anticuerpo monoclonal a híbridos de ADN-ARN.

Debido a su alta sensibilidad y especificidad, varios estudios sobre el uso de PCR-ELISA como método de detección y diagnóstico fueron publicados y le otorgan un enorme potencial para servir como una poderosa herramienta de detección en diversas industrias como la médica, veterinaria y agrícola. Demostrando ser exitosos tales son los casos de los siguientes estudios: Detección e identificación de especies de dermatofitos; infecciones fúngicas invasivas en pacientes inmunocomprometidos; detección de la presencia de tipos de hepatitis A, B, C y E (Seo et al., 2012), detección de poliovirus, enterovirus y norovirus; determinación de los antígenos del grupo sanguíneo para la enfermedad hemolítica de los casos de recién nacidos y pacientes politransfundidos (Sue et al., 2014).

También hay una serie de publicaciones que utilizan PCR-ELISA en la industria alimentaria, como la detección de patógenos nocivos transmitidos por los alimentos como: *Salmonella tiphy*; *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus* (Sue et al., 2014).

Un grupo de investigadores describieron un PCR-ELISA, para detectar el gen rfbS del lipopolisacárido amplificado como medio para la detección rápida de salmonelas del serogrupo



(B, C, D y E) en muestras de heces. Por tanto, la PCR DIG-ELISA ofrece un medio rápido, preciso y semicuantitativo de detectar agentes infecciosos como las salmonelas (Luk et al., 1997).

Investigadores evaluaron un PCR-ELISA, que se basa en oligonucleótidos marcados con digoxigenina específicos, los cuales son revelados por ELISA, lo cual permite detectar simultáneamente las seis mutaciones comunes en el gen GALT, que causa la galactosemia que es un trastorno autosómico recesivo. Este método es rápido y adecuado para el análisis de un gran número de muestras (Muralidharan & Zhang, 2003).

Un grupo de investigadores de nacionalidad china evaluaron un Nested PCR-ELISA (desarrollado por ellos) para la detección de MTB en 659 muestras clínicas de las cuales 601 eran pulmonares y 58 no pulmonares. Ellos compararon esta metodología frente a un Nested-PCR convencional y a un PCR automatizado, encontrando que el Nested PCR-ELISA tuvo un rendimiento del 97% y una especificidad del 100%, comparable con el PCR automatizado pero superior al Nested-PCR convencional. Además, el estudio señaló que el Nested PCR-ELISA proporciona un diagnóstico molecular sensible y de bajo costo para países con alta prevalencia de tuberculosis, a diferencia de usar el automatizado de mayor costo (Yam et al., 2004).

Un grupo de investigadores (Sow et al., 2006) utilizaron 3 técnicas como son el PCR-ELISA, PCR convencional y método de Murray para detectar cepas de *Trypanosoma congolense* var. Savannah (TCS) de muestras de piel de bovino. Los autores compararon la efectividad de las 3 técnicas siendo la de PCR-ELISA más sensible y específica.

Investigadores iraníes utilizaron un sistema de genotipado PCR-ELISA, prueba simple y rápida en los laboratorios para el cribado masivo y el diagnóstico prenatal el cual es fundamental para la detección rápida de cuatro mutaciones puntuales de b-talasemia comunes en iraníes: IVS-

II-1 (GA), IVS-I-5 (GC), FSC 8/9 (+ G), IVS-I-110 (GA), la cual es uno de los trastornos genéticos más prevalentes en Irán (Gill et al., 2006).

Un equipo de investigadores desarrollaron y validaron una reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa múltiple combinada con un ensayo de hibridación de micropocillos (RT-PCR-ELISA) para detectar 19 patógenos respiratorios entre virus y bacterias, debido a que las infecciones agudas del tracto respiratorio inflige una gran carga de enfermedad en los niños de todo el mundo, para ello de un total de 430 muestras respiratorias se analizaron retrospectivamente en paralelo tanto con el m-RT-PCR-ELISA como con cultivos o ensayos individuales de RT-PCR. La sensibilidad media (mediana) del m-RTPCR-ELISA en la prueba retrospectiva fue del 93,3% (95,1%; rango 83,3-100%), y la especificidad media (mediana) fue 99,8 y 100% (rango 98,6-100%), respectivamente. Finalmente, el RT-PCR-ELISA, funciona bien como cualquier técnica de RT-PCR usada en el diagnóstico de rutina (Puppe et al., 2013).

En un estudio se utilizó la técnica de PCR-ELISA, para la detección de 4 genotipos (b1, b2, b3 y b4) principales de la glucoproteína B, que es el principal componente de la envoltura de *Citomegalovirus humano* (VHCM), en aislados clínicos de pacientes con infección por dicho virus. Los autores al optimizar la hibridación, encontraron la diferenciación entre los genotipos de la glucoproteína B, la cual fue factible utilizando sondas específicas para cada genotipo en el sistema PCR-ELISA. Además, comprobaron una elevada repetibilidad del sistema de detección ( $r=0.979$ ), por lo que la proponen como una técnica flexible, aplicable y confiable para el diagnóstico semicuantitativo y la tipificación del virus (Talkhabifard et al., 2017).

Investigadores de Brasil desarrollaron una plataforma de laboratorio para el diagnóstico de *Schistosoma mansoni* por PCR-ELISA. Para ello se evaluó el PCR-ELISA en 206 muestras de heces recolectadas de individuos que viven en una zona brasileña de baja endemicidad. De lo cual

obtuvieron como resultado, que el PCR-ELISA indicó una tasa de prevalencia del 25,2%, superior a la de Kato-Técnica de Katz (18,4%) y menor que la plataforma comercial basada también en PCR-ELISA (30,1%). Considerando, la técnica de Kato-Katz como referencia, hubo 97,4% y 91,1% de sensibilidad relativa y tasas de especificidad, respectivamente. La plataforma de laboratorio presentó buena precisión, diagnóstico de rendimiento y se puede utilizar en reemplazo de la plataforma comercial para diagnóstico de esquistosomiasis por PCR-ELISA (Senra et al., 2018).

Para la detección de MTB se encontró escasa información sobre el uso de la técnica PCR-ELISA, a excepción de un grupo de investigadores españoles (García et al., 2001), que utilizaron esta técnica para predecir la susceptibilidad a RIF del complejo *M. tuberculosis* en 30 muestras de esputo positivas de las cuales sólo 28 muestras fueron detectables por la técnica, 9 fueron RIF resistente mientras 19 fueron susceptibles. Los resultados obtenidos fueron concordantes con las pruebas de sensibilidad a medicamentos y la secuenciación, las 2 muestras restantes no se interpretaron debido a la baja carga bacilar y no pudo ser detectada por la técnica. Los autores mencionan que esta técnica posee gran sensibilidad al detectar 0.1pg de ADN y que solo detecta al complejo de MTB diferenciándolo de otras bacterias. El PCR-ELISA es, por lo tanto, lo suficientemente sensible no solo para la detección de resistencia a la RIF en organismos cultivados sino también para la detección directa en muestras clínicas. Por último, ellos mencionan que se pudo detectar 10 de las 11 mutaciones de *rpoB* observadas en su estudio, incluidas las de los codones 531 y 526, más frecuentes que se encuentran en España (García et al., 2001).

Por último, una tesis desarrollada por (Vásquez, 2018) utilizando la técnica de PCR-ELISA, detectó la mutación puntual Serina-Treonina en el codón 315 del gen *katG*, que le confiere la resistencia a INH en pacientes peruanos con TB.

### **1.3 Objetivo**

#### ***1.3.1 Objetivo General***

- Optimizar un PCR-ELISA para detectar la resistencia a Rifampicina en muestras de pacientes con tuberculosis.

#### ***1.3.2 Objetivos Específicos***

- Síntesis de sondas prediseñadas para la detección de las mutaciones: H445Y, H445D y S450L asociadas a la resistencia a Rifampicina.
- Optimizar el PCR para la amplificación del gen rpoB.
- Estandarizar los parámetros del ELISA como: Diferentes Temperaturas de Hibridación, Diferentes astringencias del Buffer de Hibridación, Concentración de Estreptavidina, Concentración de Sonda, Concentración de Producto de PCR y Concentración de Conjugado en el ELISA
- Evaluar la sensibilidad y la especificidad del PCR-ELISA para la detección de las mutaciones.
- Evaluar la capacidad del PCR-ELISA para detectar la resistencia a RIF en muestras de esputo (Ensayo Piloto).

#### 1.4 Justificación

Microorganismos como las bacterias sufren mutaciones a nivel genético producto del ambiente en el que están inmersos, estas mutaciones en el transcurso del tiempo producen organismos mejor adaptados, pero en su mayoría este proceso es más acelerado por modificaciones introducidas por el ser humano como el uso de antibióticos al medio que rodea al microorganismo.

Por ello, existe gran interés en combatir la enfermedad y eliminarla utilizando fármacos antituberculosis, lo que ha generado resistencia. La presión selectiva ha logrado que las mutaciones se fijen en el genoma del bacilo generando variantes genéticas resistentes a drogas que tienen gran facilidad de diseminarse; además otros factores como la falta de compromiso con el tratamiento, prescripción inapropiada y baja calidad del fármaco antituberculoso, han ocasionado que MTB se haya vuelto Multidrogorresistente (MDR) lo que ha generado un gran problema de salud pública en nuestro país.

Lamentablemente, los métodos de diagnóstico microbiológico como son el método de proporciones, el APP y el método MODS duran varios días incluso semanas, a diferencia de emplear los métodos de diagnóstico y detección molecular como el Genexpert, que tiene un tiempo de detección de 2h y GenotypeMDRTBplus 72 hrs, pero a pesar de ser rápidos y eficientes es necesario una mejora tecnológica por cada laboratorio que desee emplearlos debido a los equipos que se usan, el costo de reactivos, la capacitación del personal y mejoramiento de las instalaciones, todo esto conlleva a una gran inversión, estas razones hacen pensar, en buscar una técnica molecular fácil, rápida y menos costosa.

La técnica PCR-ELISA que combina un PCR convencional y el ensayo de inmunoabsorción en una sola técnica de diagnóstico nos ofrece, rendimiento, rapidez, costo

accesible y podría ser implementado en hospitales y centros de salud de nuestro país. Esta técnica ha demostrado ser eficiente tal como ha sido reportada en muchos trabajos citados pero realizados en otros microorganismos.

El PCR-ELISA es una herramienta más sensible, porque la hibridación específica y la reacción enzimática colorimétrica aumentan la señal positiva de los productos de PCR unidos a la sonda y marcados con biotina. Por lo tanto, no solo existe un riesgo reducido en el uso de materiales mutagénicos y una reducción significativa de la posible contaminación del ADN, sino que también permite que el método sirva como una herramienta cuantitativa.

Entonces, se propone este trabajo de tesis para estandarizar la detección de la resistencia a RIF utilizando PCR-ELISA y su evaluación en un ensayo piloto.

## 1.5 Hipótesis

- Hipótesis nula: La prueba PCR-ELISA permite detectar mutaciones en el gen *rpoB*, que confieren resistencia a Rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis*.

- Hipótesis alterna: La prueba PCR-ELISA no permite detectar mutaciones en el gen *rpoB*, que confieren resistencia a Rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Bases Teóricas

#### 2.1.1 *La tuberculosis y Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* fue descubierto en 1882 por Roberto Koch, es de aspecto bacilar recto y alargado, mide 0.4 x 3 micras, pertenece al orden Actinomycetales, a la familia Mycobacteriaceae y al género *Mycobacterium* (Ramirez et al., 2002).

#### Clasificación taxonómica

Dominio: Bacteria

Filo: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales

Familia: Mycobacteriaceae

Género: *Mycobacterium*

Especie: *Mycobacterium tuberculosis*

**Fuente:** Citado por (Riojas et al., 2018).

Son bacilos inmóviles, aerobios y no formadores de esporas, con una cubierta cética que les hace retener la tinción roja después de ser tratadas con ácido, de ahí que se nombren también bacilos acidorresistentes (BAAR) (Morán & Lazo, 2001).

Su pared celular es compleja, posee un alto contenido de lípidos, proteínas y polisacáridos; es rica en ácido micólico, el cual se encuentra unido covalentemente con glucolípidos tales como  $\alpha$ ,  $\alpha'$ - tetrahalosa dimicolato (TDM) y  $\alpha$ ,  $\alpha'$  trihalosa monomycolato (TMM), esta barrera permeable protege al organismo del medio ambiente, contribuye a la persistencia de la enfermedad y a la resistencia a muchos antibióticos a la vez que contribuye a la longevidad de la micobacteria y que además está involucrado en las reacciones inflamatorias del huésped y actúa en la



patogénesis de la enfermedad. (Ramirez et al., 2002). Externamente, hay otras 3 capas compuestas: una por polímeros de arabinosa y galactosa, otra formada por ácidos micólicos (que son ácidos grasos derivados) y otra superficial formada por lípidos como los sulfolípidos, el cord factor, llamado así por su aparente asociación con la forma acordonada con que se agrupan las micobacterias virulentas y los micósidos (Ramirez et al., 2002).

#### **2.1.1.1 Sistema de numeración consenso asociado a la resistencia a Rifampicina.**

Telenti y colaboradores sugirieron que la resistencia a la rifampicina en el complejo *M. tuberculosis* se asoció con mutaciones en el gen *rpoB*, y observó una alta similitud de los aminoácidos codificados entre varias especies bacterianas incluyendo *Escherichia coli*, *M. tuberculosis complex* y *M. leprae*. Dado que las mutaciones descritas en su trabajo se identificaron en una región *rpoB* que alineado con el RRDR (Región Determinante de la Resistencia a la Rifampicina) de *E. coli*, por lo tanto, propuso un sistema de anotación basado en la secuencia genética de *E. coli* (Telenti et al., 1993).

Probablemente estos autores subestimaron, la diversidad total de la secuencia del gen *rpoB*, y por ende luego afectaría nuestra capacidad de informar correctamente mutaciones de nucleótidos, que causan sustituciones de aminoácidos. Además, aunque ellos reconocieron que en la región *rpoB* las mutaciones pueden estar ubicadas fuera del RRDR, no prestaron atención a la baja similitud entre *E. coli* y *Mycobacterium tuberculosis complex* en *rpoB* fuera del RRDR. La existencia e importancia epidemiológica de estas mutaciones de resistencia "no RRDR" más tarde fue confirmada (Andre et al., 2017). Esto ha causado cierta confusión, porque las mismas mutaciones ahora se nombran de manera diferente dependiendo del autor, el año y la revista que publicó el trabajo.

Es por eso que se detalla la propuesta de cambio hacia un sistema de numeración basado en las secuencias de referencia de micobacterias como se muestra en la Tabla 1. Según Andre, esto debería permitir una mejor comunicación entre los laboratorios, especialmente en un momento en que la secuenciación del genoma completo está convirtiéndose en el estándar para detectar resistencia a los medicamentos, mejorando la vigilancia de enfermedades y difusión más rápida de la información científica.

**Tabla 1**

*Conversión entre los dos sistemas de numeración coexistentes para las mutaciones en rpoB más frecuentes asociadas con la resistencia a rifampicina entre Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae y Mycobacterium kansasii (Andre et al., 2017).*

<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (GenBank AL123456)		<i>M. leprae</i> TN (GenBank AL583923)		<i>M. kansasii</i> ATCC 12478 (GenBank CP006835)		<i>Escherichia coli</i> (GenBank V00339)	
WT nucleotide sequence (aminoacid)	Codon position (conversión from <i>E. coli</i> numbering)	WT nucleotide sequence (aminoacid)	Codon position (conversión from <i>E. coli</i> numbering)	WT nucleotide sequence (aminoacid)	Codon position (conversión from <i>E. coli</i> numbering)	WT nucleotide sequence (aminoacid)	Codon position
GTC (Val)	170(+24)					GTT (Val)	146
GGC (Gly)	426(-81)	GGC (Gly)	432(-75)			GTT (Gly)	507
CTG (Leu)	430(-81)	CTG (Leu)	436(-75)			CTG (Leu)	511
CAA (Gln)	432(-81)	CAA (Gln)	438(-75)			CAG (Gln)	513
GAC (Asp)	435(-81)	GAC (Asp)	441(-75)	GAC (Asp)	442(-71)	GTC (Val)	516
CAC (His)	445(-81)	CAC (His)	451(-75)	CAC (His)	445(-71)	CAC (His)	526
TCG (Ser)	450(-81)	TCG (Ser)	456(-75)	TCG (Ser)	460(-71)	TCC (Ser)	531
CTG (Leu)	452(-81)	CTG (Leu)	458(-75)			CTC (Leu)	533
ATC (ile)	491(-81)					ATC (ile)	572

Nota 1. WT: tipo salvaje. La homología en cuanto a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las diferentes micobacterias y *E. coli* se resalta en verde. Las diferencias son resaltado en rojo (Andre et al., 2017).

### **2.1.2 Diagnóstico de la enfermedad**

El diagnóstico de la Tuberculosis se realiza mediante: 1) Baciloscopia directa de la muestra de esputo debe ser procesada por el método de Ziehl - Neelsen, 2) Diagnóstico microbiológico con cultivos en medios sólidos: Löwenstein – Jensen, Ogawa y agar 7H10; los sistemas automatizados en medio líquido MGIT (del inglés Mycobacteria Growth Indicator Tube) y la prueba MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility) y 3) Diagnóstico Molecular mediante el uso de sondas de hibridación como el GenotypeMDRTBplus y Genexpert, adicionalmente de TRUENAT y TB-LAMP.

**2.1.2.1 Diagnóstico por Baciloscopia.** Se realiza mediante Técnicas de tinción o Baciloscopias que tienen por objetivo, poder visualizar en el microscopio la presencia o no de BAAR en las muestras de esputos (Tabla 2). Actualmente siguen siendo la forma más rápida y económica para diagnosticar la TB (Dorronsoro & Torroba, 2007). Dado que su sensibilidad (40 – 70%) y su especificidad no son absolutas porque requieren un mínimo 5000 a 10 000 bacilos/mL, para dar un diagnóstico positivo. Es necesario realizar siempre cultivos para confirmar el diagnóstico. Existen multitud de variantes descritas de técnicas para las baciloscopias; incluso las hay para observadores daltónicos (Dorronsoro & Torroba, 2007). No obstante, las dos más utilizadas son:

**a. La tinción de Ziehl-Neelsen.** Utiliza fucsina y fenol junto con el calentamiento de las preparaciones. Las micobacterias se tiñen de rojo, colorante que perdura pese a la posterior decoloración con una mezcla de alcohol-clorhídrico, sobre un fondo azul o verde, según se utilice como colorante de contraste el azul de metileno o el verde malaquita. Debe observarse con el objetivo de inmersión (1000x), debido a que en muchas preparaciones la presencia de bacilos

puede ser escasa, es necesario un mínimo de 10 minutos de observación antes de valorar el examen como negativo (Dorronsoro & Torroba, 2007).

**b. Las tinciones con Fluorocromos.** Emplean como primer colorante la auramina-rodamina. Se tiñen en frío y, como en el caso anterior, tampoco se decolora con la mezcla de alcohol-clorhídrico. Al observarlos en un microscopio de fluorescencia, las micobacterias emiten una luz fluorescente. Esta luz emitida puede ser detectada rápidamente. Las preparaciones se observan con un objetivo de menor aumento, con lo que la superficie visualizada es mayor, lo cual hace que la tinción resulte más sensible y requiera menos tiempo de observación (1-2 minutos) sin embargo, el inconveniente con esta técnica radica en la dificultad del enfoque, la necesidad de un microscopio de fluorescencia y que genera daños con el tiempo en la vista del observador. (Dorronsoro & Torroba, 2007).

**Tabla 2**

*Niveles de positividad por cruces (+) para un examen de Baciloscopia. Según NT N.º 104- (MINSAs, 2013).*

Resultados examen microscópico	Informe resultados de baciloscopia
No se observa bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) en 100 campos observados	Negativo (-)
Se observa de 1 a 9 BAAR en 100 campos observados (paucibacilar)	Número exacto de bacilos en 100 campos
Menos de un BAAR promedio por campo en 100 campos observados (10-99 bacilos en 100 campos)	Positivo (+)
De 1 a 10 BAAR promedio por campo en 50 campos observados	Positivo (++)
Más de 10 BAAR promedio por campo en 20 campos observados	Positivo (+++)

**2.1.2.2 Diagnóstico Microbiológico.** A diferencia de la microscopía, el cultivo continúa siendo el método de referencia por su buena sensibilidad y permitir el diagnóstico de la mayoría de las 185 especies del género *Mycobacterium* descritas en la actualidad, así como acceder a estudios posteriores con el aislado micobacteriano (identificación, sensibilidad y tipificación epidemiológica). No obstante, el mayor inconveniente del cultivo es la lentitud de crecimiento del bacilo tuberculoso, que retrasa el diagnóstico de la enfermedad (Alcaide, 2017). Para el diagnóstico de la enfermedad los métodos microbiológicos serían los cultivos en medios sólidos Löwenstein – Jensen, Ogawa y agar 7H10.

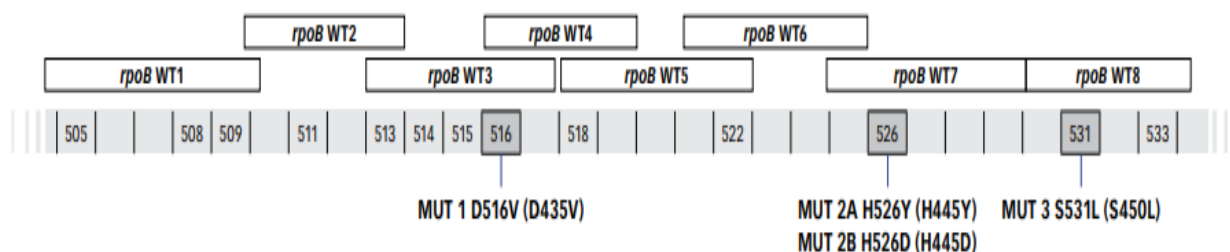
Si bien el cultivo ha tenido un gran desarrollo en las dos últimas décadas, mediante nuevo medios y sistemas automatizados no radiométricos como el *MB Bact ALERT*®, *VersaTREK*® y *BD MGIT TBc identification test*®. (Alcaide, 2017).

### 2.1.2.3 Diagnóstico Molecular

a. **GenotypeMDRTBplus Versión 2.** El GenotypeMDRTBplus detecta mutaciones en la región determinante de resistencia (RRDR) del gen *rpoB* entre el codón 505 al 533, para detectar la resistencia a RIF (Figura 1) y mutaciones en el promotor *inhA* (de -16 a -8 nucleótidos upstream) y la mutación S315T del gen *katG* para identificar la resistencia a Isoniacida (Stop TB Partnership, 2019).

#### Figura 1.

Región determinante de la resistencia a rifampicina detectada por GenotypeMDRTBplus (Stop TB Partnership, 2019).



**b. GENEXPERT MTB/RIF.** El Xpert MTB/RIF es una prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real recomendada por la OMS desde el 2010, que es capaz de detectar simultáneamente la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina (TB-RR) en un plazo de 2 h (Arias & Herrera, 2016).

**c. GENEXPERT MTB/RIF ULTRA.** Esta prueba utiliza la tecnología Xpert, pero con mayor sensibilidad para detectar TB en muestras con Baciloscopia (BK) negativa que el actualmente recomendado. El Xpert MTB/RIF ULTRA tiene un límite de detección a 10 UFC/mL, un nivel que es similar o mejor que el del cultivo líquido. Se espera llegar a una sensibilidad mayor al 90%, con una especificidad de 100% en pacientes BK negativos con cultivos positivos (Arias & Herrera, 2016).

**d. GENEXPERT XDR.** Esta prueba que utiliza la tecnología Xpert, detecta genes de resistencia para isoniacida, fluoroquinolonas y aminoglicósidos. Estaría recomendado para pacientes que tengan un resultado positivo de resistencia con el Xpert MTB/RIF o Xpert MTB/RIF ultra (Arias & Herrera, 2016).

**e. TB LAMP.** Otro método molecular recomendado por OMS para reemplazar la BK ha sido TB-LAMP que fue desarrollado por *Eiken Chemical Company Ltd. (Tokio, Japón)* que elaboró un kit comercial de detección de MTB la cual es una prueba molecular rápida basada en la amplificación isotérmica mediada por bucle para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y que diagnostica la tuberculosis en una muestra de esputo y que requiere menos de una hora y se puede leer a simple vista bajo luz ultravioleta. (World Health Organization, 2016). Por lo tanto, TB-LAMP no debe reemplazar el uso de pruebas moleculares que detectan la TB y

la resistencia a rifampicina, especialmente entre las poblaciones en riesgo de tuberculosis multirresistente (World Health Organization, 2016).

**f. *TRUENAT MTB*.** Es un ensayo que utiliza un chip basado en un PCR en tiempo real para la detección del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* directamente desde muestras de esputo y pueden informar resultados en menos de una hora. El ensayo utiliza dispositivos automatizados operados por baterías para extraer, amplificar y detectar específicos loci de ADN genómico. Cabe señalar que si se obtiene un resultado positivo con el ensayo Truenat MTB se toma una alícuota de ADN extraído para ejecutar el ensayo Truenat MTB-RIF para detectar mutaciones asociadas con la resistencia a RIF. La OMS lo recomienda en adultos y niños con signos y síntomas de TB pulmonar además de como prueba de diagnóstico inicial para la tuberculosis en lugar de frotis o cultivo (WHO, 2021).

### **2.1.3 *Tratamiento de la enfermedad***

**2.1.3.1 Perfil de Resistencia a medicamentos antituberculosis (anti-TB).** Según la Norma Técnica N°104 (MINSA, 2013). Los casos de tuberculosis se clasifican de acuerdo con su sensibilidad a medicamentos anti-TB realizadas mediante pruebas convencionales de la siguiente manera:

**a. *TB pansensible*.** Caso en el que se demuestra la sensibilidad a todos los medicamentos de primera línea por pruebas de sensibilidad convencional.

**b. *TB multidrogorresistente (TB-MDR)*.** Caso con resistencia simultánea a isoniacida y rifampicina por pruebas convencionales.

**c. *TB extensamente-resistente (TB-XDR)*.** Caso con resistencia simultánea a isoniacida, rifampicina, una fluoroquinolona y un inyectable (amikacina, kanamicina o capreomicina) detectado por prueba rápida molecular o convencionales.

**d. Otros casos de TB drogoresistente.** Caso en el que se demuestra resistencia a medicamentos anti-tuberculosis sin cumplir criterio de TB MDR. Pueden ser:

**d.1 TB monorresistente.** Caso en el que se demuestra, a través de una Prueba de Sensibilidad (PS) convencional, resistencia solamente a un medicamento anti-tuberculosis.

**d.2 TB polirresistente.** Caso en el que se demuestra, a través de una PS convencional, resistencia a más de un medicamento anti-tuberculosis sin cumplir criterio de TB- MDR.

Los medicamentos antituberculosis (anti-TB) se clasifican en grupos según su eficacia, propiedades y evaluación clínica de su efectividad anti- tuberculosis. Norma Técnica NTN°10 (MINSa, 2013).

- Grupo 1.- Agentes de primera línea: isoniacida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (E), pirazinamida (Z), rifabutina (Rfb), estreptomycin (S).
- Grupo 2.- Agentes inyectables de segunda línea: Kanamicina (Km), amikacina (Am), capreomicina (Cm).
- Grupo 3.- Fluoroquinolonas: Levofloxacin (Lfx), Moxifloxacin (Mfx).
- Grupo 4.- Agentes de segunda línea bacteriostáticos orales: Etionamida (Eto), cicloserina (Cs), ácido para-amino salicílico (PAS).
- Grupo 5.- Agentes con evidencia limitada: Clofazimina (Cfz), Linezolid (Lzd), Amoxicilina/ Clavulánico (Amx/Clv), Meropenem (Mpm), Imipenem/ Cilastatina (Ipm/Cln), dosis altas de isoniacida, Claritromicina (Clr), Tioridazina (Tio).

Según la NTN°104-MINSa (2013) modificada en el año 2018 con Resolución Ministerial N° 752 (MINSa, 2018) , se detalla el tratamiento para la TB sensible, donde a los pacientes se les prescribe, por 2 meses, 4 drogas antituberculosis las cuales son: isoniacida, etambutol, rifampicina y pirazinamida por 3 veces a la semana o de manera diaria.



Para el tratamiento de los pacientes con TB resistente con esquema estandarizado, se prescriben los siguientes fármacos: Etambutol, pirazinamida, Levofloxacina, Kanamicina, Etionamida y cicloserina, los cuales reciben por 6-8 meses de manera diaria lo que corresponde a una primera fase de tratamiento y una segunda fase, que dura entre 12-16 meses, con los siguientes fármacos: Etambutol, Pirazinamida, Levofloxacina, Kanamicina y Cicloserina.

Para el tratamiento de TB-MDR se realiza en dos fases:

- Primera fase: Kanamicina, Moxifloxacino, Clofazimina, Pirazinamida, isoniacida en altas dosis y Etambutol por 4-6 meses.
- Segunda fase: Moxifloxacino en altas dosis, Clofazimina, Pirazinamida, y Etambutol por 5 meses.

El esquema de tratamiento para TB-XDR solo puede ser recibido por pacientes que no tengan las siguientes condiciones: La ineficacia de quinolonas y/o inyectables de segunda línea, tratamiento previo por más de un mes con fármacos de segunda línea, embarazo y TB extrapulmonar.

Se debe considerar un núcleo básico que debe incluir 3 medicamentos:

- ✓ Núcleo básico vía oral: Linezolid, Bedaquiline y Delamanid.
- ✓ Núcleo básico vía endovenoso: Linelizod, Carbapenem y Tioridazina.

**2.1.3.2 Mecanismos de Resistencia a medicamentos antituberculosos en *Mycobacterium tuberculosis*.** Varios factores que promueven la resistencia antimicrobiana (RAM) podrían estar implicados en el aumento de los casos de TB-MDR y TB-XDR en diversos países del mundo. Dentro de las propiedades de las micobacterias, pero en especial en MTB se incluyen factores que se han relacionado con resistencia constitutiva y resistencia adquirida a medicamentos anti-tuberculosis (Gómez-Tangarife et al., 2018).

**a. *Fármaco-resistencia constitutiva.*** La resistencia constitutiva o intrínseca, se define como la fármaco-resistencia de cualquier especie bacteriana que no ha sido adquirida como resultado de la exposición a antibióticos. En MTB se ha atribuido al hecho de poseer una pared celular compleja que le confieren una característica hidrófoba con permeabilidad celular restringida para un gran número de compuestos antibacterianos, modificación y degradación enzimática de medicamentos principalmente a la metilación del ARNr (Gómez-Tangarife et al., 2018).

**b. *Fármaco-resistencia adquirida.*** En bacterias, la resistencia genética generalmente es mediada a través de la adquisición de genes exógenos a través de plásmidos, transposones, integrones y bacteriófagos. Sin embargo, en MTB no se han reportado mecanismos de adquisición de genes de resistencia por dichos elementos (Gómez-Tangarife et al., 2018).

### **2.1.3.3 Mecanismos de Resistencia**

**a. *Resistencia a Isoniacida (INH).*** Ha sido la piedra angular de todos los regímenes efectivos para el tratamiento de la enfermedad e infección latente de TB. *Mycobacterium tuberculosis* es altamente susceptible a la INH (Zhang & Yew, 2015). Actúa específicamente en la fase de replicación activa. Hay 2 genes asociados a la resistencia a INH los cuales son: *katG* y *inhA*.

La isoniácida, es la forma hidrácida del ácido nicotínico, así mismo es un profármaco de gran actividad sobre MTB que, al ser captada por la bacteria, es activada por el sistema catalasa-peroxidasa de la micobacteria lo que conlleva a la inhibición específica de la síntesis de ácidos micólicos, sin afectar la de otros ácidos grasos (Fontalvo Rivera & Gómez Camargo, 2015). La ausencia de actividad catalasa debido a mutaciones en el gen *katG*, es uno de los mecanismos de resistencia a la isoniácida.

La presencia de mutaciones o deleciones en este gen se ha relacionado con el 42-58% de las mutaciones que se localizan mayormente en los codones 300 al 507 de las cepas de MTB resistentes a INH, que tiene un tamaño de 1.771 pares de bases (pb); las mutaciones se localizan en el codón 315 Ser, el cual cambia a cualquiera de los siguientes aminoácidos: Thr, Asn o Arg y el residuo 463 Leu por Arg (Fontalvo Rivera & Gómez Camargo, 2015).

Otra causa de resistencia a isoniacida son mutaciones que afectan al gen *inhA*, que codifica la síntesis de la proteína enoil ACP reductasa, implicada en los pasos de elongación de ácidos grasos de MTB y se ha identificado como blanco de acción de la INH. La isoniacida activada interfiere con la síntesis de ácido micólico por inhibición de la NADH dependiente de la enoil ACP reductasa en MTB (Fontalvo Rivera & Gómez Camargo, 2015).

El 25% de las mutaciones se localizan en el codón 94 (Ser→Ala), 21 (Ile→Thr, Va), 258 (Ile→Thr). Las mutaciones en el gen *inhA*, no solo causa resistencia a la isoniacida, sino también a la Etionamida (Fontalvo Rivera & Gómez Camargo, 2015).

**b. La Resistencia a Rifampicina (RIF).** Aparece después de la resistencia a otros medicamentos anti-TB, y es por esto que se ha convertido en un marcador de TB-MDR (Gómez-Tangarife et al., 2018). Respecto a su mecanismo de acción, la RIF se une a la ARN polimerasa de MTB e interfiere durante el proceso de replicación y síntesis del ADN. La ARN polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por cuatro subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  y  $\sigma$ ; codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, respectivamente. Se ha demostrado que mutaciones en *rpoB* producen cambios conformacionales en la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa, disminuyendo la afinidad por RIF y otorgando resistencia al fármaco. El gen *rpoB* tiene un tamaño de 3.534pb, el 96 o 97% de las mutaciones que causan resistencia a RIF están localizadas en una región de

81pb entre los codones 507 a 533 y consisten por lo general en mutaciones puntuales no sinónimas (Fontalvo Rivera & Gómez Camargo, 2015).

#### **2.1.3.4 Frecuencia de mutaciones**

**a. Frecuencia de Mutaciones de Rifampicina.** La rifampicina (RIF) juega un papel fundamental en el tratamiento de la tuberculosis debido a sus efectos bactericidas. Debido a que la acción de RIF se encuentra en el gen que codifica la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa, el 95% de las mutaciones resistentes a RIF están presentes en el gen *rpoB* (Zaw et al., 2018).

En los aislados resistentes a RIF, las mutaciones en los codones 531, 526 y 516 de *rpoB* son las más comunes en todo el mundo generando un alto nivel de resistencia; Sin embargo, las frecuencias de los SNP en estos tres codones fueron variables en diferentes regiones geográficas. (Zaw et al., 2018). Sin embargo, las mutaciones específicas en los codones 511, 515, 518 y 522 se asocian con un nivel menor de resistencia a la RIF.

La resistencia a la RIF se toma como un marcador sustituto de la tuberculosis resistente a los medicamentos porque la aparición de la resistencia a la rifampicina fue relativamente lenta en comparación con otros antibióticos (Zaw et al., 2018).

**b. Frecuencia de mutaciones de RIF en Perú.** Un estudio de (Agapito et al., 2002), reportó 62 cepas de MTB (52 RIF resistente y 10 RIF sensible) ellos obtuvieron las siguientes mutaciones en *rpoB*: 62.7% en el codón 531(58.8% cambio S531L y 3.9% cambio S531W). El 15.7% en el codón 526 (7.9% cambió H526L, 5.9% de H526Y y 1.9% cambió H526D). 11.8% en el codón 516 (5.9% cambió D516V, 1.9% D516Y, 1.9% D516H y 1.9% cambió D516A). 5.9% en el codón 513(1.9% cambió Q513P, 1.9% Q513K y 1.9% cambió Q513L). Para los codones 522, 527, 533, 520, 511 y 512, la frecuencia de mutación fue 1.9% de cada uno. En un estudio realizado por (Asencios Solis, Galarza, et al., 2012) encontraron mutaciones de resistencia en la región core del gen *rpoB*; con respecto a RIF, encontrando que el 82.2% de todas las mutaciones encontradas en esa región, siendo las mutaciones Mut3 y Mut1(S531L y D516V respectivamente) las más frecuentes; sin embargo, existe un 14,4% de las muestras cuya resistencia se debe a la ausencia de las bandas WT, lo que indicaría que hay otras mutaciones presentes en estas muestras y que no se encuentran fijadas en la tira reactiva del GenotypeMDRTBplus.

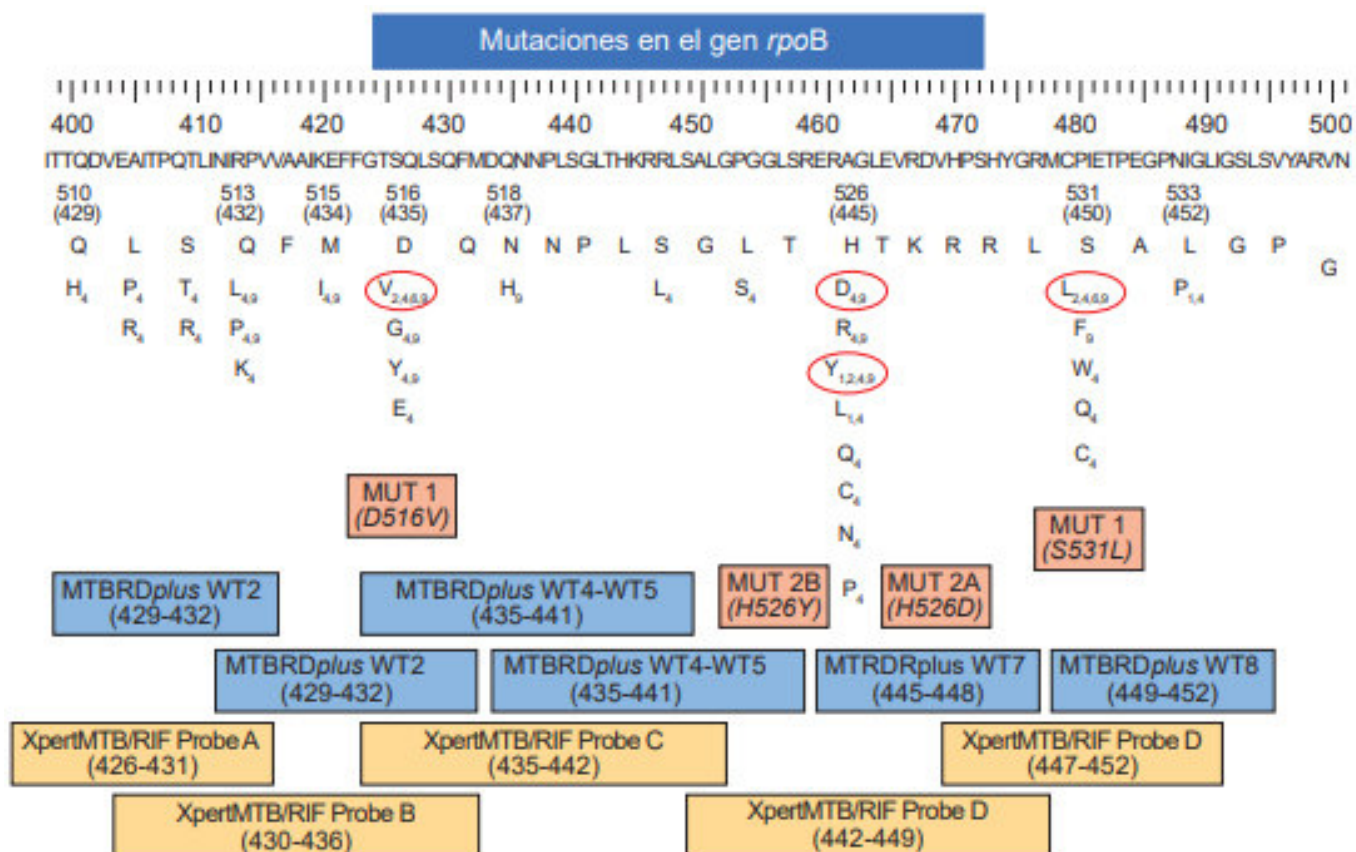
La banda WT 7 señala las posiciones de los codones 526 a 529, dentro de esa región, la sonda de mutación Mut 2A detecta la mutación en el codón 526 (H526Y, histidina por tirosina) mientras que la sonda Mut2B detecta el cambio H526D (histidina por ácido aspártico), la ausencia de WT 7 y sus correspondientes sondas de mutación indican que la mutación se dio en posiciones de codones cercanos a la posición 526, es decir que se puede haber dado en las posiciones 527, 528 o 529 (Asencios Solis, Galarza, et al., 2012).

Una revisión sistemática de la literatura científica hecha por (Vigo et al., 2019) en la caracterización molecular de mutaciones presentes en cepas de MTB con resistencia a fármacos antituberculosis de primera línea detalla las mutaciones: D435V, H445Y, H445D y S450L, las

cuales poseen una alta frecuencia de mutación (Figura 2) las cuales fueron detectadas por la metodología Xpert® MTB/RIF y GenoType MTBDRplus® de manera directa e indirecta.

### Figura 2.

*Mutaciones a nivel de AA (aminoácidos) reportadas para el gen rpoB (Vigo et al., 2019).* Como se detalla los cuadros azul y rojo indican la mutación reportada por la metodología GenoType MTBDRplus® v2.0 y el cuadro naranja por la metodología Xpert® MTB/RIF. Los círculos en rojo son las mutaciones de alta frecuencia en el gen rpoB que confiere la resistencia a RIF.



## 2.1.4 Métodos de determinación de la resistencia a drogas de primera línea en

### *Mycobacterium tuberculosis*

#### 2.1.4.1 Métodos Microbiológicos

a. **Método de las Proporciones.** Es uno de los métodos aprobados desde el año 2006 por la Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis N.º 041-MINSA/DGSP-V.01 (MINSA, 2006) como prueba de sensibilidad descrita por (Canetti et al., 1963), el cual compara el

número de colonias desarrolladas en medios con diferentes diluciones de antibióticos, respecto a las desarrolladas en los medios sin antibióticos, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco. Fue considerado el “Gold standard” para sensibilidad a INH, RIF, etambutol y estreptomycin. La ventaja del método es que es altamente reproducible y de bajo costo; sin embargo, la gran desventaja es que toma mucho tiempo para emitir un resultado en promedio de 60 a 90 días (Piffardi F. et al., 2004).

**b. *Método de APP.*** Prueba de referencia “Proporciones agar en placa” (APP) para determinar la resistencia a INH y RIF, para la determinación de susceptibilidad a drogas anti-TB (Asencios Solis, Galarza, et al., 2012). Era considerada el “Gold standard”, el método consiste en sembrar un inóculo estandarizado en medios de cultivo preparados y observar el crecimiento en el medio control sin drogas comparado con el crecimiento en medio con drogas en concentraciones críticas. Al realizar el conteo de colonias proveniente de la placa conteniendo las drogas, siendo la interpretación del resultado considerada como “proporciones críticas”, si la proporción crítica fue mayor a 1%, se informa como “resistente”. El método de APP demora 30 días a partir del cultivo para la obtención del resultado (Asencios Solis, Galarza, et al., 2012).

**c. *La Prueba de Griess o Nitrato Reductasa*** Prueba colorimétrica de detección de sensibilidad de drogas de primera línea, siendo éste es uno de los métodos aprobados por la Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis N° 041-DGSP-V.01 (MINSA, 2006) como prueba rápida para la detección de resistencia a INH y RIF a partir de muestras de esputos. La gran ventaja que ofrece este método es que fue creada para poder ser realizado con materiales accesibles para cualquier laboratorio (Ugarte-Gil et al., 2008).

Este método utiliza la actividad de la enzima nitrato reductasa de la bacteria que se usa en cultivos(LJ) al cual se le añade  $\text{NaNO}_3$ , que es usado como sustrato para evaluar la reducción de nitrato a nitrito y que se puede evidenciar por la formación de un color rojo grosella con el reactivo de Griess es una solución que resulta de la combinación de ácido clorhídrico (HCl) al 50%, Sulfanilamida al 0.2% y de N-(1-Naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride al 0.1% (Asencios Solis, Sloutsky, et al., 2012). Este cambio de color permite la detección temprana del crecimiento de MTB al comparar tubos controles sin fármacos de tubos que contienen fármacos anti-TB. Los organismos sensibles crecerán y, de esta manera, desarrollarán un cambio de color en el medio sin fármaco, pero no crecerán en el medio con fármacos y, por lo tanto, no producirán un cambio de color. Las cepas resistentes crecerán y cambiarán de color en tubos “control” sin fármacos y en tubos que contienen fármacos (Asencios Solis, Sloutsky, et al., 2012). Ofrece resultados de 10 a 14 días a partir de un cultivo positivo o de muestras de esputo con baciloscopia positiva (Cuevas-Córdoba & Zenteno-Cuevas, 2010). Será negativo el resultado cuando no hay cambio de color o es un color rosado pálido, y es un resultado positivo si es un color rosado brillante hasta un rojo o violeta (Ugarte-Gil et al., 2008).

#### **d. *Métodos de cultivo líquido***

##### **El método de Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS)**

Es un método de diagnóstico rápido desarrollado por la Universidad Peruana Cayetano Heredia que permite tanto la detección de MTB como la determinación de la susceptibilidad directa a drogas de primera línea (Caviedes & Moore, 2007). Para la detección de resistencia a INH y RIF. Se basa en tres principios:



1. *M. tuberculosis* crece más rápido en medios líquidos en comparación con medios sólidos.
2. La morfología del *M. tuberculosis* en cultivos líquidos es característica y reconocible, la que consiste en cordones formados por los microorganismos.
3. La incorporación de drogas anti-TB permite evaluar la susceptibilidad a rifampicina e isoniacida.

En Perú se ha desarrollado la prueba rápida MODS, una prueba fenotípica que detecta el crecimiento de microcolonias con patrón de cordones, que son agregación de bacilos tuberculosos formando estructuras serpenteantes que es único de MTB (Mendoza & Gotuzzo, 2008).

El método MODS se basa en un cultivo directo de muestras de esputo en medio líquido, que detectan a MTB y evalúan la susceptibilidad frente a INH y RIF directamente de dichas muestras. El crecimiento bacteriano característico de MTB visualizado tempranamente en el medio, a través del uso de un microscopio de luz invertida, detectándose las microcolonias en un promedio de 8 a 15 días, desde la obtención de la muestra hasta la emisión de los resultados (Asencios Solis, Acurio Usca, et al., 2012).

**e. El método *Bactec Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT 960)*.** El método de cultivo bacteriológico automatizado BACTEC MGIT 960 (*Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Inc.*) permite obtener resultados de pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosis en un menor tiempo que el método de las proporciones y a gran escala (permite 960 cultivos); sin embargo, tiene un costo mucho más alto. A diferencia del BACTEC 460, el BACTEC MGIT 960 presenta la ventaja considerable de ser un método no radioactivo lo cual lo hace más seguro para el personal de laboratorio (Tortoli et al., 2002).

Es un sistema para crecimiento y detección de MTB completamente automatizado, que tiene un tubo indicador de crecimiento micobacteriano, que contiene el medio de cultivo Middlebrook 7H9 con antibióticos, funciona mediante un sensor especial de fluorescencia sensible al consumo de O<sub>2</sub> de la bacteria, que permite monitorear el crecimiento microbiano debido a la metabolización activa de los microorganismos mediante unos sensores fluorométricos (Pfyffer et al., 2002).

En relación a la capacidad del BACTEC MGIT 960 para dar resultados de sensibilidad a drogas de primera línea, se ha encontrado una sensibilidad de 100% para las cuatro drogas (isoniazida, rifampicina, etambutol y estreptomycin) y un rango de especificidad de 89.8% para estreptomycin hasta 100% para rifampicina; siendo el tiempo promedio para emisión de resultados de 6.5 días (Pfyffer et al., 2002). La desventaja son los altos costos que conllevan al comprar el equipo y capacitación del personal.

#### 2.1.4.2 Métodos Moleculares

**a. *Métodos basados en la Hibridación de ácidos nucleicos*** La hibridación sucede en ácidos nucleicos o proteínas en solución. Estas moléculas interactúan a una temperatura propicia que permita la hibridación mediante el uso de un buffer de hibridación, que contiene cationes monovalentes de sodio. Estos buffers de hibridación pueden variar en su concentración de sales de sodio esta condición toma el nombre de “astringencia” (Rose et al., 2002). Lo cual conlleva a diversos tipos de buffers de hibridación como:

- **Buffers de baja astringencia:** Usan mayor concentración de sales de sodio y generan menor astringencia; lo cual permite conservar uniones con un semi-apareamiento de bases o parcialmente apareadas en el híbrido de ADN (oligo-producto de PCR).

- **Buffers de alta astringencia:** Usan menor concentración de sales de sodio y generan mayor astringencia; lo cual evita conservar un mal apareamiento o uniones parciales de los híbridos de ADN eliminando esas uniones. Para conservar solo uniones de alto apareamiento de bases (Poulsen et al., 2008).

Adicionalmente, permite que las moléculas de ADN y/o proteínas en solución interactúen con superficies sólidas donde pueden llegar a adsorberse en ellas. Las superficies más utilizadas son las membranas de nitrocelulosa y de nylon. Esta propiedad de interacción no ha sido clarificada del todo, pero se plantea la hipótesis de que existan interacciones no covalentes como interacciones hidrofóbicas o de cargas parciales, entre las biomoléculas y la superficie (Peña-Castro et al., 2013).

La técnica original se conoce, por su nombre en inglés, como “Southern Blot”. Consiste en adsorber o fijar una muestra de ADN (digerida por enzimas de restricción y separada previamente de manera electroforética) en una membrana, en presencia de un agente que rompa los puentes de hidrógeno intermoleculares (ej. NaOH), lo que significa desnaturalizar la estructura del ADN en la membrana. Las moléculas contenidas en la muestra adsorbida en la membrana, de las cuales se busca obtener información específica, se llaman "blanco". Posteriormente, otra molécula de ADN en solución, también desnaturalizada (por calor) o de cadena simple, se hace interactuar con el ADN fijado en la membrana a una temperatura que permita un reconocimiento de bases lo más específico posible (temperatura de hibridación). Esta molécula que servirá para extraer información sobre el blanco, se denomina "sonda". Si la sonda ha sido marcada con radioactividad o grupos antigénicos (capaces de interactuar con anticuerpos) o por quimioluminiscencia, producirá manchas oscuras en la zona de hibridación si se le expone a una placa fotográfica. El patrón de manchas producidas indicará la presencia de hibridación entre la sonda y su blanco, y dará información sobre su tamaño, frecuencia y abundancia en la muestra (Southern, 1975).

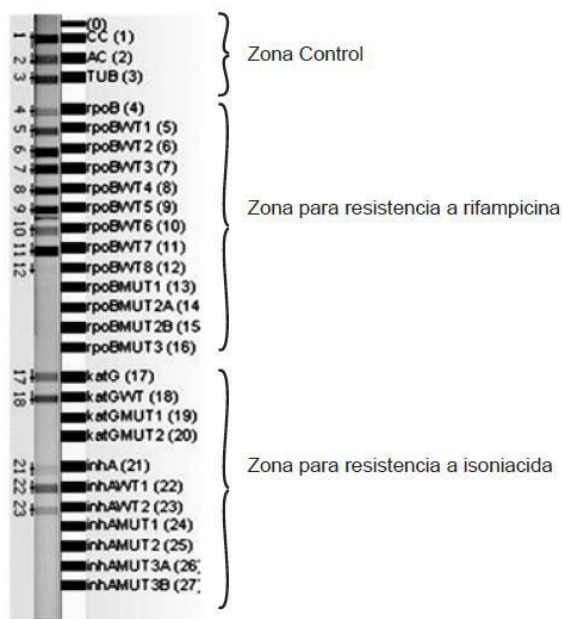
**b. El método Genexpert MTB/RIF.** Es un método automatizado que detecta y amplifica la región *rpoB* de 81pb donde se producen mutaciones en RIF por PCR en tiempo real, pero no diferencia entre las diferentes especies dentro del complejo de MTB (Helb et al., 2010). Cinco mutaciones en la región de interés de MTB determinante de la resistencia, ocurren en el 95 al 98% de todas las cepas resistentes a la RIF, y están casi siempre ausentes en las cepas susceptibles a la RIF, siendo detectadas por 5 sondas fluorescentes las cuales emiten señal que es captada mediante un sensor y cuantificada mediante un software (Helb et al., 2010), a partir de muestras de esputo en menos de 2hrs (Boehme et al., 2010), con riesgo biológico mínimo y muy poca formación técnica para su operación, pero exigen una infraestructura demasiado costosa de instalar y mantener.

**c. Line probe assay (LPA).** Uno de los diferentes sistemas de Line probe assay para la detección de microorganismos es la prueba GenotypeMDRTBplus (Hillemann et al., 2007), que utiliza tiras reactivas de nitrocelulosa (tecnología DNA Strip), que contienen regiones parciales de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* fijadas sobre ella. La prueba está basada en un PCR multiplex que genera múltiples productos de amplificación los cuales, mediante una hibridación reversa, reconocen las mutaciones génicas, más frecuentes asociadas con la resistencia a INH y RIF como bandas en la tira reactiva. Tiene un tiempo aproximado de entrega de resultados de 72hrs (Asencios Solis, Galarza, et al., 2012). Una tira de GenotypeMDRTBplus como se muestra en la Figura 2, contiene un total 27 bandas de reacción: las primeras 21 bandas se componen por 11 bandas wild type (WT) que no presentan mutaciones y 10 bandas de resistencia a antibióticos (MUT) y 6 bandas control que incluyen controles de conjugado y amplificación para los genes *rpoB*, *katG* y *inhA*. De las 11 bandas WT están incluidas 8 bandas para el gen *rpoB*, 1 banda WT para el gen *katG* y 2 bandas WT para el gen *inhA*, mientras que las 10 bandas MUT incluyen 4

bandas con mutaciones para el gen *rpoB*, 2 bandas con mutaciones para el gen *katG* y 4 bandas con mutaciones para el gen *inhA*. La presencia de una o más bandas MUT, la ausencia de una o más bandas WT o la combinación de ambas en cada zona de la droga, será señal de la existencia de cepas resistentes a una droga o a ambas (Asencios Solis, Galarza, et al., 2012).

### Figura 3.

*Patrón representativo de bandas en tira reactiva del GenotypeMDRTBplus. Fuente (Asencios Solis, Galarza, et al., 2012).*

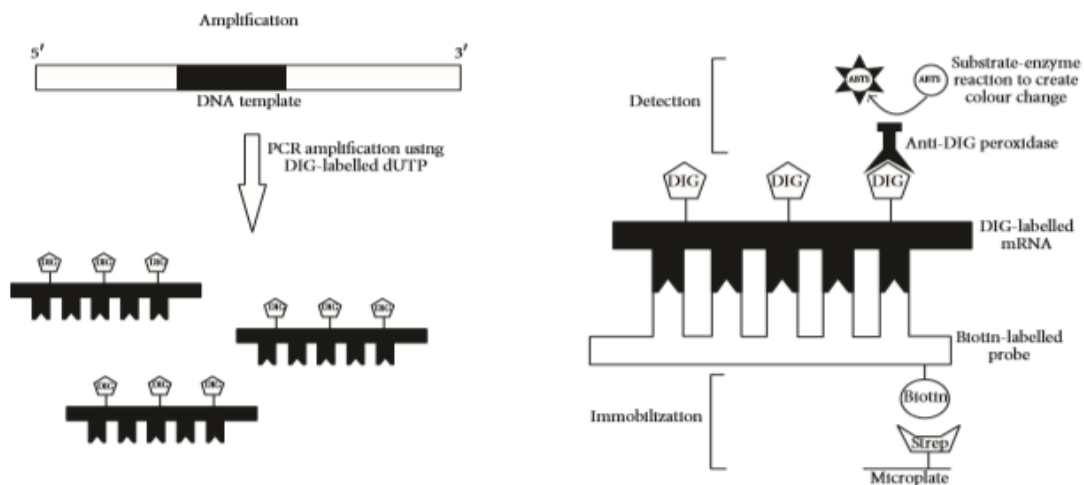


d. **Técnica de PCR-ELISA.** Es un método inmunológico que permite marcar un producto de PCR mediante el uso de primers con la etiqueta de digoxigenina o amplificar el gen de interés a través de PCR en presencia de un nucleótido modificado llamado digoxigenina-11-dUTP (DIG-dUTP). Todo el método implica 3 pasos: amplificación, inmovilización y detección (Figura 4a). Al comienzo del método, los productos de PCR marcados con DIG se unirán a sondas oligonucleotídicas específicas, que pueden ser marcadas con biotina, avidina u otra molécula en

su extremo 5'; el siguiente paso consiste en inmovilizar el gen de interés en una microplaca, un ejemplo de ello se puede lograr con la presencia de estreptavidina que recubre las microplacas y la interacción de ella con la biotina en el extremo 5' del híbrido formado (Sonda-producto de PCR).

#### Figura 4a.

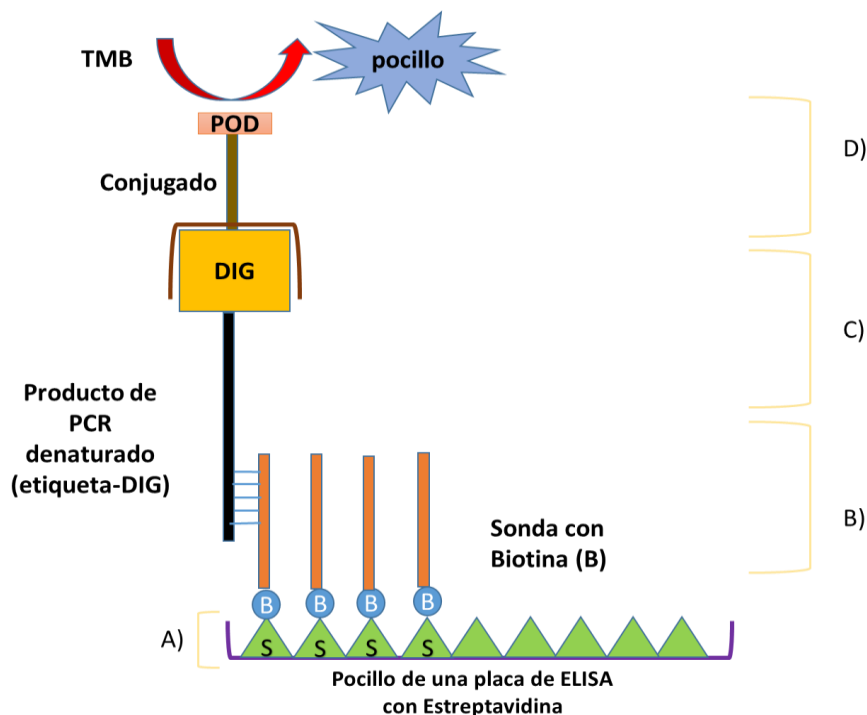
*Esquema del PCR- ELISA. Fuente (Sue et al., 2014).*



El resto de productos inespecíficos que no se hibridaron a una temperatura adecuada, serán lavados, después de la impregnación. El híbrido formado entre la sonda y el producto de PCR no se puede detectar a simple vista. Para hacerlo, los amplicones de PCR se pueden detectar utilizando un conjugado anti-DIG-peroxidasa a través del sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) u otro 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina sulfonato (ABTS) (Sue et al., 2014). Esto puede depender que enzima utiliza (peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina). Estos desarrollarán una reacción enzimática y colorimétrica que es visible y medida con un espectrofotómetro (figura 4b).

**Figura 4b.**

*Sistema PCR-ELISA para la detección de la resistencia a RIF en MTB el cual se dividió en: A. Inmovilización B. Hibridación C. Detección y D) Revelado (Elaboración propia).*



e. **Secuenciación genómica.** Esta técnica es la más precisa y es considerada como el estándar molecular para definir genotípicamente a una cepa drogoresistente, permite obtener la ubicación concreta de las mutaciones e identificar y analizar la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN específico. Consiste en amplificar por PCR la región del gen de interés y que el producto sea analizado por un secuenciador automático, el cual finalmente presenta la sucesión de nucleótidos (Cuevas-Córdoba & Zenteno-Cuevas, 2010). La determinación de la secuencia genómica del bacilo de la TB ha permitido estudiar los determinantes genéticos de la resistencia a antibióticos y construir bases de datos asociadas, así como el desarrollo de todo un nuevo conjunto de pruebas moleculares para el diagnóstico de MTB y para la determinación genotípica de

resistencia a los fármacos antituberculosis (Comas & Gil, 2016); sin embargo, las limitaciones de esta técnica son los altos costos del equipo, los materiales y reactivos que se requieren, y la necesidad de contar con personal altamente capacitado.



### III. MÉTODO

#### 3.1 Tipo de investigación

Esta tesis fue de tipo experimental porque se optimizó un PCR- ELISA para detectar la resistencia a RIFAMPICINA en muestras de pacientes con tuberculosis. Se analizó la concordancia del PCR-ELISA frente al método de referencia GenotypeMDRTBplus.

#### 3.2 Ámbito temporal y espacial

El presente trabajo se realizó entre junio 2020 a mayo 2021, en el laboratorio de Biotecnología y de Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud ubicado en la Av. Defensores del Morro N° 2268 de la sede en Chorrillos, Lima-Perú.

#### 3.3 Variables

- Variable independiente: Las mutaciones asociadas a la resistencia a RIF.

- Variable dependiente: Determinación de la resistencia a rifampicina a través de PCR-ELISA.

#### 3.4 Población y Muestra

##### 3.4.1 Población

Para la evaluación piloto, se obtuvieron 20 muestras de esputo de pacientes con TB que ingresaron al Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud (INS) sede de Chorrillos, para la detección de la resistencia utilizando la técnica de GenotypeMDRTBplus. Las muestras provinieron de una población mensual de 200 muestras que ingresan a dicho laboratorio.

##### 3.4.2 Muestra

Para la estandarización de la técnica de PCR-ELISA; se utilizó el ADN de las siguientes cepas: ATCC N° 27294 pansensible (H37Rv), fue utilizada como control sensible a todas las drogas, ATCC N° 35838 con resistencia a RIF, fue utilizada como control para la resistencia a RIF en la posición S450L y 2 cepas (RIF- 8853 y RIF- 4469) de *Mycobacterium tuberculosis* en

medio de cultivo Lowenstein-Jensen que fueron usadas como control para las mutaciones H445D y H445Y que dan resistencia a RIF, provenientes del LRNM del INS.

### **3.5 Instrumentos**

#### **3.5.1 Equipos de laboratorio**

1. Termociclador (*Applied Biosystems modelo Verity*), se usó para poder llevar a cabo la Reacción en cadena de la polimerasa.
2. Cámara de Electroforesis horizontal (*Cleaver Scientific*), se usó para poder separar fragmentos de ADN según su tamaño y/o peso molecular, para poder verificar la presencia de ADN de la extracción y verificar la amplificación del producto de PCR.
3. Horno de Hibridación (*ILLUMINA*), equipo que permitió lograr la hibridación entre el producto de PCR y la sonda a una temperatura adecuada.
4. Analizador Genético (*Applied Biosystems modelo 3500XL*), equipo que permitió verificar la presencia de las mutaciones a RIF del gen *rpoB* por secuenciamiento de ADN en las muestras analizadas por el PCR- ELISA.
5. Baño maría (*Grant Instruments*), equipo que permitió calentar a diferentes temperaturas las soluciones a utilizar.
6. El fluorómetro Qubit 2.0 (*Thermo Scientific*) equipo que permitió medir las concentraciones de ADN de las muestras con una alta precisión y sensibilidad.
7. Nanodrop 8000 (*Thermo Scientific*) equipo que permitió medir la pureza de los extraídos de los controles.

### 3.6 Procedimientos

El procedimiento llevado a cabo en esta Tesis consistió en 2 partes: La estandarización de la técnica PCR-ELISA y la evaluación piloto.

#### 3.6.1 Estandarización de la técnica

Se estableció una metodología de PCR para amplificar un segmento de 255pb, que contiene la región rpoB de 81 pb donde se localizan el 95% las mutaciones que confieren la resistencia a RIF. Se estandarizaron los diferentes parámetros como: La temperatura de annealing de los primers y concentración de cloruro de magnesio. Para la estandarización de un ELISA se evaluó y diseñó una metodología de ELISA, que usó en vez de antígeno un producto de PCR y una sonda en vez de anticuerpo, para la detección de 3 mutaciones (H445Y, H445D y S450L) que son muy frecuentes en la resistencia a RIF. Se determinaron los siguientes parámetros:

- Evaluación de las diferentes temperaturas de hibridación del producto de PCR con la sonda.
- Evaluación de las diferentes astringencias del buffer de hibridación.
- Concentración de estreptavidina
- Concentración de sonda para cada mutación (H445Y, H445D y S450L).
- Concentración de producto de PCR a usar en el ELISA.
- Concentración de conjugado
- Evaluación de la sensibilidad de cada sonda por la técnica de ELISA.
- Evaluación de la especificidad del sistema con muestras de otras Micobacterias No Tuberculosas (MNTB).

Se utilizaron 3 controles (H445Y, H445D y S450L) que son productos de PCR que provienen de cepas resistentes y un control sensible (H37Rv). Establecida la metodología se evaluó el PCR-ELISA en un ensayo piloto.

**3.6.1.1 Extracción de ADN de las muestras de esputos por CTAB-Lisozima.** Para la extracción de ADN se usaron muestras de esputo y 4 controles (descritos en el punto 3.4.2), cada muestra fue colocada en un tubo con agua MiliQ, para la inactivación de la bacteria a 80°C por 30 minutos. Se utilizó el método de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y lisozima el cual fue estandarizado por Vásquez (2018) detallado en el Anexo B.

Este protocolo CTAB y lisozima (CTAB-lyz) demora alrededor de 2 días para lograr la mayor cantidad y calidad de ADN, se usó una CBS Clase II (*LABCONCO*), para minimizar cualquier riesgo al operador por algún aerosol liberado durante la extracción del ADN

**3.6.1.2 Cuantificación de la concentración de ADN de las muestras de esputos.** Para la medición de concentración de los ADN control y muestras se usó el fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Scientific). El cual se basó en la utilización de un fluoróforo que se intercala específicamente entre las moléculas de cadena de doble de ADN, minimizando así los efectos de los contaminantes y logrando una precisión de las mediciones incluso a bajas concentraciones (rango de 10 pg a 1 µg) se utilizó un kit de alta sensibilidad (dsHS DNA Qubit Assay, Invitrogen) con un fluoróforo de adhesión a doble cadena. La preparación de los reactivos fue según las instrucciones del kit (Anexo C). Esta medición se realizó en unidades de ng/mL; sin embargo, no permite obtener un valor de pureza del ADN.

Se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop™ 8000 (*Thermo Scientific*), para la medición de la pureza del ADN en ng/µL, obtenido de los controles. Se consideró que el ADN de buena calidad con tasas de absorbancia A260/280 entre 1.8 - 2.0 (Sambrook et al., 1989).

La medición por espectrofotometría permite cuantificar ADN debido a que los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta (UV) por la presencia de bases nitrogenadas aromáticas. Tanto la purina y pirimidina tiene su propio y único espectro de absorción lo cual contribuye a la

absorción total de UV de la molécula de ADN de 260 nm (Instituto de Biotecnología, 2015). Debido a la propiedad de los ácidos nucleicos un espectrofotómetro no diferencia cadenas simples y dobles dando una concentración de hasta 10 veces la medida en un fluorómetro. debido a que no discrimina entre moléculas de ADN de hebra simple y ARN (Servei Genòmica Bioinformàtica, 2016).

**3.6.1.3 Electroforesis de ADN y Productos de PCR.** Para la visualización de la calidad de los ADN extraídos por el método de CTAB y lisozima se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (OMNIPUR) utilizando una cámara de electroforesis. La corrida fue realizada a 120V por 30 minutos. Se utilizó 2 uL de buffer de carga (Invitrogen) con 5 uL de muestra de ADN, adicionalmente se usó 2 µL de marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). La electroforesis fue realizada utilizando el buffer de corrida TAE 1X.

Para los productos de PCR se usó todos los parámetros anteriores, excepto que la concentración del gel de agarosa fue de 1.5% y una corrida a 120V por 40 minutos. Luego de la corrida, se tiñó el gel con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL.

Posteriormente el gel se observó en un transiluminador de luz UV a una longitud de onda de 302 nm. El gel fue fotografiado mediante el uso del Foto-documentador de imágenes (*Chemidoc XRS, Bio-rad*) y las fotos fueron guardadas en formato JPG, para su posterior edición.

**3.6.1.4 Estandarización del PCR** Para una región del gen *rpoB*. Para estandarizar el PCR, se tomó como referencia la concentración de los componentes y el ciclaje de (Garcia et al., 2001). En la estandarización del PCR se utilizó una concentración de 15ng de ADN (H37Rv) con este control se estableció los parámetros de temperatura de hibridación de los primers (RP4T y RP8T) que amplifican el gen *rpoB* y la concentración de cloruro de magnesio. (Tabla 3).

**Tabla 3***Componentes del PCR para una región del gen rpoB*

<b>Componentes del PCR</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>
Buffer PCR	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 Mm	2.5 mM
dNTP's	10 mM	0.25 mM
Primer Forward (RP4T)	10 µM	0.25 µM
Primer Reverse (RP8T)	10 µM	0.25 µM
Taq DNA Polymerase Recombinante	5U/ µL	1.5U/µL
ADN de H37Rv (15ng)		

**a.** *Estandarización de la Temperatura de Hibridación de los primers.* . Se estandarizó un PCR para el gen rpoB considerando 6 diferentes temperaturas de hibridación de los primers (Tabla 4), teniendo en consideración la temperatura melting (T<sub>m</sub>) descrita en la hoja técnica de la síntesis de cada primer (RP4T y RP8T).

Los primers fueron sintetizados por la empresa Eurofins y diseñados según (Garcia et al., 2001), como se observa en la tabla 5.

**Tabla 4***Ciclaje de amplificación en gradiente de temperatura del gen rpoB*

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
<b>Denaturación Inicial:</b>	95 °C	10 minutos	1 ciclo
<b>Denaturación:</b>	95 °C	30 segundos	
	60°C		
	61°C		
<b>Temperatura de Hibridación de los primers:</b>	62°C	45 segundos	35 ciclos
	63°C		
	64°C		
	65°C		
<b>Extensión:</b>	72 °C	30 segundos	
<b>Extensión Final:</b>	72 °C	5 minutos	1 ciclo

**Tabla 5***Secuencias de los primers y su Temperatura melting (T<sub>m</sub>).*

Nombre del primer	Secuencia	T <sub>m</sub> °	PM
RP4T	5'- GAGGCGATCACACCGCAGACGT- 3'	68.3°C	7521.3
RP8T	5'- [Amino CG+ Dig] CCCCTCAGGGGTT- 3'	68.3°C	6754.4

**b. Estandarización de la concentración de MgCl<sub>2</sub>.** Se estandarizó un PCR evaluando 5 diferentes concentraciones finales de MgCl<sub>2</sub> con la finalidad de determinar la concentración óptima de este ion y que favorezca la amplificación del gen rpoB. (Tabla 6).

**Tabla 6***Distintas concentraciones de cloruro de magnesio*

		Concentración inicial	Concentración final
			0 mM
			1 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM		1.5 mM
			2 mM
			3 mM

**3.6.1.5 PCR de las muestras extraídas.** Se realizó un PCR siguiendo los parámetros optimizados (tabla 20 y 21), utilizando una concentración de 10 ng para las muestras de ADN y los 4 controles (descritos en el punto 3.4.2).

**3.6.1.6 Secuenciamiento de una región del gen rpoB.** Para secuenciar la región rpoB se realizó un PCR de las muestras control siguiendo el ciclaje de la tabla 21, posteriormente los productos amplificados fueron purificados utilizando el Kit PureLink (*Invitrogen*), ver anexo D y luego fueron cuantificados utilizando el fluorómetro Qubit 2.0.

Se preparó la reacción de secuenciamiento siguiendo lo descrito en el anexo E, se añadió 15 ng de producto purificado a dicha reacción. Luego, se realizó el PCR de secuenciamiento siguiendo el ciclaje descrito en el anexo E.

Se purificaron los productos de la reacción de secuenciamiento utilizando el kit Dye Ex 2.0 (*QIAGEN*), ver anexo F. Los productos purificados fueron colocados en una placa de PCR y evaporados a 70°C por 10 minutos. A cada pocillo se le añadió 10 µL de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*).

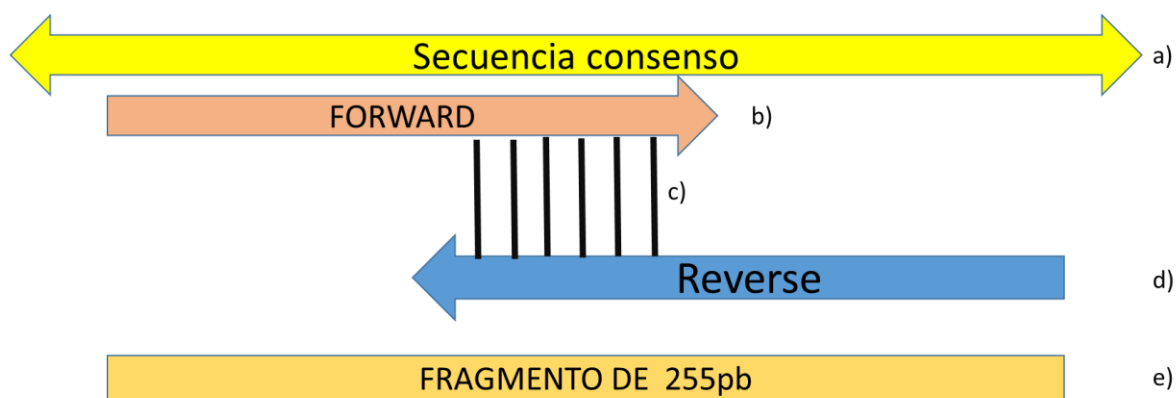


Posteriormente, la placa que contenía las muestras fue denaturada a 95°C por 5 minutos en un bloque térmico y colocada en hielo por 5 minutos. Finalmente se colocó la placa en un cassette y se colocó al analizador genético 3500 XL (*Applied Biosystems*) para su secuenciamiento.

**3.6.1.7 Análisis de Secuencias.** Se analizaron los cromatogramas de los controles resistentes obtenidos del Analizador genético mediante el programa FinchTV para eliminar las secuencias de mala calidad en los extremos de los cromatogramas, luego se guardaron las secuencias en formato FASTA. Posteriormente, las secuencias fueron analizadas con el programa BioEdit para obtener una secuencia consenso (CONTIG), que es producto de una superposición (traslape) entre la secuencia forward y reverse. Para poder visualizar el traslape entre estas, el programa genera una secuencia consenso en formato FASTA. (Figura 5).

**Figura 5**

*Imagen de la superposición de las secuencias forward y reverse que generó una secuencia consenso. Se detalló lo siguiente: a) secuencia consenso b) secuencia forward c) traslape entre el forward y reverse d) secuencia reverse y e) fragmento de 255pb que contiene una región del gen rpoB (Elaboración propia).*



La secuencia consenso de cada control y la secuencia de referencia se analizaron con el programa ExPASy <https://web.expasy.org/translate/> utilizando la herramienta Translate tool, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos y el marco de lectura (FRAME) correspondiente.

Finalmente, se usó el programa online CLUSTAL W <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>, que permitió alinear las secuencias de aminoácidos de las muestras control con la secuencia de aminoácidos del genoma de referencia (H37Rv) para identificar las mutaciones puntuales necesarias para la estandarización posterior del ELISA.

**3.6.1.8 Estandarización del PCR- ELISA.** Para el protocolo de ELISA, Se consideró la publicación realizada por (Garcia et al., 2001) y la tesis de pregrado de (Vásquez, 2018) ambos trabajos alusivos al PCR-ELISA y a su estandarización, teniendo los parámetros iniciales (tabla 7). Por ello, se estableció un protocolo que facilite la hibridación del producto de PCR con la sonda resistente, que detecta una mutación específica del gen *rpoB* asociada a la resistencia a RIF. Se utilizó el buffer de hibridación Solución Salina Fosfato EDTA (SSPE 6X) descrito por (Masake et al., 2002).

**Tabla 7**

*Parámetros iniciales de la estandarización del ELISA*

Parámetros Iniciales del ELISA	Concentración	Volumen
Estreptavidina	40 µg/mL	50 µL
Sondas con etiqueta de Biotina	7.5 pmol/ mL	10 µL
producto de PCR	-	10 µL
Conjugado	150 mU (1/1000)	100 µL

Se estandarizaron los siguientes parámetros para el ELISA: a) Evaluación de las diferentes temperaturas de hibridación, b) evaluación de las diferentes concentraciones de astringencia del buffer de hibridación, c) diferentes concentraciones de estreptavidina, d) concentraciones de sonda, e) concentraciones de producto de PCR y f) diferentes concentraciones de conjugado marcado con peroxidasa (POD). Además, se evaluó la sensibilidad y especificidad de la técnica.

**Sondas de ADN:** Las sondas son porciones de oligonucleótidos de 22 a 24 nucleótidos, las cuales se mandaron a sintetizar por la empresa Eurofins y fueron marcadas con Biotina en el extremo 5' – 3'. Cada sonda detecta una mutación asociada a la resistencia a Rifampicina (Tabla 8). El nombre del primer y su numeración mostrada en la tabla 8, fueron denominadas según el genoma de *Escherichia coli*; *sin embargo* actualmente la nomenclatura y numeración consenso es de acuerdo al genoma de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* (Andre et al., 2017).

**Tabla 8**

*Secuencias de sondas utilizadas en el estudio*

GEN	Nombre del primer según genoma de <i>E. Coli</i> (Telenti et al., 1993).	Nomenclatura según (Andre et al., 2017).	Secuencia de 5' a 3'	Temperatura de Melting
	a) rif526Y-R	H445Y	[Biotin~5]GGGTTGACCTACAAGCGCCG	66.6°C
	b) rif526D-R	H445D	[Biotin~5]GTTGACCGACAAGCGCCG	64.5°C
rpoB	c) rif531L-R	S450L	[Biotin~5]GACTGTTGGCGCTGGGG	64.4°C
	d) rif526-S	H445	[Biotin~5]GTTGACCCACAAGCGCCG	64.5°C
	e) rif531-533-S	S450	[Biotin~5]GACTGTCCGCGCTGGGG	66.8°C

**a. Evaluación de las diferentes temperaturas de Hibridación del producto de PCR con la sonda.** Se estandarizaron diferentes temperaturas de hibridación con la finalidad de hallar la temperatura óptima en la cual el producto de PCR se complementa adecuadamente con la sonda. Para ello, se utilizaron 2 sondas sensibles y 3 sondas resistentes mencionadas en la tabla 8.

Se evaluaron las siguientes temperaturas de hibridación: 42°C, 45°C, 48°C, 50°C, 52°C, 55°C y 58°C; teniendo en cuenta la temperatura melting (Tm), así como la información de la hoja técnica de síntesis de cada sonda.

**b. Evaluación de las diferentes astringencias del Buffer de Hibridación.** Se probaron diferentes astringencias del buffer de hibridación (SSPE) siendo las siguientes: 0.5X (alta), 1.5 X (media) y 3X (baja), para determinar la concentración adecuada del buffer SSPE para que ocurra una correcta hibridación entre la sonda y el producto de PCR.

**c. Estandarización de la Concentración de Estreptavidina.** Se preparó una solución de estreptavidina que estaba liofilizada de la siguiente manera: Se le agregó 1 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q para obtener una concentración stock de 1 mg/mL, es decir, 1000 µg/mL. (Ver anexo G).

Una vez hidratada se preparó una dilución de 40 µg/mL de estreptavidina en buffer carbonato pH 9.6, a partir de esta se obtuvieron las diferentes concentraciones a evaluar (tabla 9) con la finalidad de poder determinar la concentración adecuada de estreptavidina y así poder fijar una concentración precisa de sonda.

Finalmente se añadió 100 µL de cada concentración de estreptavidina en los pocillos de una placa de ELISA y esta se dejó impregnar a 4°C toda la noche. Al día siguiente se continuó con el resto de los pasos del protocolo de PCR-ELISA.

**Tabla 9***Diferentes concentraciones de Estreptavidina*

<b>Concentración Inicial de Estreptavidina</b>	Volumen añadido de la concentración de Estreptavidina	Volumen de Buffer Carbonato pH 9.6	Concentración Final de la Estreptavidina a evaluar en el ELISA
40 µg/mL	2.5 µL	97.5 µL	1 µg/mL
	5 µL	95 µL	2 µg/mL
	10 µL	90 µL	4 µg/mL
	20 µL	80 µL	8 µg/mL
	25 µL	75 µL	10 µg/mL
	50 µL	50 µL	20 µg/mL
1000 µg/mL	4 µL	96 µL	40 µg/mL
	6 µL	94 µL	60 µg/mL
	8 µL	92 µL	80 µg/mL

**d. Estandarización de la Concentración de Sonda.** Para poder determinar la concentración de sonda óptima, se preparó soluciones de cada sonda que estaba liofilizada, siguiendo las pautas de la hoja técnica respectiva. Las sondas fueron resuspendidas en agua libre de DNasas a una concentración stock de 100 µM, luego se les realizó una dilución 1/100 para obtener una dilución a 1 µM de sonda equivalente a 100 pmol/mL (anexo G). Para la estandarización de este parámetro se utilizó 5 diferentes concentraciones (0.5, 1, 5, 10 y 20 pmol/mL), a partir de la sonda S450L usada como control (tabla 10).

**Tabla 10***Diferentes concentraciones de Sonda*

<b>Concentración Inicial de sonda (S450L)</b>	Volumen añadido de la concentración de sonda	Volumen de Buffer PBS en pH 7.2	Concentración Final de la sonda en el ELISA
10 pmol/ mL	5 µL	95 µL	0.5 pmol/mL
	10 µL	90 µL	1 pmol/mL
	50 µL	50 µL	5 pmol/mL
100 pmol/ mL	10 µL	90 µL	10 pmol/mL
	20 µL	80 µL	20 pmol/mL

**e. Estandarización de la Concentración de Producto de PCR.** Con el propósito de determinar la concentración adecuada de producto de PCR que permita hibridar la sonda.

Para la estandarización de este parámetro se evaluaron 5 diferentes concentraciones de producto de PCR: 0.25 ng, 0.5 ng, 1 ng, 2 ng y 4 ng como concentración final para los 3 controles resistentes (descritos en el punto 3.4.2). Previamente, los productos de PCR (depositados cada uno en tubos de 0.2 mL independientes), fueron denaturados en un bloque térmico (Thermoblock) a 95°C por 20 minutos e inmediatamente los productos de PCR fueron colocados en frío por 15 minutos (shock térmico). Luego, se usó un volumen de buffer de Hibridación según se indica en la tabla 11, que luego se combinó con el producto de PCR denaturado respectivo para su hibridación en los pocillos de la placa de ELISA que contienen 10 µg de estreptavidina. Se continuó desde el paso 7, del protocolo de PCR-ELISA el cual se detalla en el Anexo G.

**Tabla 11***Diferentes concentraciones de producto de PCR*

<b>Concentración Inicial de Producto de PCR</b>	Volumen añadido de la concentración de Producto de PCR	Volumen de Buffer de Hibridación (SSPE 3X)	Concentración Final del Producto de PCR
14.4 ng/ $\mu$ L	2 $\mu$ L	98 $\mu$ L	0.25 ng
	3.5 $\mu$ L	96.5 $\mu$ L	0.50 ng
	7 $\mu$ L	93 $\mu$ L	1 ng
	14 $\mu$ L	86 $\mu$ L	2 ng
	28 $\mu$ L	72 $\mu$ L	4 ng

f. ***Estandarización de la Concentración de Conjugado Anti-digoxigenina-POD.*** Se preparó una solución de conjugado de la siguiente manera: Se resuspendió el conjugado que estaba liofilizado al cual se le agregó 1 mL de H<sub>2</sub>O Milli-Q para obtener una concentración stock de 150 U/mL (anexo G). Para la estandarización de este parámetro se realizó una dilución seriada para obtener 4 diferentes concentraciones del conjugado 50mU (1/3000), 75mU (1/2500), 100mU (1/2000) y 150 mU (1/1000). Dichas concentraciones se añadieron a cada pocillo de una placa de ELISA, previamente impregnada con estreptavidina. La estandarización de este parámetro permitió detectar la hibridación de la sonda con el producto de PCR a través del conjugado siendo revelado utilizando el sustrato Tetrametil benzidina (TMB).

**3.6.1.9 Evaluación de la Sensibilidad del PCR-ELISA.** Se evaluó la sensibilidad del PCR-ELISA, a partir de la evaluación de la concentración de producto de PCR para los 3 controles resistentes (descritos en el punto 3.4.2), que fue de 4 ng y de esta se realizaron diluciones a 0.4 ng/  $\mu$ L y 0.04 ng/  $\mu$ L, para poder determinar qué cantidad de producto de PCR puede detectar el sistema PCR-ELISA (tabla 12).

**Tabla 12***Diluciones de Producto de PCR en la sensibilidad del ELISA*

Concentración Inicial de Producto de PCR	Diluciones de Producto de PCR		
	Volumen de Producto de PCR	Volumen de Buffer de Hibridación	Dilución de PCR
4ng	20 $\mu$ L	80 $\mu$ L	4 ng
4ng	10 $\mu$ L	90 $\mu$ L	0.4ng
2ng	2 $\mu$ L	98 $\mu$ L	0.04 ng

a. **Sensibilidad Directa.** Se realizó un PCR-ELISA sin conocer la concentración de producto de PCR, para ello se evaluó diferentes diluciones del producto de PCR, las cuales fueron: 1/2, 1/5, 1/10 y 1/100 además se añadió un control positivo (+) de producto de PCR a 4ng. Luego en tubos de 0.2 mL los productos de PCR fueron diluidos en agua Mili-Q, como se detalla en la tabla 13, posteriormente fueron denaturados utilizando un bloque térmico. Cada dilución se mezcló con el buffer SSPE para luego colocarse en los pocillos de una placa de ELISA. Esto permitió visualizar el límite de detección del sistema a diferentes diluciones del producto de PCR de manera directa.

**Tabla 13***Diferentes diluciones de producto de PCR*

Volumen de Producto de PCR puro	Volumen de H2O MiliQ	Dilución de PCR	Volumen de buffer SSPE 3X
10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	1/2	90 $\mu$ L
4 $\mu$ L	16 $\mu$ L	1/5	84 $\mu$ L
2 $\mu$ L	18 $\mu$ L	1/10	82 $\mu$ L
1 $\mu$ L	99 $\mu$ L	1/100	1 $\mu$ L
20 $\mu$ L	0 $\mu$ L	C+	80 $\mu$ L



**3.6.1.10 Evaluación de la Especificidad del PCR-ELISA.** Se realizó una evaluación de la especificidad del PCR-ELISA, amplificando la región *rpoB* para muestras de Micobacterias No Tuberculosis (MNTB) las cuales fueron: *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium abscesus*. Adicionalmente se incorporó un control negativo (proveniente de ADN humano) y un control positivo con la mutación correspondiente.

**a. Evaluación cruzada entre sondas.** Lo que permitió verificar la capacidad de reconocimiento de la sonda frente a una muestra con o sin mutación en el sistema de ELISA.

Esta evaluación consistió en usar sondas resistentes (H445Y, H445D y S450L), que fueron hibridadas con producto de PCR proveniente de muestras sensibles respectivamente (sin mutación). Además, se evaluó la hibridación de sondas sensibles con producto de PCR generado a partir de muestras resistentes (con mutación). Adicionalmente, se incorporó un control positivo (tabla 14).

**Tabla 14**

*Evaluación cruzada de las sondas*

Nº de Pocillo	Tipo de Muestra	Tipo de Sonda
1	Muestra Sensible	Sonda Resistente
2	Muestra Resistente	Sonda Sensible
3 (control +)	Muestra Resistente	Sonda Resistente

### 3.6.2 *Ensayo Piloto del PCR-ELISA*

Para este ensayo piloto se tuvo en cuenta todos los parámetros previamente establecidos a lo largo de la estandarización del sistema PCR-ELISA, para ello se consideró lo siguiente:

**Determinación de la línea de corte (CUT OFF):** Se realizó utilizando 15 muestras de esputos sensibles además de la cepa pansensible (H37Rv), determinados previamente por GenotypeMDRTBplus provenientes del LRNM del Instituto Nacional de Salud.

Las muestras fueron inactivadas a 80° por 30 minutos en nivel III de Bioseguridad. Luego, se extrajo el ADN con el método CTAB y Lisozima, posteriormente se hizo el PCR-ELISA a las muestras usando volúmenes definidos de 50 µL de producto de PCR para las sondas (H445D y H445Y) y de 20 µL de producto de PCR para la (S450L).

Se determinó la línea de corte (CUT OFF). El resultado de las absorbancias versus muestras fueron ploteados usando el software SPSSv25, para ello se calculó el límite de corte del promedio de las absorbancias más 3 veces la desviación estándar (SD) de las 16 muestras sensibles mediante la técnica de ELISA, para las sondas resistentes (H445Y, H445D) y 2 veces la desviación estándar (SD) para la sonda S450L. Por ello, un valor por encima del CUT OFF se consideró resistente para la presencia de la mutación y por debajo del CUT OFF se consideró sensible con ausencia de la mutación.

**Evaluación Piloto:** Se utilizaron 20 muestras de esputo, determinados previamente por GenotypeMDRTBplus. Las muestras tuvieron las siguientes características: El número de cruces determinados por Baciloscopia y las fechas de recepción de los esputos recibidos por el LRNM del INS (tabla 15). A dichas muestras se les extrajo el ADN y se usó 10 µL para el PCR. Luego se realizó el PCR-ELISA usándose los volúmenes de producto de PCR utilizados en el análisis de

CUT OFF. Finalmente, los resultados de la evaluación del PCR-ELISA fueron comparados con el perfil de resistencia obtenido por GenotypeMDRTBplus al revelar el análisis en ciego.

**Tabla 15**

*Características de las muestras de esputo: Fecha de recepción, número de cruces analizados por Baciloscopia y los días hasta su extracción de ADN.*

Muestras	Nº de Cruces	Fecha de recepción por el LNRM	Fecha de Extracción	Días hasta la Extracción
M1	2+	25/02/21	16/03/21	19
M2	2+	26/02/21	16/03/21	18
M3	3+	01/03/21	16/03/21	15
M4	2+	01/03/21	16/03/21	15
M5	1+	24/02/21	16/03/21	20
M6	2+	01/03/21	16/03/21	15
M7	3+	06/04/21	17/04/21	11
M8	3+	29/03/21	17/04/21	17
M9	2+	31/03/21	17/04/21	17
M10	2+	10/03/21	17/04/21	38
M11	1+	24/03/21	17/04/21	24
M12	2+	24/03/21	17/04/21	24
M13	1+	24/03/21	17/04/21	24
M14	1+	27/03/21	17/04/21	21
M15	1+	30/03/21	17/04/21	18
M16	1+	17/04/21	29/04/21	12
M17	2+	16/04/21	29/04/21	13
M18	1+	23/04/21	29/04/21	6
M19	2+	24/04/21	29/04/21	5
M20	1+	23/04/21	29/04/21	6

### 3.7 Análisis estadísticos

El Índice de Kappa de Cohen permitió analizar el grado de acuerdo o concordancia de los resultados obtenidos por la técnica de GenotypeMDRTBplus, que es el “Estándar de referencia” para detección de resistencia a TB y los resultados obtenidos por la técnica de PCR-ELISA.

**El análisis del Índice de Kappa de Cohen:** El numerador del coeficiente Kappa expresa la proporción del acuerdo observado menos el esperado, en tanto que el denominador es la diferencia entre un total acuerdo y la proporción esperada por azar (Cortés-Reyes et al., 2010). Para el cálculo del índice Kappa se utilizó el software SPSSv25 que consistió en la siguiente fórmula:  $K = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$ . Donde  $P_o = \frac{a + d}{n}$ , es la proporción de concordancia observada,  $P_e = \frac{a + b}{n} \left[ \frac{a + c}{n} + \frac{b + d}{n} + \frac{c + d}{n} \right]$  es la proporción de concordancia esperada por azar y  $1 - P_e$ , representó el acuerdo o concordancia máxima posible no debida al azar (Campo-Arias & Herazo, 2010).

De este modo se pudo calcular el número de muestras, que tienen concordancia entre ambas técnicas. Los valores de K pueden encontrarse entre cero y uno, a mayor cercanía al uno mayor concordancia, siendo los siguientes rangos establecidos (Campo-Arias & Herazo, 2010) ver tabla 16.

**Tabla 16**

*Interpretación cualitativa de los valores de Kappa  
"K" (Campo-Arias & Herazo, 2010)*

Valores de K	Interpretación
Entre 0 y 0,20	Deficiente
Entre 0,21 y 0,40	Pobre
Entre 0,41 y 0,60	Aceptable
Entre 0,61 y 0,80	Buena
Entre 0,81 y 1,00	Excelente

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Extracción de ADN de los controles y muestras de esputo.

Se extrajeron los ADN provenientes de la cepa ATCC 25294 (H37Rv pansensible) y la cepa ATCC 35838, que presenta la mutación S450L, mediante el Método de extracción CTAB y Lisozima (CTAB-lyz). Adicionalmente 2 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en medio de cultivo Lowenstein-Jensen que tuvieron un diagnóstico por GenotypeMDRTBplus de resistencia a RIF-8853 y RIF- 4469, y que presentan la mutación H445D y H445Y respectivamente (ver tabla 17). Además, se extrajo ADN de 16 muestras provenientes de esputos sensibles y 20 muestras de esputos para el ensayo piloto.

#### 4.1.1 Cuantificación de la concentración de ADN de los controles

El ADN extraído de los controles y las muestras fue cuantificado por el equipo Qubit 2.0. Se observa a continuación la cuantificación de la concentración de ADN (tabla 17,18 y 19) junto a la pureza de los controles que fue determinada por el equipo NanoDrop8000 (Tabla 17).

**Tabla 17**

*Cuantificación y pureza de los ADN extraídos de los controles*

Número de orden	Nombre de la Cepa o Muestra	Pureza 260/280	Concentración [ ]
		Nanodrop	ng/μL Qubit 2.0
1	Cepa ATCC 25294	1.8	10.1
2	Cepa ATCC 35838	1.9	13.6
3	Muestra RIF- 8853	2.2	8.1
4	Muestra RIF- 4469	1.9	18.5

**Tabla 18**

*Cuantificación de los ADN extraídos de las muestras de esputos sensibles.*

Número de Muestra	Concentración [ ] ng/μL Qubit 2.0
1	3.86 ng/μL
2	0.31 ng/μL
3	5.56 ng/μL
4	0.79 ng/μL
5	2.38 ng/μL
6	0.52 ng/μL
7	0.071 ng/μL
8	1.16 ng/μL
9	0.15 ng/μL
10	1.83 ng/μL
11	1.65 ng/μL
12	1.03 ng/μL
13	0.142 ng/μL
14	0.183 ng/μL
15	0.074 ng/μL
16 (H37Rv)	10.5 ng/μL

**Tabla 19**

*Cuantificación de los ADN extraídos de las muestras del piloto.*

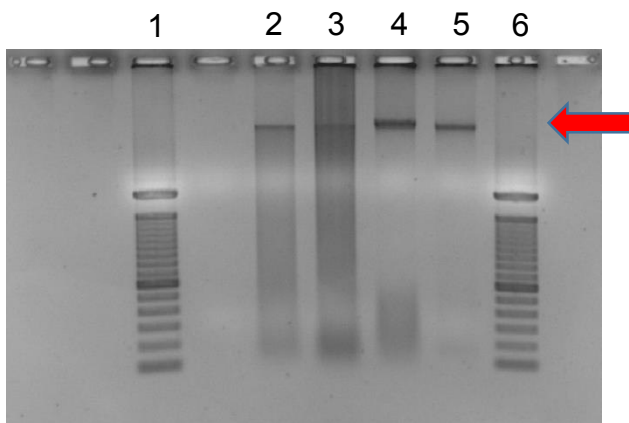
Número de Muestra	Concentración [ ] ng/μL Qubit 2.0	Número de Muestra	Concentración [ ] ng/μL Qubit 2.0
1	2.07 ng/μL	11	3.40 ng/μL
2	0.78 ng/μL	12	4.04 ng/μL
3	1.60 ng/μL	13	1.28 ng/μL
4	1.40 ng/μL	14	0.053 ng/μL
5	1.10 ng/μL	15	2.02 ng/μL
6	3.26 ng/μL	16	0.34 ng/μL
7	1.58 ng/μL	17	0.99 ng/ μL
8	1.35 ng/μL	18	1.47 ng/ μL
9	0.085 ng/μL	19	7.5 ng/ μL
10	3.03 ng/μL	20	6.2 ng/ μL

#### 4.1.2 Electroforesis de los ADN extraídos controles y muestras de esputo

Se realizó una electroforesis de las muestras extraídas (figura 7 y 8) y controles por CTAB y Lisozima observándose la calidad de los controles corridas a 120V x 30 minutos. Tal como se observa en la figura 6.

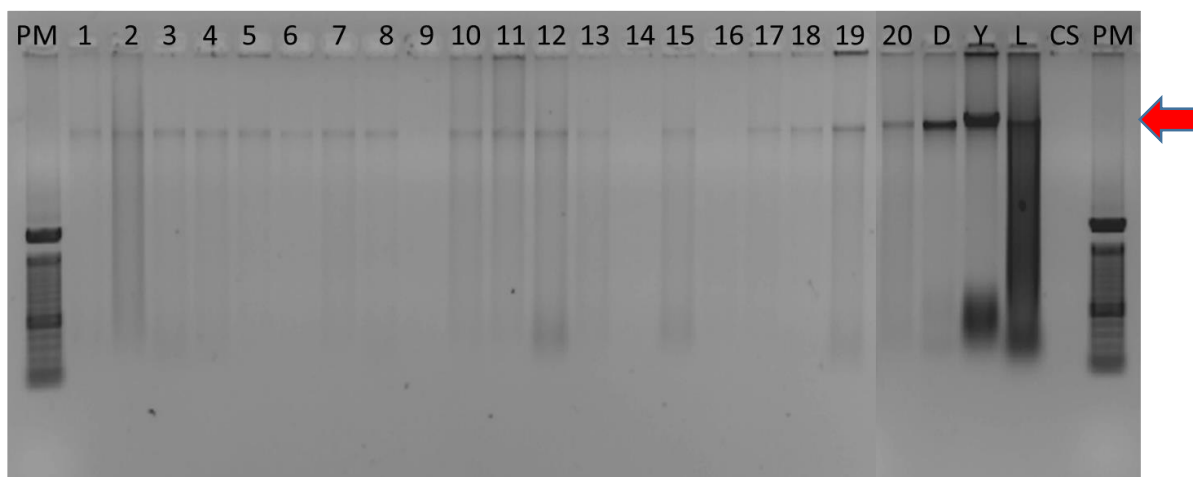
##### Figura 6.

Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de los ADN extraídos de controles. Carril 1 y 6. Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2. H37Rv (5  $\mu$ L). Carril 3. Cepa ATCC 35838 (5  $\mu$ L). Carril 4. RIF-4469 (5  $\mu$ L) y Carril 5. RIF-8853 (5  $\mu$ L). La flecha señala el ADN total extraído.



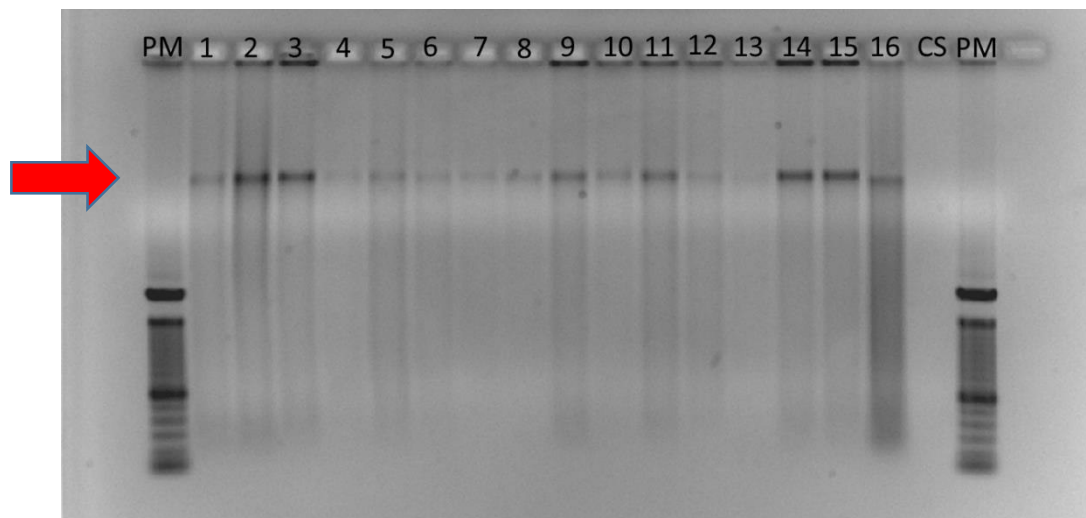
##### Figura 7.

Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de los ADN extraídos del piloto. Marcador de peso molecular de 100 pb (PM). Muestras de esputos extraídos 1 al 16 (5  $\mu$ L) y control sistema (CS). La flecha señala el ADN total extraído.



**Figura 8.**

*Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de los ADN extraídos del piloto. Marcador de peso molecular de 100 pb (PM). Muestras de esputos extraídos del 1 al 20 (5  $\mu$ L). Las siglas D, Y, L corresponden a los controles con la mutación H445D, H445Y y S450L (5  $\mu$ L) respectivamente y control sistema (CS). La flecha señala el ADN total extraído.*

**4.2 Estandarización del PCR para el gen rpoB**

Se estandarizaron los diferentes parámetros del PCR como temperatura de hibridación de los primers y concentración de cloruro de magnesio.

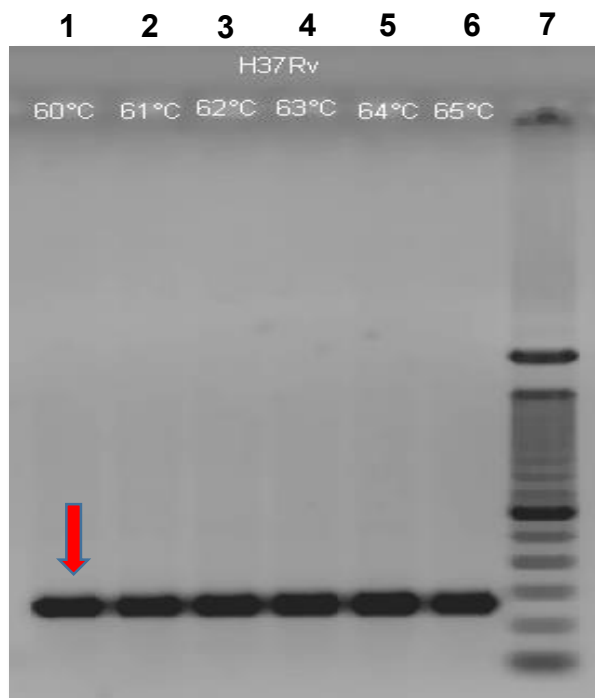
**4.2.1 Estandarización de la temperatura de Hibridación de los primers.**

Como parte de la estandarización, se buscó tener un solo ciclo de amplificación para una región del gen rpoB de 255 pb. De acuerdo con el  $T_m$  de los primers, se probaron diferentes temperaturas de hibridación (60°, 61°, 62°, 63°, 64° y 65°). Se observó que la temperatura de hibridación de los primers óptima fue a 60°C en la cual se obtuvo una sola banda (figura 9).



**Figura 9.**

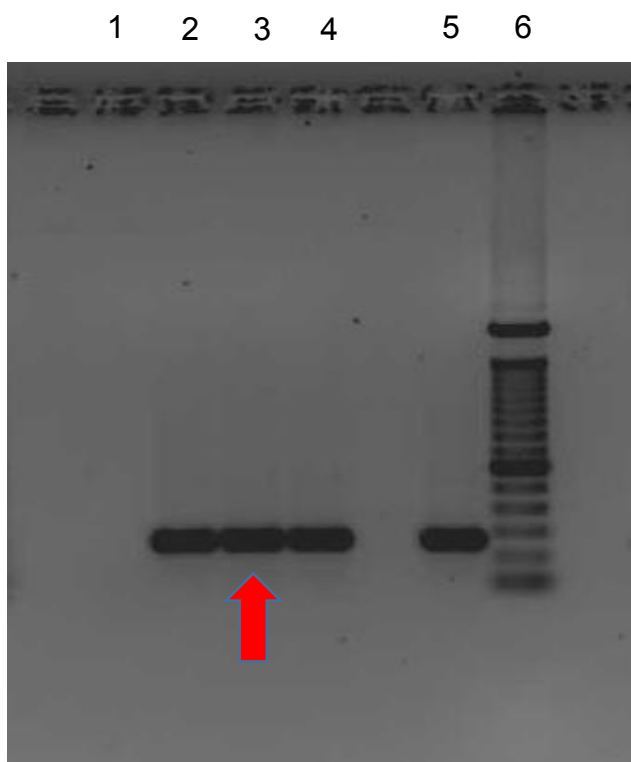
Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5 % del ADN extraído de *H37Rv*. Carril 1 al 6 en una gradiente de 1°C de diferencia desde 60° a 65°C. Carril 7. Marcador de peso molecular de 100 pb. La flecha en rojo indica la banda de amplificación de 255 pb a 60°C.

**4.2.2 Estandarización de la Concentración de  $MgCl_2$** 

Se realizó un gradiente de concentración de  $MgCl_2$  con la finalidad de determinar la concentración óptima de este ion y que favorezca la amplificación para una región del gen *rpoB* de 255 pb. Se evaluaron 5 diferentes concentraciones de  $MgCl_2$  (tabla 20). Se observó que la concentración de 1.5 mM de  $MgCl_2$ , fue óptima (figura 10).

**Figura 10.**

Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5 % del ADN extraído de H37Rv. Carril 1. 0 mM. Carril 2. 1 mM. Carril 3. 1.5 mM. Carril 4. 2 mM y Carril 5. 3 mM a diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> para el gen rpoB. Carril 6. Marcador de peso molecular de 100 pb. La flecha en rojo señala el amplificado de 255 pb a 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>.



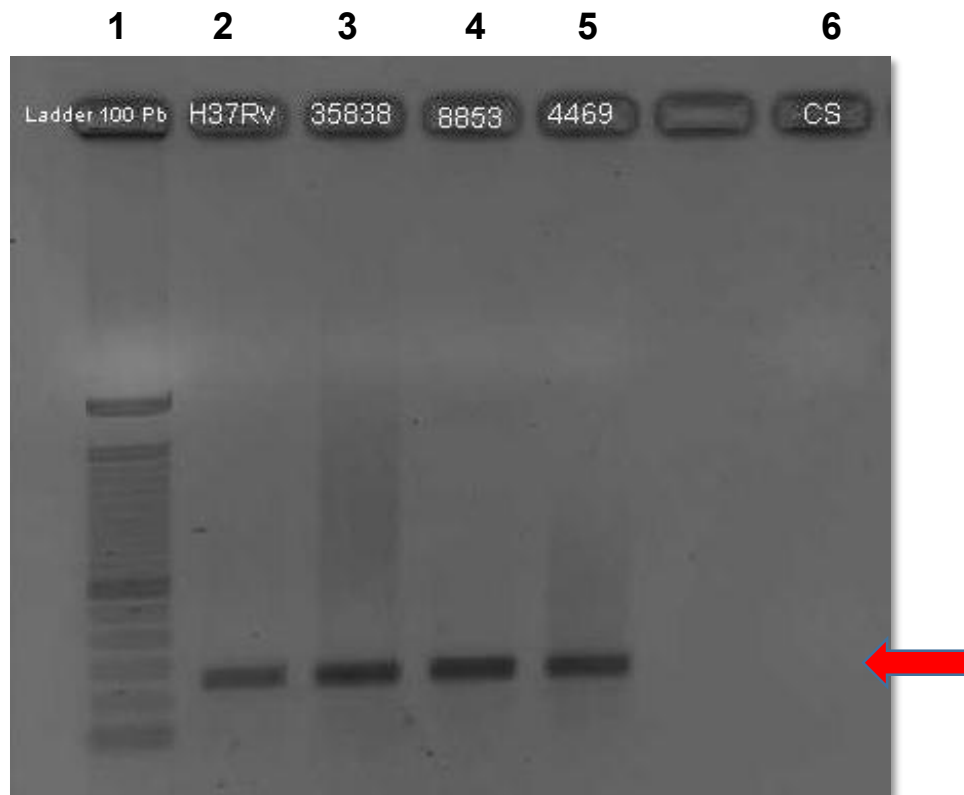
### 4.3 Electroforesis de los productos de PCR

#### 4.3.1 Electroforesis de los productos de PCR de los controles

Se realizó un PCR a los ADN de los controles para amplificar la región rpoB de 255pb, según el ciclaje optimizado (tabla 21). Como se observa a continuación (figura 11).

**Figura 11.**

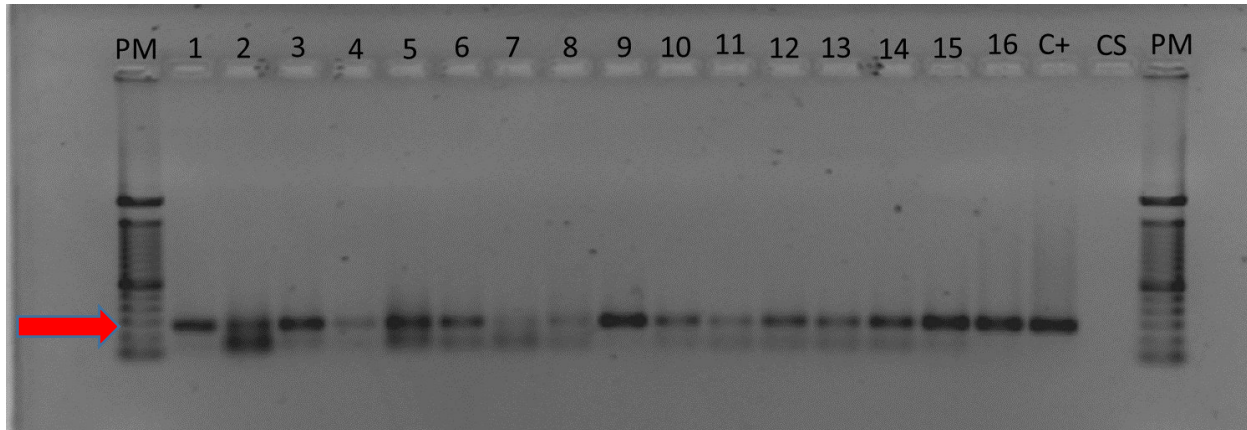
Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5 % de los controles amplificados por PCR. Carril 1. Marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder). Carril 2. Cepa ATCC 22294 H37Rv (5  $\mu$ L). Carril 3. Cepa ATCC 35838 (5  $\mu$ L). Carril 4 = RIF-8853 (5  $\mu$ L) y Carril 5. RIF-4469 (5  $\mu$ L) y Control de sistema (CS). La flecha en rojo indica un amplificado de 255pb que contiene el gen *rpoB*.

**4.3.2 Electroforesis de los productos de PCR de las muestras sensibles**

Se realizó un PCR a las 16 muestras provenientes de la extracción de ADN de esputos sensibles de pacientes con Tuberculosis.

**Figura 12**

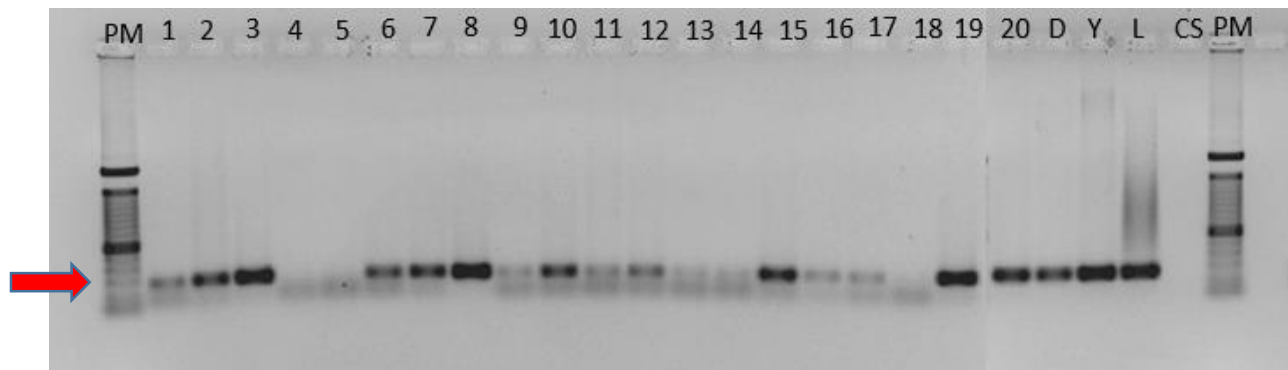
Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de PCR provenientes de las 16 muestras sensibles y el control positivo (S450L). Marcador de peso molecular de 100 pb (PM) y Control sensible (CS). La flecha en rojo señala el amplificado de 255pb.

**4.3.3 Electroforesis de los productos de PCR de las muestras del ensayo Piloto.**

Se realizó un PCR a los ADN extraídos de las muestras del piloto con las condiciones optimizadas a lo largo de la estandarización (tabla 20 y 21) y posteriormente se hizo una electroforesis a los productos de PCR obtenidos. (Figura 13).

**Figura 13.**

Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5 % de los productos de PCR provenientes de las muestras del piloto. PM= Marcador de peso molecular de 100 pb. Los controles positivos fueron muestras resistentes con las siguientes mutaciones D=H445D, Y= H445Y y L= S450L y Control sensible (CS). La flecha en rojo señala el amplificado de 255pb.



Luego de la optimización de la temperatura de hibridación de los primers y la concentración de MgCl<sub>2</sub>. Se estableció los parámetros del PCR y el ciclaje que fueron los siguientes ver tabla 20 y 21.

**Tabla 20**

*Parámetros de PCR optimizados*

Componentes del PCR	Concentración Inicial	Concentración Final
Buffer PCR	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM
dNTP's	10 mM	0.25 mM
Primer Forward (RP4T)	10 μM	0.25 μM
Primer Reverse (RP8T)	10 μM	0.25 μM
Taq DNA Polymerase Recombinante	5U/ μL	1.5U/μL
ADN de H37Rv (15ng)		Total

**Tabla 21**

*Ciclaje del PCR optimizado*

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Denaturación Inicial:	95 °C	10 minutos	1 ciclo
Denaturación:	95 °C	30 segundos	
Temperatura de Hibridación de los primers:	60°C	45 segundos	35 ciclos
Extensión:	72 °C	30 segundos	
Extensión Final:	72 °C	5 minutos	1 ciclo

#### 4.4 Secuenciamiento de la región rpoB de 255pb

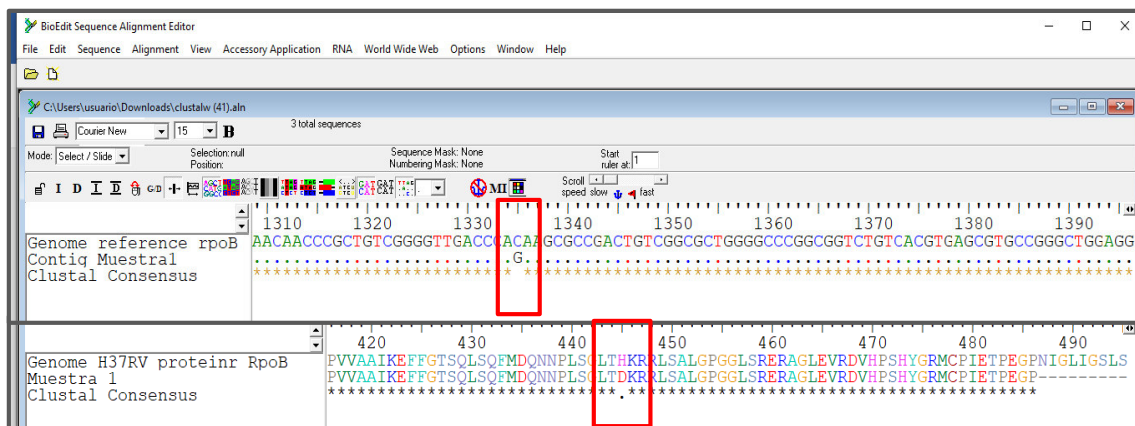
Después de analizar las secuencias utilizando los programas descritos en el (punto 3.6.1.7). Se identificaron las siguientes mutaciones: En la muestra RIF-8853 se ubicó que en el codón 445, hubo la sustitución del nucleótido Citosina por Guanina, lo que causó la variación del aminoácido

Histidina por Aspartato (figura 14). Para la muestra RIF- 4469 se observó el cambio del nucleótido Citosina por Timina (figura 15), lo que causó la variación de aminoácido Histidina por Tirosina.

En la Cepa 35838 se ubicó que en el codón 450, hubo la sustitución del nucleótido Citosina a Timina, lo que causó el cambio del aminoácido Serina por Leucina (figura 16).

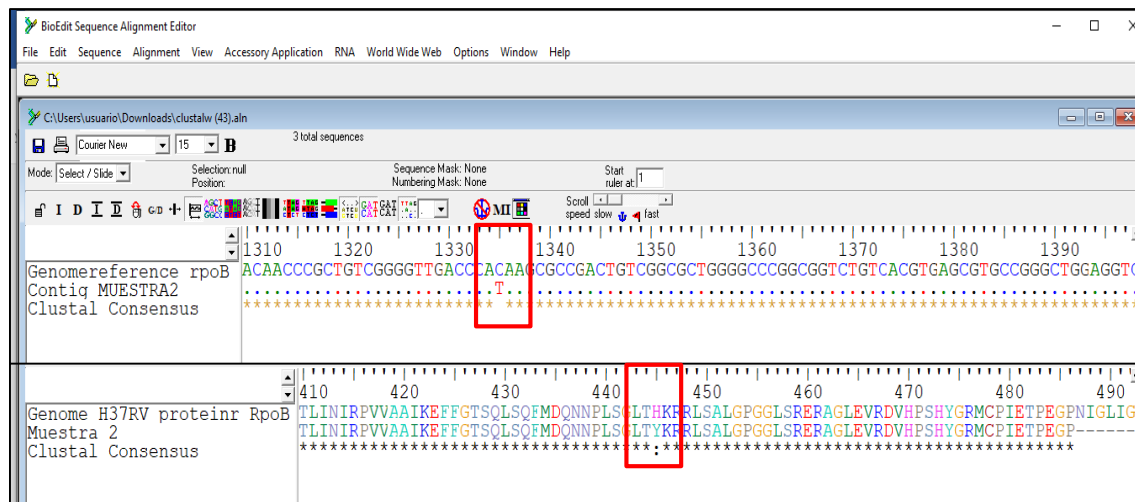
#### Figura 14.

Fotografía donde se observó el cambio del nucleótido Citosina por Guanina en la posición 1335 donde se ubica la mutación en el codón 445 de Histidina por Aspartato.



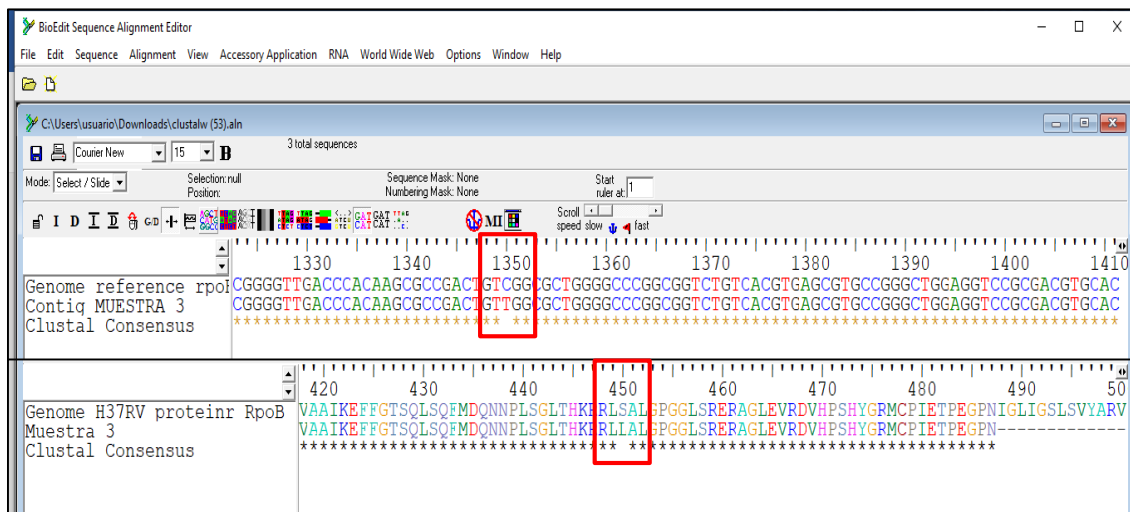
#### Figura 15.

Fotografía donde se observó el cambio del nucleótido Citosina por Timina del nucleótido 1335 donde se ubica la mutación en el codón 445 de Histidina por Tirosina.



**Figura 16.**

*Fotografía donde se observó el cambio del nucleótido Citosina por Timina del nucleótido 1350 donde se ubica la mutación en el codón 450 de Serina por Leucina.*



#### 4.5 Estandarización del PCR-ELISA

Se estandarizó una metodología de PCR-ELISA que permita la hibridación del producto de PCR de 255 pb con las sondas: H445Y, H445D y S450L que detectan las mutaciones de resistencia más frecuentes a RIF.

Se estandarizaron los diferentes parámetros del PCR-ELISA como: a) diferentes temperaturas de hibridación, b) astringencias del buffer de hibridación, c) concentraciones de estreptavidina, d) concentraciones de sonda, e) concentraciones de producto de PCR, f) concentraciones de conjugado marcado con peroxidasa (POD). Además, se evaluó la sensibilidad y especificidad del PCR-ELISA.

##### 4.5.1 Evaluación de las diferentes temperaturas de hibridación del producto de PCR con la sonda.

Para la evaluación de las diferentes temperaturas de hibridación se usaron 2 sondas sensibles (H445 y S450) y 3 sondas resistentes (H445Y, H445D y S450L), para poder observar el

comportamiento de las 5 sondas a distintas temperaturas y así poder elegir la óptima. En la tabla 22 se observan los distintos valores de absorbancia obtenidos a 450nm con el espectrofotómetro

*MultiskanSky (Thermo Scientific).*

**Tabla 22**

*Resultados de las absorbancias obtenidas a diferentes temperaturas de hibridación en el PCR-ELISA.*

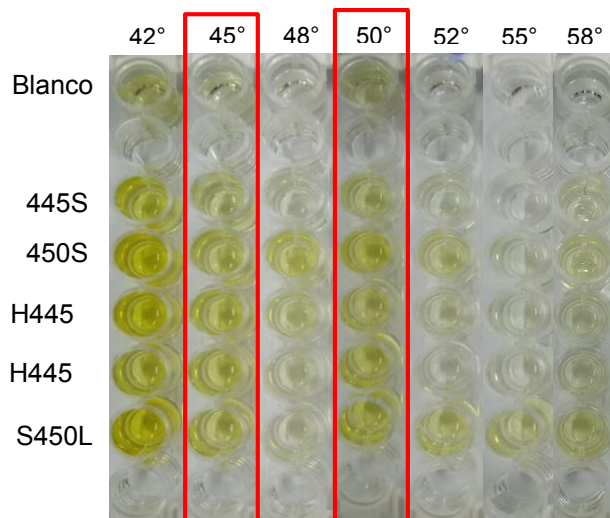
Pocillos	Temperaturas de Hibridación						
	42°C	45°C	48°C	50°C	52°C	55°C	58°C
Blanco de Reactivos	0.208	0.13	0.078	0.172	0.066	0.053	0.067
H445	0.307	0.125	0.033	0.08	0.049	0.056	0.052
S450	0.914	0.234	0.267	0.306	0.186	ND	0.129
H445D	0.742	0.292	0.148	0.152	0.083	0.052	0.065
H445Y	0.255	0.268	0.075	0.218	0.041	0.048	0.073
H450L	0.956	0.236	0.048	0.275	0.209	0.212	0.174

Las temperaturas donde se obtuvo mayor absorbancia para las sondas resistentes fueron a 45°C y 50°C utilizando el buffer de hibridación SSPE 6X y usando un volumen de 10 µL de producto de PCR (Garcia et al., 2001). Sin embargo, a 42°C se observaron las máximas absorbancias para estas sondas (figura 17).



**Figura 17.**

Fotografía de los pocillos de una placa de ELISA donde se observó el color de la reacción que es directamente proporcional a la absorbancia. Se resalta en rojo las temperaturas más altas para las SR



#### 4.5.2 Evaluación de las diferentes astringencias del Buffer de Hibridación: Solución Salina

##### *Fosfato EDTA (SSPE)*

Para elegir la temperatura óptima (45°C ó 50°C) donde ocurra una correcta hibridación del producto de PCR con la sonda. Se procedió a evaluar diferentes astringencias del buffer de hibridación: baja (SSPE 3X), media (SSPE 1.5X) y alta (SSPE 0.5X) para las 3 sondas (tabla 16).

Se determinó que la temperatura óptima de hibridación fue a 50°C, debido a que se obtuvo una mayor absorbancia con el buffer de hibridación a baja astringencia (SSPE 3X) como se observa en la (figura 18) para las 3 sondas resistentes.

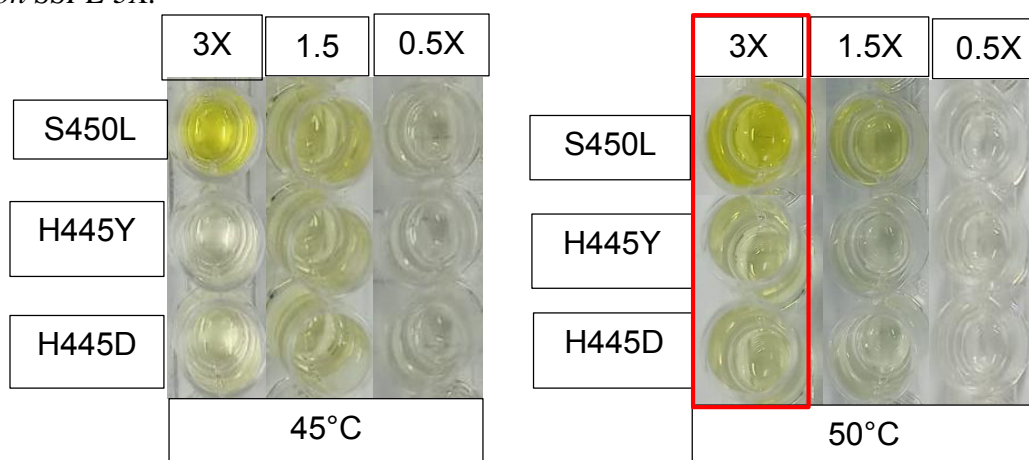
**Tabla 23**

*Evaluación de las diferentes astringencias del buffer SSPE a 45°C y 50°C*

Pocillos	45°C			50°C		
	SSPE 3X	SSPE 1.5X	SSPE 0.5X	SSPE 3X	SSPE 1.5X	SSPE 0.5X
Blanco						
Reactivos						
S450L	0.06	0.082	0.056	0.05	0.06	0.084
H526Y	0.432	0.235	0.103	0.612	0.31	0.008
H526Y	0.014	0.126	0.035	0.26	0.12	-0.006
H526D	0.043	0.092	0.08	0.141	0.079	-0.015

**Figura 18.**

*Fotografía de los pocillos de una placa de ELISA donde se probaron las diferentes astringencias (3X, 1.5 X y 0.5X) a 45°C y 50°C. Se resalta en rojo las absorbancias más altas para las SR a 50°C con SSPE 3X.*

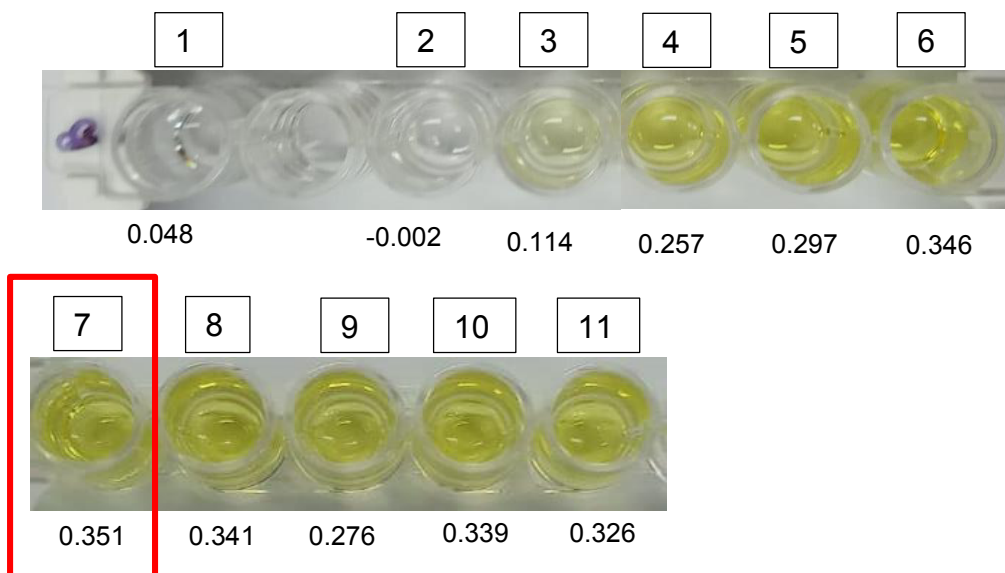


#### 4.5.3 Estandarización de la Concentración de Estreptavidina

Para la determinación de la concentración de estreptavidina adecuada se utilizaron 9 diferentes concentraciones de este componente (Tabla 9). Esta evaluación se hizo utilizando los parámetros establecidos previamente: Temperatura de hibridación (50°C) y astringencia del buffer de hibridación (SSPE 3X). Se determinó que la concentración de estreptavidina adecuada es de 10 µg/mL, debido a que a esta concentración se observó la máxima absorbancia que fue de 0.351, estableciéndose este parámetro para el ELISA (figura 19).

**Figura 19.**

Fotografía de los pocillos de una placa de ELISA de las diferentes concentraciones de estreptavidina revelado por PCR-ELISA. La numeración del 1 al 11 se encuentra en relación con la tabla 24. Se resalta en rojo la absorbancia más alta.

**Tabla 24**

*Evaluación de las diferentes concentraciones de estreptavidina*

Pocillo N°	Concentración	Absorbancias (450 nm)
1	Blanco de Reactivos (Control con Sonda)	0.048
2	Solo Buffer Carbonato (0 µg/mL)	-0.002
3	Estreptavidina (1 µg/mL)	0.114
4	Estreptavidina (2 µg/mL)	0.257
5	Estreptavidina (4 µg/mL)	0.297
6	Estreptavidina (8 µg/mL)	0.346
7	Estreptavidina (10 µg/mL)	0.351
8	Estreptavidina (20 µg/mL)	0.341
9	Estreptavidina (40 µg/mL)	0.276
10	Estreptavidina (60 µg/mL)	0.339
11	Estreptavidina (80 µg/mL)	0.326

#### 4.5.4 Estandarización de la Concentración de Sonda

Para la estandarización de la concentración de sonda, se evaluaron 5 diferentes concentraciones de la sonda resistente S450L (tabla 25). Solo se evaluó esta sonda debido a que

permitió determinar la cantidad adecuada de sonda a ser utilizada y el resultado esta pudo ser extrapolado a las sondas restantes.

**Tabla 25**

*Evaluación de las diferentes concentraciones de sonda*

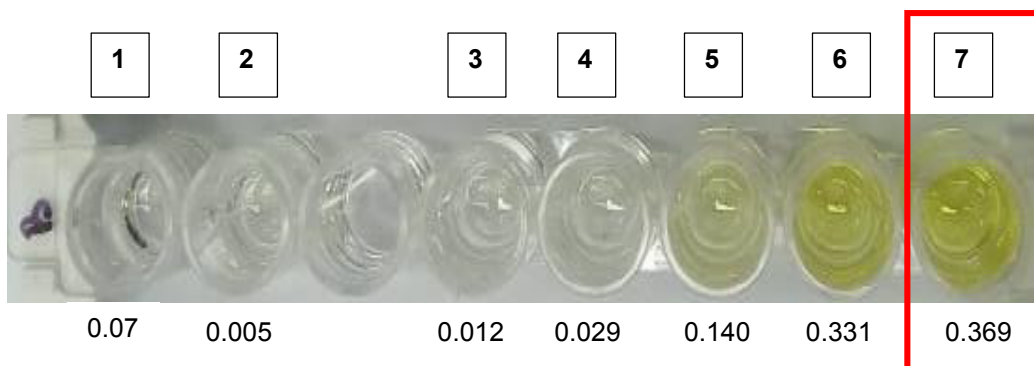
Pocillo N°	Concentraciones	Absorbancias 450nm
1	Blanco de Reactivos	0.07
2	Control sin sonda (0 pmol/mL)	0.005
3	0.5 pmol/mL	0.012
4	1 pmol/mL	0.029
5	5 pmol/mL	0.14
6	10 pmol/mL	0.331
7	20 pmol/mL	0.369

La concentración de sonda óptima fue 20 pmol/mL, el cual tuvo una absorbancia de 0.369, tal como se observa en la (figura 20).

**Figura 20.**

*Fotografía de los pocillos de una placa de ELISA en las diferentes concentraciones de sonda revelado por PCR-ELISA. La numeración del 1 al 7 se encuentra en relación a la tabla 25. Se resalta en rojo la absorbancia más alta.*

#### 4.5.5 Estandarización de la Concentración de Producto de PCR



Se evaluaron concentraciones desde 0.5 ng hasta 4ng de producto de PCR para las sondas: H445Y, H445D y S450L (tabla 26). Se utilizó 20 pmol/ $\mu$ L para cada una de las sondas siguiendo los parámetros previamente optimizados. Se determinó que la concentración adecuada de producto de PCR fue de 4 ng. De ese modo el sistema PCR-ELISA, permitió que las 3 sondas trabajen a la misma concentración.

**Tabla 26**

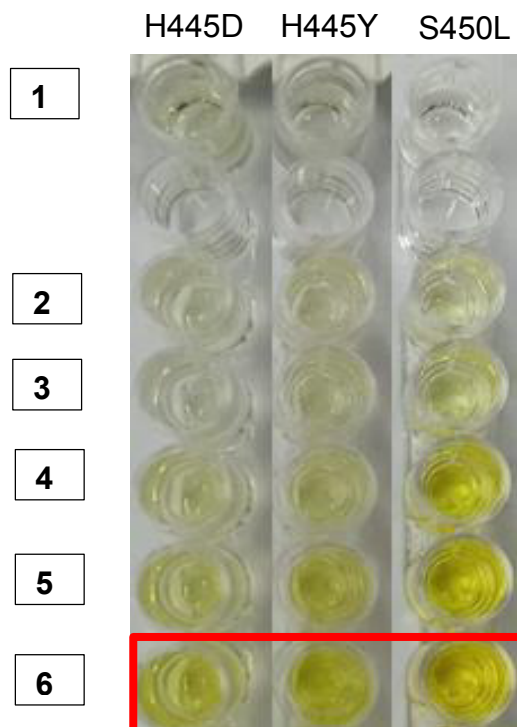
*Evaluación de las diferentes concentraciones de producto de PCR para las 3 sondas resistentes.*

Fila	Concentración de producto de PCR	Sonda H445D	Concentración de producto de PCR	Sonda H445Y	Concentración de producto de PCR	Sonda S450L
1	Sin producto	0.13	Sin producto	0.063	Sin producto	0.071
2	0.25ng	-0.015	0.25ng	0.068	0.25ng	0.082
3	0.5ng	-0.038	0.5ng	0.094	0.5ng	0.156
4	1ng	0.051	1ng	0.168	1ng	0.501
5	2ng	0.149	2ng	0.297	2ng	0.713
6	4ng	0.276	4ng	0.402	4ng	1.221

Se observó que la absorbancia de la sonda S450L fue 3 y 5 veces mayor que las absorbancias obtenidas con las otras 2 sondas: H445Y y H445D respectivamente (figura 21).

**Figura 21.**

*Fotografía de los pocillos de una placa de ELISA a diferentes concentraciones de producto de PCR. La fila 1 al 6 está en relación con la tabla 26. Se resalta en rojo los productos de PCR a 4ng de concentración. El producto de PCR con la mutación S450L tuvo la absorbancia más alta (1.221).*

**4.5.6 Estandarización de la Concentración de Conjugado anti-Dig-POD**

Se evaluaron diferentes concentraciones del conjugado (tabla 27), considerando todos los parámetros previamente establecidos. Se evaluó la sonda S450L y H445D.

No se utilizó la sonda H445Y debido a que la sonda H445D se encontró localizada en la misma posición 1335 de nucleótido y en el mismo codón, sin embargo, presento diferente cambio de aminoácido. Por ello usándose la sonda H445D se pudo extrapolar los resultados a diferentes concentraciones de anti-Dig-POD a la sonda H445Y.

**Tabla 27**

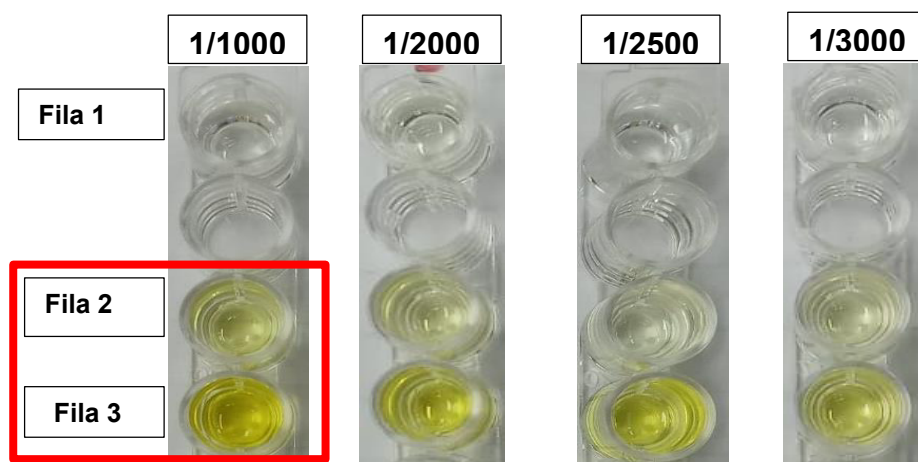
*Resultados de las diferentes concentraciones del conjugado Anti-digoxigenina-PO*

Fila	Muestras	1/1000	1/2000	1/2500	1/3000
1	Blanco (sin producto)	0.066	0.054	0.075	0.059
2	H445D	0.215	0.109	0.059	0.089
3	S450L	0.982	0.363	0.339	0.254

Se determinó que la dilución 1/1000, es decir, la concentración de 150 mU/mL, fue la óptima para el PCR-ELISA (figura 22).

**Figura 22.**

*Fotografía de los pocillos de una placa de ELISA a diferentes concentraciones de conjugado. Fila 1. El blanco de reactivos. Fila 2. Sonda H445D y Fila 3. Sonda S450L. Las concentraciones probadas fueron: 150mU/mL= 1/1000, 100 mU/mL = 1/2000, 75mU/mL=1/2500 y 50mU/mL= 1/3000. Se resalta en rojo la concentración establecida a 150mU/mL= 1/1000.*



Después de la estandarización de todos los parámetros del PCR-ELISA se determinaron los siguientes parámetros optimizados (tabla 28)

**Tabla 28***Parámetros optimizados de volumen y concentración en el PCR-ELISA*

Parámetros del PCR-ELISA	Volumen optimizado
- ADN de controles y muestras	10 $\mu$ L
- producto de PCR (H445D y H445Y)	50 $\mu$ l
- producto de PCR (S450L)	20 $\mu$ L
Parámetros del PCR-ELISA	Concentración optimizada
- Concentración de estreptavidina	10 $\mu$ g/mL
- Concentración de sondas	20 pmol/ mL
- Concentración de producto de PCR	4ng
- Concentración de Conjugado	150 mU (1/1000)

#### 4.6 Evaluación de la Sensibilidad y la Especificidad del PCR-ELISA

##### 4.6.1 Evaluación de la sensibilidad del PCR- ELISA

Se realizó la evaluación de la sensibilidad del PCR-ELISA, utilizando diluciones seriadas del producto de PCR (tabla 29), a partir de una concentración óptima de 4ng, para las 3 sondas: H445Y, H445D y S450L.

**Tabla 29**

*Resultado de las diluciones seriadas del producto de PCR para las 3 sondas.*

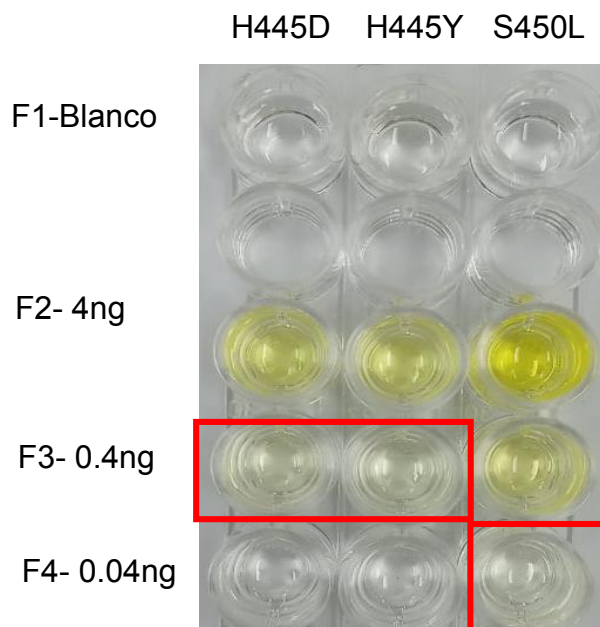
Fila	Concentración	H445D	H445Y	S450L
F1	Blanco	0.046	0.065	0.045
F2	4ng	0.263	0.24	0.633
F3	0.4ng	0.089	0.058	0.219
F4	0.04ng	0.007	-0.01	0.055

Se observó, que el ELISA detecto como mínimo 0.4 ng de producto de PCR, es decir, 400 pg para las sondas: H445D y H445Y. Para el caso del producto del PCR con la mutación S450L, la sonda detectó una absorbancia de 0.055 correspondiente a 40 pg (figura 23).



**Figura 23.**

Fotografía de los pocillos de una placa de ELISA a diferentes diluciones del producto de PCR. En rojo se resaltan las concentraciones detectadas a un límite de detección de 400pg (F3) y a 40 pg (F4) según la tabla 29.



**4.6.1.1 Sensibilidad directa del ELISA** Se evaluó diferentes diluciones del producto de PCR sin cuantificar. Para ello se hizo diluciones del producto de PCR para las 3 sondas (tabla 30). Se incorporó como control positivo la concentración estandarizada a 4ng de producto de PCR.

**Tabla 30**

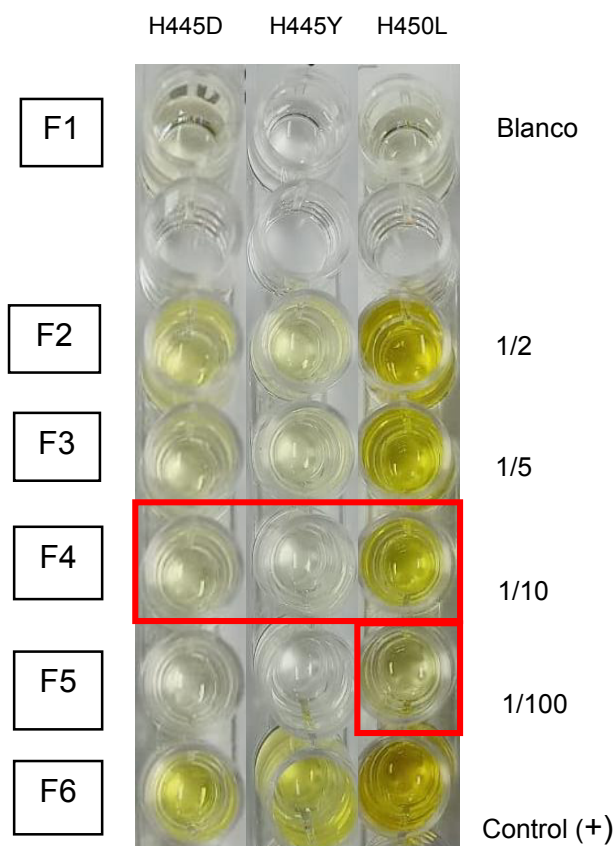
*Resultado de la sensibilidad directa del ELISA para cada sonda resistente.*

Fila	Pocillos	H445D	H445Y	S450L
F1	Blanco	0.115	0.051	0.112
F2	1/2	0.113	0.147	1.08
F3	1/5	0.038	0.105	0.574
F4	1/10	0.033	0.041	0.349
F5	1/100	-0.017	0.018	0.093
F6	4 ng C+	0.247	0.321	1.433

Se observó que las diluciones 1/10 y 1/100 fueron comparables a los resultados obtenidos en la tabla 30 para las sondas (H445D y H445Y) y S450L respectivamente (figura 24). Por lo tanto, se comprueba que la sensibilidad del sistema en base a volúmenes fue similar a la sensibilidad del sistema en base a concentración (tabla 29).

**Figura 24.**

*Fotografía de los pocillos de una placa de ELISA a diferentes diluciones del producto de PCR. Los pocillos de (F1 al F6) están en relación con la tabla 30. En rojo se resaltan las diluciones detectadas a 1/10 y 1/100 respectivamente.*

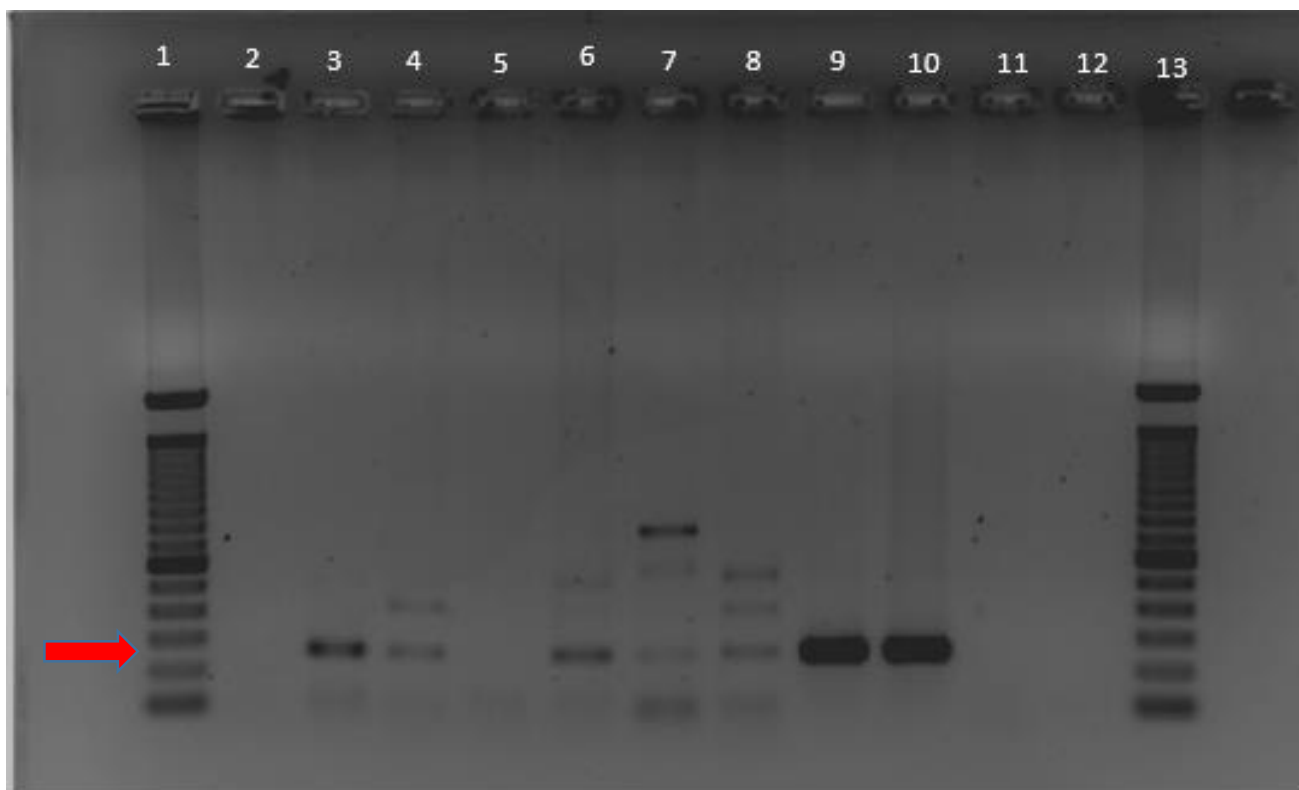


#### 4.6.2 Evaluación de la Especificidad del PCR-ELISA

Se realizó la evaluación de la especificidad del PCR-ELISA, usando 7 muestras provenientes de ADN de Micobacterias No tuberculosis (MNTB) ver tabla 31. Además, se realizó una electroforesis de los productos de PCR de las MNTB, donde se amplificó una región del gen *rpoB* de 255pb. (Figura 25).

##### Figura 25.

Gel de agarosa al 1.5% del producto de amplificación de una región *rpoB* de 255pb. Carril 2. *Mycobacterium fortuitum*. Carril 3. *Mycobacterium malmoense*. Carril 4. *Mycobacterium avium*. Carril 5. *Mycobacterium chelonae*. Carril 6. *Mycobacterium kansasii*. Carril 7. *Mycobacterium intracellulare*. Carril 8. *Mycobacterium abscesus*. Carril 9. H37Rv. Carril 10. ATCC 35838 (control positivo). Carril 11. ADN humano (control negativo). Carril 12. Control de sistema y Carril 1 al 13 (marcador de 100 pb). La flecha roja indica una región amplificada de 255pb.



En los resultados de la electroforesis se observó que no amplificó el gen *rpoB* para las siguientes MNTB: *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium chelonae* a diferencia de las otras MNTB, que amplificaron la banda de interés y otras bandas inespecíficas (figura 25). Con respecto

a los controles positivos: cepa ATCC 35838 y H37Rv amplificaron la región de 255 pb; mientras que el control negativo que corresponde al ADN humano (carril 11) no amplificó la banda de interés.

**Tabla 31**

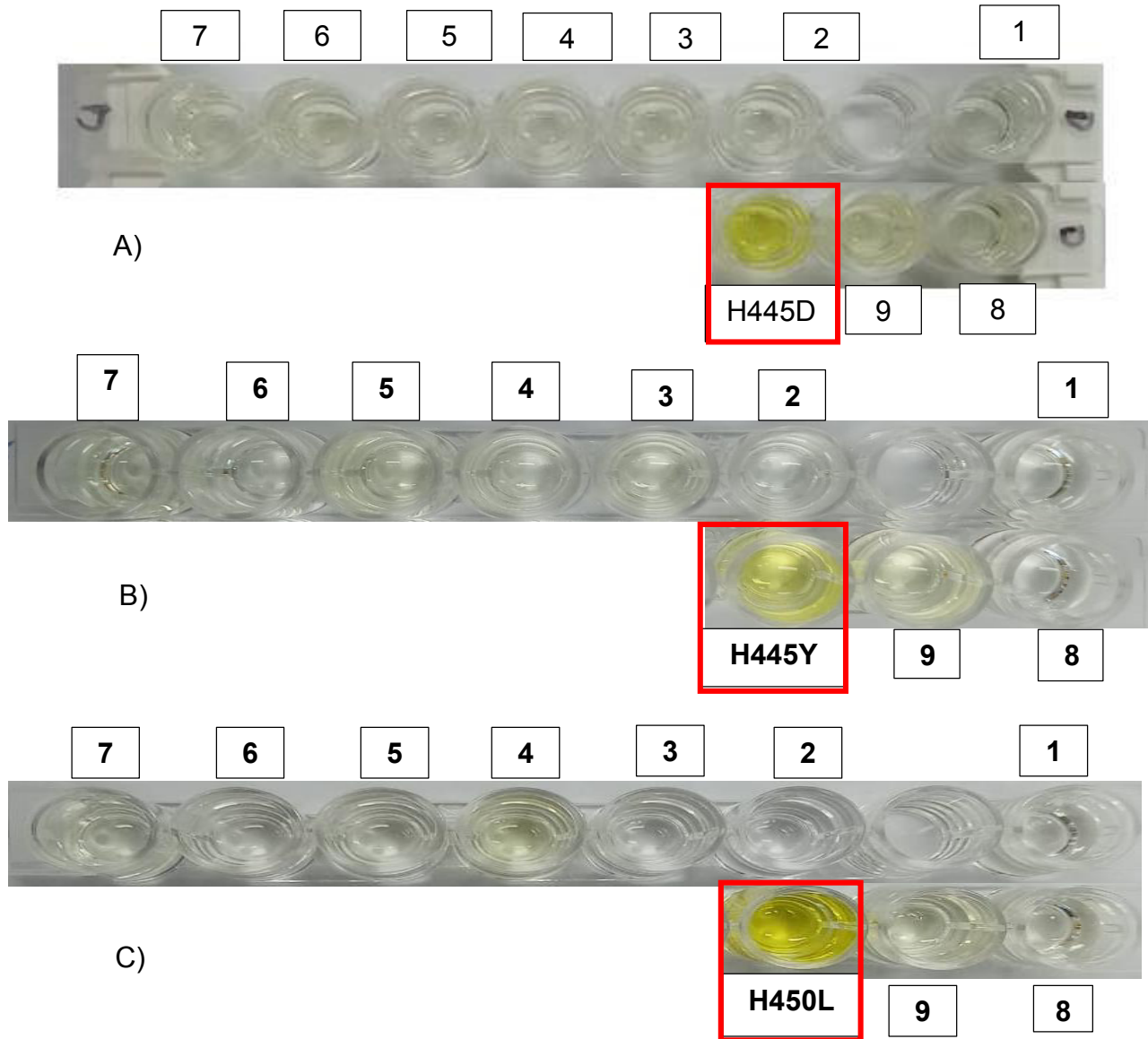
*Resultados de las absorbancias obtenidas de las diferentes MNTB y los controles positivos.*

Fila	Tipo de Muestra	H445D	H445Y	S450L
1	Blanco	0.075	0.064	0.07
2	C.N (Humano)	0.01	0	-0.026
3	<i>M.fortuitum</i>	0.02	0.03	-0.01
4	<i>M.malmoense</i>	0.01	0.02	0.073
5	<i>M.avium</i>	0.01	0.04	0.012
6	<i>M.chelonae</i>	0.03	0.01	0.001
7	<i>M.kansasii</i>	0.02	0.03	0.012
8	<i>M.intracellulare</i>	0.03	-0.007	0.015
9	<i>M.abscesus</i>	0.08	0.053	0.045
10	C+	0.392	0.246	0.731

Luego, se realizó la técnica de PCR-ELISA, la cual determinó que no hubo hibridación en las MNTB y en el control negativo, lo cual se demostró en las absorbancias obtenidas (tabla 31). A diferencia de los controles positivos (C+) para las sondas: H445Y, H445D y S450L. Finalmente, se determinó que el PCR-ELISA solo detecta *Mycobacterium tuberculosis*. (Ver figura 26 a, b, c).

**Figura 26.**

Fotografía del PCR-ELISA realizado para determinar la especificidad por medio de sondas que detectan las mutaciones del gen *rpoB*. A) MNTB frente a la sonda H445D B) MNTB frente a la sonda H445Y C) MNTB frente a la sonda S450L (los controles positivos se encuentran resaltados en rojo).



**4.6.2.1 Evaluación de la especificidad entre las sondas** Se realizó una evaluación cruzada del PCR-ELISA utilizando una muestra sensible (H37Rv) frente a una sonda resistente (SR) y una muestra resistente (MR) frente a una sonda sensible (SS). Además, se usó como control una sonda resistente frente a una muestra resistente (tabla 32).

**Tabla 32**

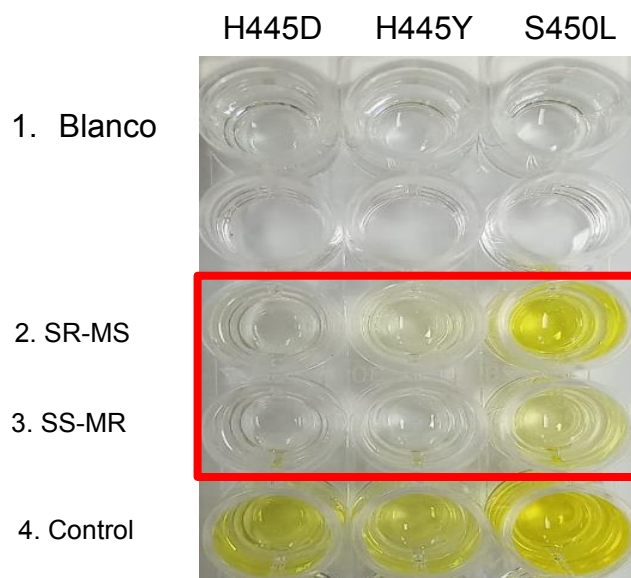
*Evaluación cruzada de sondas resistentes y sensibles.*

Fila	Muestra	H445D (SR)	H445 (SS)
1	Blanco	0.051	X
2	MS	0.029	X
3	MR	X	0.006
4	MR	0.372	X
Fila	Muestra	H445Y (SR)	H445 (SS)
1	Blanco	0.047	X
2	MS	0.093	X
3	MR	X	0.017
4	MR	0.32	X
Fila	Muestra	S450L (SR)	S450 (SS)
1	Blanco	0.05	X
2	MS	0.585	X
3	MR	X	0.214
4	MR	1.089	X

Se observó que las sondas resistentes (H445D y H445Y) no hibridaron con la muestra sensible (H37Rv) y que las sondas sensibles no hibridaron con las muestras resistentes debido a sus bajas absorbancias (tabla 32, figura 27). A excepción de la sonda resistente (S450L) que hibrida con la muestra sensible cuya absorbancia fue de 0.585 y la sonda sensible (S450) hibrida con la muestra resistente cuya absorbancia fue 0.214, pero dichos valores no fueron determinantes debido a que el valor de su control fue muy elevado (1.089).

**Figura 27.**

Fotografía de una placa de ELISA que muestra la especificidad entre las sondas. 1. Blanco de reactivos 2. Sonda resistente frente a muestra sensible. 3. Sonda sensible frente a muestra resistente. 4. Control (sonda resistente frente a muestra resistente). En rojo se resalta el color de la reacción directamente proporcional a la concentración obtenida según la tabla 32.

**4.7 Ensayo Piloto del PCR-ELISA**

**4.7.1 Determinación de la línea de corte (CUT OFF).** Se estableció el CUT OFF para las 3 sondas resistentes, a partir de 16 esputos sensibles de pacientes diagnosticados previamente por Genotype MDRTBplus a las cuales se les extrajo el ADN y se hizo un PCR a los productos que amplificaron una región del gen *rpoB* y se visualizó en una corrida electroforética (figura 12). Luego se realizó el ELISA utilizando las muestras de esputos para la determinación del CUT OFF de las sondas resistentes: H445D, H445Y y S450L respectivamente. Se obtuvieron las siguientes absorbancias (tabla 33).

**Tabla 33**

*Resultados de las absorbancias provenientes de la evaluación de 16 muestras sensibles para las 3 sondas resistentes.*

Sonda H445D	Absorbancias	Sonda S450L	Absorbancias	Sonda H445Y	Absorbancias
Blanco	0.057	Blanco	0.053	BLANCO	0.061
M1	0.024	M1	0.474	M1	0.215
M2	0.012	M2	0.282	M2	0.174
M3	0.025	M3	0.448	M3	0.186
M4	0.011	M4	0.428	M4	0.107
M5	0.023	M5	0.409	M5	0.187
M6	0.006	M6	0.502	M6	0.210
M7	0.021	M7	0.171	M7	0.123
M8	0.017	M8	0.264	M8	0.100
M9	0.021	M9	0.574	M9	0.058
M10	0.004	M10	0.341	M10	0.130
M11	0.038	M11	0.188	M11	0.059
M12	0.005	M12	0.305	M12	0.083
M13	0.026	M13	0.509	M13	0.227
M14	0.025	M14	0.442	M14	0.221
M15	0.015	M15	0.379	M15	0.061
M16 (H37Rv)	0.045	M16 (H37Rv)	0.562	M16 (H37Rv)	0.380
H445D (C+)	0.426	S450L (C+)	0.945	H445Y (C+)	0.780

Se determinó el límite de corte de la suma de (Media + 2 veces la DS) para la sonda S450L siendo el valor de corte de absorbancia de 0.641 y para las sondas H445D y H445Y, se halló de la (Media + 3 veces la DS) siendo los valores de corte de absorbancia: 0.054 y 0.413 respectivamente. (Tabla 34).



**Tabla 34***Cálculo de la Media y la Desviación Estándar para las 3 sondas*

	N° de Muestras	Mínimo	Máximo	Media (M)	1ra Desv. Standard (DS)	2da Desv. Standard (DS)	3ra Desv. Standard (DS)	CUT OFF (M+DS)
Sonda S450L	16	0.171	0.574	0.392	0.124	0.248	0.372	0.641
Sonda H445D	16	0.004	0.045	0.020	0.011	0.023	0.034	0.054
Sonda H445Y	16	0.058	0.380	0.158	0.085	0.170	0.255	0.413

Nota 2: Para la sonda S450L el CUT OFF fue la (M + 2da DS), para las sondas H445D y H445Y el CUT OFF fue (M + 3ra DS) según indica la tabla 34.

Se observó gráficamente el CUT OFF de las 16 muestras utilizando el SPSSv25 (figuras 28, 29 y 30). Para uniformizar los criterios del sistema PCR-ELISA se ha decidido establecer un CUT OFF superior a 0.100 de absorbancia, para la sonda H445D, porque el control positivo fue muy elevado con un valor de 0.426 de absorbancia (tabla 33) y por lo tanto se tuvo un margen para poder establecer un mejor CUT OFF y de este modo evitar algún falso resistente en las muestras analizadas.

**Figura 28.**

Gráfico del límite de corte (CUT OFF) de la sonda S450L. Las absorbancias de las muestras se describen en iconos. Se describen las líneas de punto de corte a continuación: Línea media. Línea (----) 1ra desviación estándar. Línea (---) 2da desviación estándar y Línea (----) 3ra desviación estándar

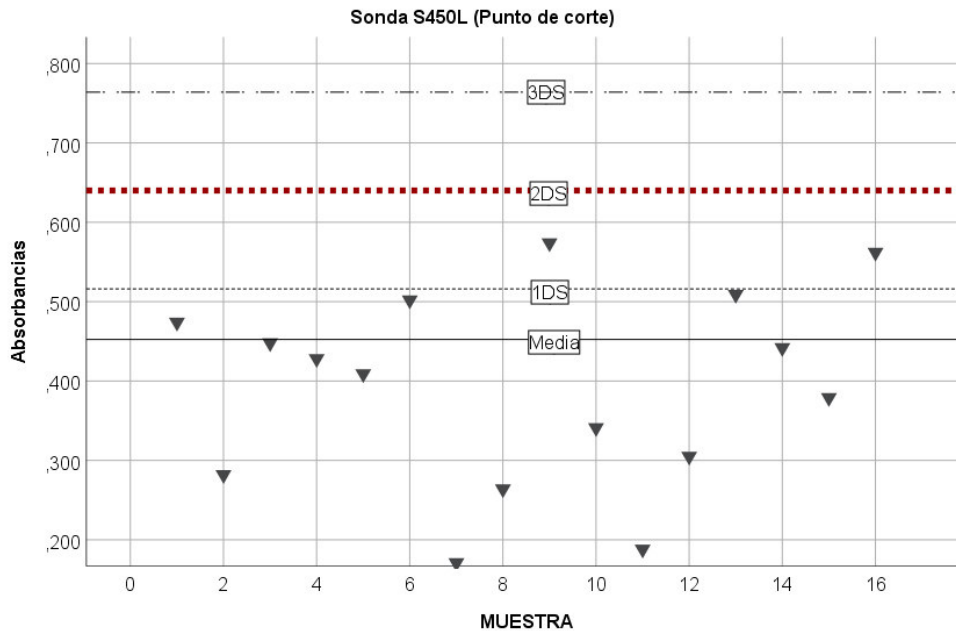
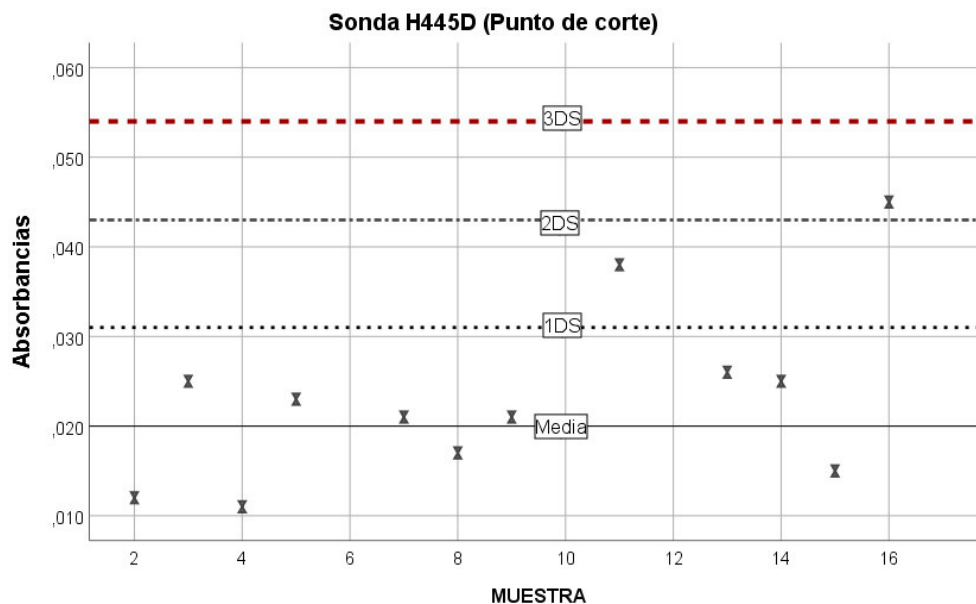
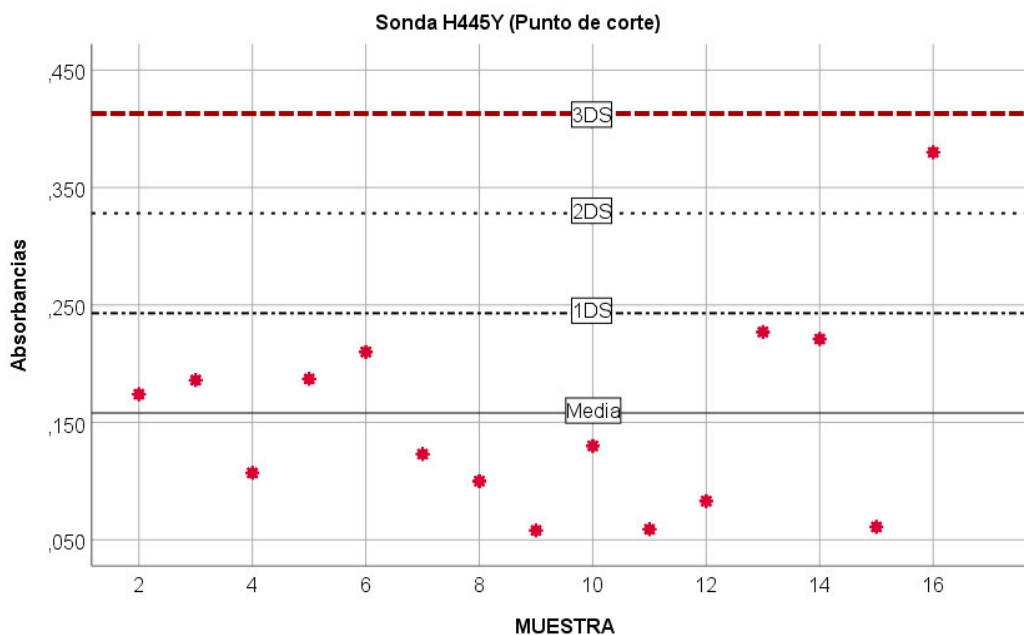
**Figura 29.**

Gráfico del límite de corte (CUT OFF) de la sonda H445D. Las absorbancias de las muestras se describen en iconos. Se describen las líneas de punto de corte a continuación: Línea media. Línea (----) 1ra desviación estándar. Línea (---) 2da desviación estándar y Línea (----) 3ra desviación estándar.



**Figura 30.**

Gráfico del límite de corte (CUT OFF) de la sonda H445Y. Las absorbancias de las muestras se describen en iconos. Se describen las líneas de punto de corte a continuación: Línea media. Línea (----) 1ra desviación estándar. Línea (---) 2da desviación estándar y Línea (----) 3ra desviación estándar.

**4.7.2 Evaluación Piloto**

Se realizó una evaluación piloto de 20 muestras de esputos provenientes del LNRM y diagnosticadas previamente con su perfil de resistencia por GenotypeMDRTBplus a las cuales se les extrajo el ADN por CTAB-lyz, y se hizo una electroforesis a dichos ADN extraídos (figura 8). Lo cual contribuye a poder ver la calidad de los ADN.

Luego, se realizó un PCR a dichos ADN extraídos con las condiciones optimizadas (tabla 8) y posteriormente se hizo una electroforesis a los productos de PCR obtenidos (figura 13). Finalmente, se realizó la técnica de PCR-ELISA con los productos de PCR amplificados de las muestras (1 al 20) y los controles resistentes (H445Y, H445D y S450L). Se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 35).

**Tabla 35**

*Resultados de las absorbancias de las 20 muestras y controles resistentes de la evaluación piloto.*

<b>Muestras</b>	<b>H445D</b>	<b>H445Y</b>	<b>S450L</b>	<b>Perfil de Resistencia</b>
<b>Blanco</b>	0.045	0.046	0.044	
<b>M1</b>	0.044	0.153	0.649	Resistente
<b>M2</b>	0.086	0.238	0.866	Resistente
<b>M3</b>	0.050	0.177	0.486	Sensible
<b>M4</b>	0.005	0.012	0.059	ND
<b>M5</b>	0.012	0.022	0.119	ND
<b>M6</b>	0.016	0.087	0.211	Sensible
<b>M7</b>	0.075	0.233	0.844	Resistente
<b>M8</b>	0.065	0.220	0.696	Resistente
<b>M9</b>	0.032	0.101	0.488	Sensible
<b>M10</b>	0.058	0.172	0.795	Resistente
<b>M11</b>	0.030	0.127	0.147	Sensible
<b>M12</b>	0.041	0.152	0.646	Resistente
<b>M13</b>	0.013	0.096	0.146	Sensible
<b>M14</b>	0.018	0.074	0.284	Sensible
<b>M15</b>	0.075	0.262	0.816	Resistente
<b>M16</b>	0.042	0.150	0.598	Sensible
<b>M17</b>	0.010	0.056	0.206	Sensible
<b>M18</b>	0.008	0.032	0.101	ND
<b>M19</b>	0.025	0.182	0.449	Sensible
<b>M20</b>	0.025	0.187	0.421	Sensible
<b>Controles (c+)</b>	0.321	0.651	1.118	

Nota 3. Las muestras ND no amplificaron por ende no fueron consideradas en el ELISA

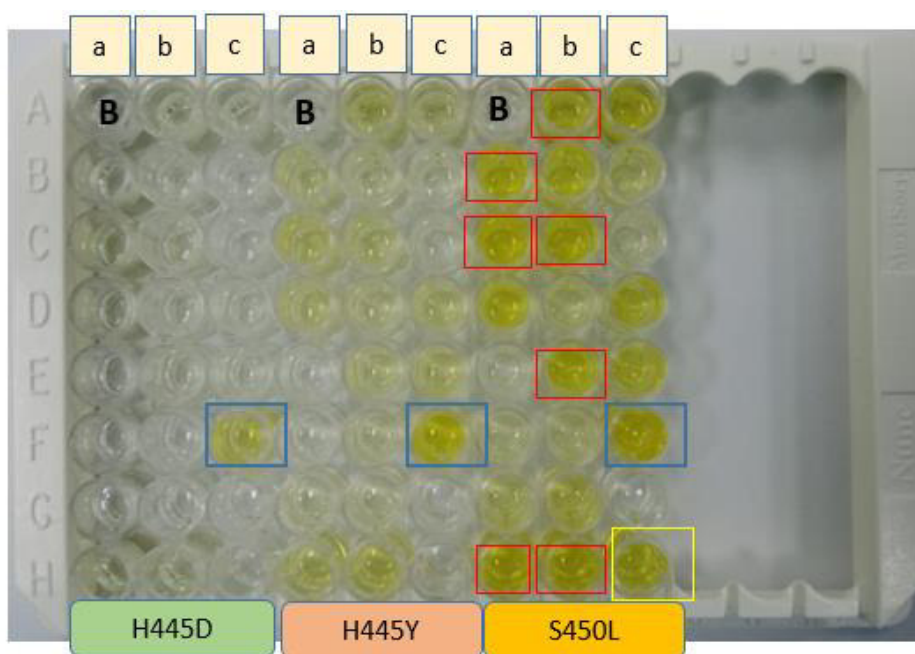
Las muestras: M-9, M-14 y M-16 tuvieron una BK de (1 a 2 +) y un tiempo de almacenamiento de 12 a 21 días y muy poca concentración de ADN y no se visualizaron en el gel de electroforesis al 1%, debido a que aparentemente no hubo presencia de ADN (figura 8) asimismo se tuvo amplificado tenue de las muestras M-9 y M-14 excepto M-16 que, si amplifico correctamente, dichas muestras hibridaron en el PCR-ELISA (figura 31).

Las muestras M-4, M-5 y M-18 tuvieron un tiempo de almacenamiento de 6 a 20 días y una BK de (1 a 2 +) pese a tener mayor concentración de ADN, el PCR de dichas muestras no amplificaron (figura 13) y por ende no hibridaron en el ELISA.

Además, no se evidenció las mutaciones H445D y H445Y en las muestras analizadas por el PCR-ELISA (figura 31), asimismo coincide con lo determinado por el Genotype MDRTBplus.

### Figura 31

Fotografía de una placa de ELISA. Pocillos con muestras del (piloto) a) muestras del 1 al 7 b) muestras del 8 al 15 c) muestras del 16 al 20 por cada sonda. Blanco de reactivos (B). Controles resistentes (CR) resaltados de azul y Control sensible (CS) resaltado en amarillo. Las muestras que son resistentes (M1, M2, M7, M8, M10, M12 y M15) en la sonda S450L se resaltaron en rojo (Tabla 35).



Una vez que se revelaron los resultados del PCR- ELISA, se compararon con los resultados de perfil de resistencia obtenido del GenotypeMDRTBplus. Donde observamos discordancias en las siguientes muestras: M9, M11, M13 y M14, las cuales dieron sensibles para el PCR-ELISA y resistentes para el GenotypeMDRTBplus (Tabla 36).

**Tabla 36**

*Resultados de la comparación entre el GenotypeMDRTBplus y el PCR-ELISA.*

N°	GENOTYPE	PCR-ELISA
M1	Resistente	Resistente
M2	Resistente	Resistente
M3	Sensible	Sensible
M4	Sensible	ND
M5	Resistente	ND
M6	Sensible	Sensible
M7	Resistente	Resistente
M8	Resistente	Resistente
<b>M9</b>	<b>Resistente</b>	<b>Sensible</b>
M10	Resistente	Resistente
<b>M11</b>	<b>Resistente</b>	<b>Sensible</b>
M12	Resistente	Resistente
<b>M13</b>	<b>Resistente</b>	<b>Sensible</b>
<b>M14</b>	<b>Resistente</b>	<b>Sensible</b>
M15	Resistente	Resistente
M16	Sensible	Sensible
M17	Sensible	Sensible
M18	Sensible	ND
M19	Sensible	Sensible
M20	Sensible	Sensible

Nota 4. Se señala **en negro** las muestras que fueron discordantes en la evaluación piloto

**4.7.3 Resultados del análisis de concordancia (Índice Kappa de Cohen).** Se observó una sensibilidad del 86.7% del sistema PCR-ELISA que correspondió a una detección acertada 13 de 15 muestras (13/15). No se consideraron las muestras M-11 y M-13 en dicho análisis. Además, se obtuvo un valor de índice de kappa de Cohen de 0.737, lo cual denota que la técnica tuvo una **“buena concordancia”** entre el GenotypeMDRTBplus y el PCR-ELISA (tabla 37). Según los rangos establecidos en la tabla 16.

**Tabla 37**

*Índice de Kappa de cohen entre GenotypeMDRTBplus\*PCR-ELISA*

			Genotype-MDRTBplus		
			Sensible	Resistente	Total
PCR-ELISA	Resistente	Recuento	7	2	9
		% del total	46,7%	13,3%	60,0%
	Sensible	Recuento	0	6	6
		% del total	0%	40,0%	40,0%
Total		Recuento	7	8	15
		% del total	46,7%	53,3	100,0%

	Valor	Error estándar asintótico <sup>a</sup>	T aproximada <sup>b</sup>	Significación aproximada
Medida de acuerdo Kappa	0,737	0,167	2,958	0,003
N de casos válidos	15			

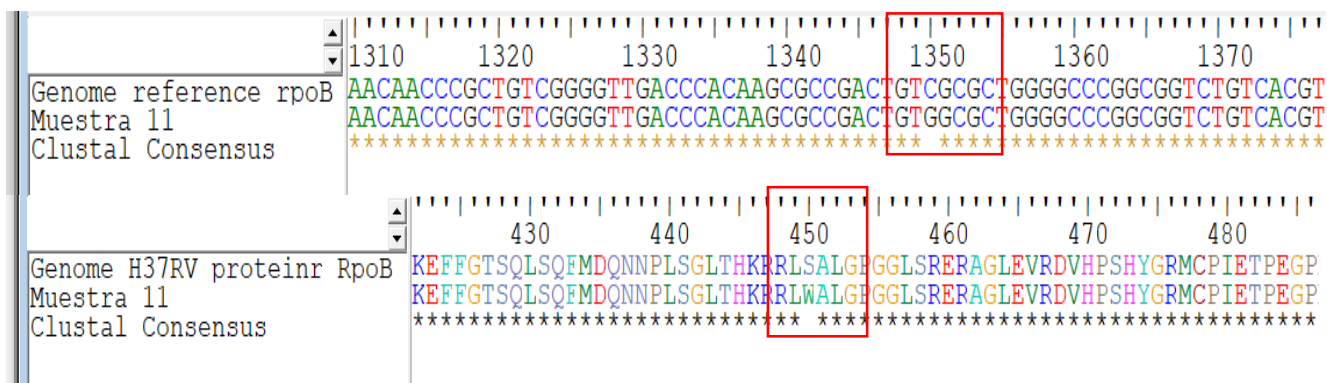
*a. No se presupone hipótesis nula*

*b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula*

Fueron secuenciadas las muestras discordantes (M-11 y M-13) de la evaluación piloto las cuales poseen la ausencia de Wild Type 8 (WT8) en el GenotypeMDRTBplus y que no fueron detectadas por las sondas: H445D, H445Y y S450L del sistema PCR-ELISA. Se encontró que ambas muestras tuvieron mutaciones en el codón S450W y L452P respectivamente.

**Figura 32.**

*Fotografía donde se visualiza la sustitución de Citosina por Guanina del nucleótido 1350 donde se ubica la mutación en el codón 450 de Serina por Triptófano.*

**Figura 33.**

*Fotografía donde se visualiza la sustitución Timina por Citosina del nucleótido 1356 donde se ubica la mutación en el codón 452 de Leucina por Prolina.*





## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este trabajo de tesis aborda la estandarización de la técnica de PCR-ELISA para la detección de la resistencia a RIF mediante sondas biotiniladas para lo cual se analizaron varios parámetros entre ellos la extracción de ADN.

El aislamiento exitoso de ADN de MTB, especialmente de muestras clínicas, requiere un tratamiento severo para debilitar la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Ndhlovu et al., 2018). La preocupación por obtener un ADN de calidad es un problema debido a que varias moléculas orgánicas e inorgánicas, precipitan junto a los ácidos nucleicos y que puede inhibir el PCR y afectar reacciones enzimáticas posteriores como el ELISA (Minas et al., 2011), (Arseneau et al., 2017).

El método de bromuro de cetiltrimetilamonio y lisozima (CTAB-lyz) resultó ser adecuado para la extracción directa de ADN a partir de esputo comparado con otros protocolos de extracción, debido a que estas muestras presentan alta concentración de ADN humano (Ndhlovu et al., 2018). El método CTAB-lyz presentó un mayor rendimiento en concentración y pureza de ADN de MTB si se obtiene a partir de cepas (Jain et al., 2002) en comparación con otros protocolos de extracción.

En el presente trabajo se utilizaron muestras de esputos y cepas a las cuales se les extrajo el ADN por el método de CTAB-lyz. Los esputos suelen ser almacenados, refrigerados hasta su inactivación y a partir de ellos se extrae el ADN.

Se ha observado que la extracción de ADN tuvo diferencias entre las concentraciones de este ácido nucleico entre las muestras (tabla 38). Hubo muestras como: M-9, M-11, M-13 y M-14 que tuvieron muchos días de almacenamiento y cuya baciloscopia fue entre (1 y 2+) dichas muestras tuvieron o no amplificado. En las muestras M-9 y M-14 hubo ADN de muy baja

concentración ( $<1\text{ng}/\mu\text{L}$ ), por tanto, tuvieron amplificado tenue. Por otro lado, las muestras M-11 y M-13 a pesar de tener una mayor concentración de ADN ( $>1\text{ng}/\mu\text{L}$ ), una de ellas tuvo un buen amplificado y la otro tenue respectivamente. Sin embargo, como no se tuvo un control en el tiempo de refrigeración y la cantidad de cruces del esputo esto ha podido afectar la concentración de ADN que se obtuvo (tabla 18 y 19).

Cuando se extrajo ADN proveniente de cepas, se obtuvieron concentraciones mayores y una pureza óptima de ADN (tabla 17), lo cual fue reportado por algunos investigadores que han sugerido que el método CTAB-lyz es eficaz para la extracción de ADN desde cultivo (Amaro, Duarte, Amado, Ferronha, & Botelho, 2008).

De las muestras restantes, 9 estuvieron en un rango entre 19 a 38 días de almacenamiento se obtuvo resultados concordantes con el GenotypeMDRTBplus a pesar de que había pocas cruces hubo buen amplificado, esto podría deberse a que el moco del esputo haya generado un efecto protector al ADN o posiblemente hubo poca concentración de nucleasas que degradase los ADN y también pudo deberse en un error en la lectura de la baciloscopia. Otro grupo con menos de 18 días de almacenamiento entre (1 a 3+) cruces tuvo mejor concentración de ADN a diferencia del grupo de muestras anteriores. A excepción de la muestra 16 que no mostró un ADN de buena calidad, pero sí un buen amplificado. Se determinó que a mayor tiempo de almacenado de las muestras y a menor cantidad de cruces por baciloscopia puede afectar la concentración de ADN extraída de los esputos (tabla 38). Esto es respaldado por el estudio realizado (Ndhlovu et al., 2018), que extrajo ADN de 40 muestras con más de (3+) cruces sin mayor tiempo de espera y obtuvieron mejores resultados de concentración y calidad de ADN. Por lo tanto, es necesario que se extraiga el ADN dentro de las 24 hrs desde la toma de muestras, ya que tiempos prolongados de refrigeración causa lisis en las células y bacilos de MTB (Cormican et al., 1992).

**Tabla 38***Características de las 20 muestras de esputo analizadas en el ensayo piloto*

Nº de muestra	Nº de cruces	Días de almacenamiento	Concentración	Calidad de ADN	Amplificación de producto de PCR
1	2+	19	2,07 ng/μL	2	Buen amplificado
2	2+	18	0,78 ng/μL	1	Buen amplificado
3	3+	15	1,60 ng/μL	2	Buen amplificado
4	2+	15	1,40 ng/μL	2	No amplifico
5	1+	20	1,10 ng/μL	2	No amplifico
6	2+	15	3,26 ng/μL	2	Buen amplificado
7	3+	11	1,58 ng/μL	2	Buen amplificado
8	3+	17	1,35 ng/μL	2	Buen amplificado
9	2+	17	0,085 ng/μL	0	Tenue amplificado
10	2+	38	3,03 ng/μL	1	Buen amplificado
11	1+	24	3,40 ng/μL	1	Buen amplificado
12	2+	24	4,04 ng/μL	1	Tenue amplificado
13	1+	24	1,28 ng/μL	1	Tenue amplificado
14	1+	21	0,053 ng/μL	0	Tenue amplificado
15	1+	18	2,02 ng/μL	1	Buen amplificado
16	1+	13	0,34 ng/μL	0	Buen amplificado
17	2+	13	0,99 ng/μL	2	Buen amplificado
18	1+	6	1,47 ng/μL	2	No amplifico
19	2+	5	7,5 ng/μL	2	Buen amplificado
20	1+	6	6,2 ng/μL	2	Buen amplificado

Para la estandarización del PCR para una región de 255pb del gen rpoB, se realizó una gradiente de temperatura de hibridación de los primers desde 60°C a 65°C (Tabla 4). Se observó que a diferentes temperaturas se generó una misma banda de amplificación, pero cuando se realizó el PCR a una temperatura de 60°C con ADN humano, no se observó amplificación; a diferencia de otras temperaturas que sí amplificaron (figura 25). Este resultado fue similar a lo reportado por

(Garcia et al., 2001) que usó el mismo diseño de primers, pero cuya temperatura de hibridación fue a 65°C.

Luego de haber realizado un gradiente de concentración de  $MgCl_2$  desde 0mM a 3mM (tabla 6), se observó que a diferentes concentraciones hubo una misma banda de amplificación de 255pb (figura 10), pese a ello se determinó que la concentración de 1.5 mM de  $MgCl_2$ , fue la concentración más adecuada debido a que este parámetro coincidió con lo reportado por (Garcia et al., 2001) y porque con esta concentración se gasta menos insumo, pero se obtiene el mismo resultado.

Una vez estandarizado los parámetros del PCR se prosiguió a evaluar la metodología del PCR-ELISA. Usando el artículo de (Garcia et al., 2001) como referencia de este sistema.

Para ello se hizo un primer ensayo del PCR-ELISA con la premisa de utilizar una sonda marcada con Digoxigenina y el uso del primer RP8T con la etiqueta de Biotina, el cual generó un producto de PCR etiquetado en el extremo 5'. Ya en los pocillos de la placa de ELISA se impregnaron 20  $\mu g/mL$  de estreptavidina que interactuaron con el producto de PCR denaturado. Después, se realizó una mezcla entre la sonda y el buffer de hibridación a una temperatura de 60°C por 1 hora. Posteriormente se agregó una concentración de 150 mU de conjugado antidigoxigenina-POD diluida en 1/1000 y que fue revelada con TMB.

Tras varios intentos fallidos se llegó a la conclusión que esta premisa no funcionó debido a que pudo darse 2 casos. El producto de PCR de 255 pb marcado con “Biotina” fue muy grande para unirse a las 4 subunidades de estreptavidina, posiblemente debido a que algunos de los productos de PCR, se unieran entre sí y se horquillaran evitando que las sondas con “Digoxigenina” no se unan por complementariedad, mientras que el resto de productos no lograron unirse a las estreptavidina restantes o también se diera el caso que todos los productos de PCR se

unieran entre sí (como una madeja de lana) a las estreptavidinas, lo que condujo posiblemente en ambos casos a que la sonda no se adhiriera complementariamente al producto; por un impedimento estérico. En adelante se vio por conveniente usar sondas cortas de 22 a 24 nucleótidos marcadas con Biotina y producto de PCR etiquetado con digoxigenina.

Para la estandarización del sistema PCR- ELISA, fue necesario escoger primero las sondas que detectan las mutaciones a RIF que confieren un alto nivel de resistencia y que además son de más alta frecuencia en la población peruana (Agapito et al., 2002) y (Asencios Solis, Galarza, et al., 2012). Estas mutaciones se ubicaron en los codones: 450 (Serina por Leucina) y 445 (Histidina por Tirosina e Histidina por Aspartato) y que a su vez también han demostrado una resistencia cruzada con rifabutina (Karimi et al., 2020). Se utilizaron 4 controles descritos en el punto 3.4.2, que fueron secuenciadas por el método Sanger que permitió identificar dichas mutaciones puntuales (figura 14, 15 y 16). Una vez establecido los controles se estandarizaron los parámetros del PCR-ELISA utilizando lo descrito en la tabla 7.

Para la evaluación de las diferentes temperaturas de hibridación: 42°C, 45°C, 48°C, 50°C, 52°C, 55°C y 58°C (tabla 22) se usó el buffer de hibridación (SSPE 6X). Se obtuvieron 2 temperaturas: 45°C y 50°C las cuales dieron altas absorbancias. Para poder definir la temperatura óptima a la cual hibride la sonda y el producto de PCR se realizó un ensayo con las diferentes astringencias del buffer de hibridación (SSPE 6X).

Se probaron diferentes astringencias del buffer SSPE: Baja (3 X), media (1.5X) y alta (0.5X), las cuales fueron utilizadas para evaluar las 2 temperaturas: 45°C y 50°C. Se definió una óptima hibridación a 50°C a baja astringencia (SSPE 3X), que aseguró una correcta unión del producto denaturado a la sonda (tabla 23 y figura18). Sin embargo, estudios reportan que la concentración de sal gobierna la hibridación de ácidos nucleicos de acuerdo con la ecuación de

Schildkraut-Lifson (Rose et al., 2002), debido a que un **bajo contenido de sodio genera los siguientes efectos: menos estructura secundaria del ADN objetivo, más interacciones electrostáticas entre dianas de ADN hibridado y por lo tanto, mejor hibridación**; caso contrario cuando una concentración de sodio es alta disminuye la formación del híbrido (Poulsen et al., 2008). Sin embargo, el PCR-ELISA funcionó correctamente a baja astringencia, pese a lo reportado por otros autores como (Zhou et al., 2020) cuya hibridación fue a 63°C con alta astringencia. Finalmente, este buffer SSPE 3X aseguró la hibridación entre la Sonda y producto de PCR permitiendo que dicha hibridación sea específica.

Para la evaluación del parámetro de estreptavidina se probó distintas concentraciones que iban desde 1 µg/mL hasta 80 µg/mL (tabla 24) usándose la sonda S450L como control. Cabe mencionar que la estreptavidina es un tetrámero de 4 subunidades, que se une a 4 moléculas de biotina formando al complejo estreptavidina-biotina, que tiene una afinidad extraordinariamente alta y contiene una de las interacciones no covalentes más fuertes conocidas (Kuntz et al., 1999). Se encontró mucha información donde se usó este componente de manera similar a la técnica PCR-ELISA usada en esta Tesis, pero en la detección de otros microorganismos, por ejemplo: (Kobets et al., 2010), que usó 0.5 µg/mL de estreptavidina en buffer carbonato (pH 7.0) para detectar especies de *Leishmania*. (Masake et al., 2002), que usó placas de microtitulación (MaxiSorp, F96) prefijadas con estreptavidina a una concentración de 1µg/mL en buffer carbonato de sodio (pH 9.6) para la detección de *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma vivax*. Dichos estudios fueron utilizados como base para la estandarización de este parámetro. Se determinó que la concentración óptima de estreptavidina fue de 10 µg/mL que ayudó a fijar una concentración apropiada de sonda, a diferencia de lo reportado por (Zhou et al., 2020) quien usó 20 µg/mL para la detección de MTB.

Adicionalmente se observó que una concentración superior a la establecida saturó los pocillos con este componente, impidiendo poder capturar más sonda (tabla 24).

Para la estandarización del parámetro de sonda se utilizó concentraciones de 0.5 hasta 20 pmol/mL, y se usó la sonda (S450L) como control. Se encontraron artículos que reportan el uso de 7.5 pmol /mL de sonda para la detección de *Vibrio parahaemolyticus* (Di Pinto et al., 2012) y 15 pmol /mL de sonda para la detección de *Brugia malayi* causante de filiarisis (Rahmah et al., 1998). En esta Tesis se determinó que la concentración óptima fue de 20 pmol/mL (tabla 25, figura 20), este resultado fue extrapolado al resto de sondas: H445D y H445Y y permitió utilizar esta cantidad de sonda en los pocillos de una placa de ELISA impregnados con estreptavidina (10 µg/mL). Este valor fue más elevado a lo reportado por (Zhou et al., 2020) que usó 8 pmol /mL de sonda para la detección de MTB.

Para la estandarización de producto de PCR se utilizó concentraciones desde 0.5 ng hasta 4ng, para las 3 mutaciones que confieren la resistencia a RIF (Tabla 26 y figura 21). Para elegir la concentración adecuada de producto de PCR que permita hibridar la sonda se determinó que la concentración de 4ng de producto de PCR fue la más apropiada para cada mutación. Las condiciones del sistema PCR-ELISA fueron estandarizadas para que cada producto de PCR funcione a una misma concentración óptima. Por otro lado se encontraron artículos que mencionan únicamente los volúmenes de producto de PCR que se usaron en sus sistemas PCR-ELISA como: (Garcia et al., 2001), que usó 10µL de producto de PCR y (Zhou et al., 2020) quien usó 5 µL de producto PCR, ambos para la detección de la resistencia en MTB. En ninguno de estos casos se menciona la concentración de producto de PCR.

Para la estandarización del parámetro de conjugado Anti-digoxigenina marcado con la enzima peroxidasa (POD) se probaron diferentes concentraciones desde 50 mU (1/3000) hasta 150

mU (1/1000). Para poder detectar la hibridación entre la sonda y el producto de PCR se determinó que la concentración óptima de conjugado fue 150mU (1/1000) (tabla 27 y figura 22). Este resultado fue muy similar a lo reportado por (Bazzichi et al., 1998), quien utilizó la misma concentración para la detección del virus *Epstein-Barr* en su metodología de PCR-ELISA. Sin embargo, otros estudios como: (Rahmah et al., 1998) utilizó una concentración 1/800 de conjugado para la detección de *Brugia malayi*; mientras que (Zhou et al., 2020) utilizó una concentración de 1/5000 para la detección de MTB en su PCR-ELISA, y que fue 5 veces más diluida que la usada en esta Tesis.

La evaluación de la sensibilidad del PCR-ELISA fue a partir de la concentración de 4 ng de producto de PCR establecida en la estandarización (tabla 26). Para los 3 controles (punto 3.4.2) se les realizó una dilución seriada, para las mutaciones H445D y H445Y se obtuvo un límite de detección de 400 pg de concentración (tabla 29 y figura 23). Mientras que para la mutación (S450L) se detectó una sensibilidad de 40 pg debido a que esta última tiene tendencia a tener valores altos de absorbancia, este comportamiento coincide como lo reportado por (Zhou et al., 2020) y (García et al., 2001) ya que evidenciaron eficiencias distintas entre sus sondas. Para (García et al., 2001) su sistema PCR-ELISA tuvo una sensibilidad de 0.1 pg en al menos una de sus cinco sondas sensibles que en comparación con el sistema PCR-ELISA desarrollado en esta tesis fue menos sensible ya que ellos usaron muestras con más de 3 cruces.

Posteriormente, se realizó una sensibilidad directa del PCR-ELISA al realizar diluciones del producto de PCR en base al volumen y no a la cuantificación del producto de PCR (tabla 30 y figura 24). Lo que permitió una detección hasta la dilución 1/10 en el ELISA asociadas a las 2 mutaciones: H445Y y H445D e incluso de 1/100 para la mutación S450L (figura 24). Lo que corrobora los resultados obtenidos en la sensibilidad del PCR-ELISA.



Para la evaluación de la especificidad del PCR-ELISA se usaron 7 MNTB y controles de las cuales 5 amplificaron (*Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium abscesus*) y las restantes no: *M. fortuitum* y *M. chelonae* (figura 25). Las muestras que no amplificaron fueron debido a que los primers usados no reconocieron la región de interés. Sin embargo, para las otras MNTB que sí amplificaron al realizarse el ELISA no hibridaron. Por lo tanto, el PCR-ELISA tiene 100% de especificidad (tabla 31 y figura 26). Cabe mencionar que el control negativo de ADN humano tampoco amplificó y H37Rv, usado como control positivo, sí amplificó. Por lo tanto, se confirma la especificidad de los cebadores del PCR y las sondas que reconocen únicamente a *Mycobacterium tuberculosis*. Estos resultados son similares a lo obtenido por (García et al., 2001) en su metodología PCR-ELISA.

Para evaluar que las sondas resistentes no hibriden con muestras sensibles se realizó una evaluación cruzada entre sondas en el PCR-ELISA (tabla 32 y figura 27) identificándose lo siguiente: Sonda resistente (SR) no hibridó con la muestra sensible (H37Rv) a excepción por la sonda (S450L), que tuvo una absorbancia de 0.585, a pesar de su alto valor si lo comparamos con el control positivo (SR-MR) que fue de 1.089 se podría evidenciar de que no hubo hibridación. Adicionalmente, se probaron las sondas sensibles (H445 y S450) las cuales no hibridaron con las muestras resistentes (con mutación) debido a sus bajas absorbancias menores a 0.214. En ambos casos se probó la capacidad de discriminación de la SR y SS en MS y MR respectivamente. Este resultado fue muy similar a lo reportado por (García et al., 2001) que usó sondas sensibles (P1 y P2) con muestras resistentes (M1, M2 y M5) y cuya ausencia de hibridación en P1 y P2 corroboró la presencia de mutación cuyos valores de OD fueron menores a 0.350. Finalmente se observó un comportamiento similar entre las sondas usadas en ambos sistemas de PCR-ELISA.

Para el ensayo piloto primero se estableció el punto de corte (CUT OFF) del PCR-ELISA utilizando 16 esputos de pacientes con TB, las cuales fueron determinados previamente como sensibles a las drogas por GenotypeMDRTBplus (tabla 33).

El CUT OFF para las sondas H445D y H445Y fueron las siguientes absorbancias: 0.054 y 0.413 respectivamente, considerando 3 desviaciones estándar. Para la sonda S450L el CUT OFF fue de 0.641 considerando 2 desviaciones estándar (tabla 34 y figuras 28, 29 y 30). Cabe señalar que se realizó un ajuste en el valor de CUT OFF para la sonda H445D, debido al reducido valor de OD (0.054), que no permitió una correcta diferenciación de las muestras resistentes de sensibles. Por lo tanto, debido al elevado valor de OD de su control positivo, **se decidió que el valor de CUT OFF fuera mayor de 0.100, de este modo se tuvo un margen para establecer el punto de corte adecuado y uniformizar los criterios de discriminación.**

**Estos resultados fueron similares a lo reportado por autores como** (Garcia et al., 2001), que estableció lo siguiente: Absorbancias mayores a 0.350 (resistentes), menores a 0.250 (negativos) y absorbancias superiores a 1.0 (sensibles). (Zhou et al., 2020), por el contrario, estableció que su CUT OFF superior a 1.0 (resistentes) y valores inferiores a 0.350 (sensibles). Sin embargo, este autor no explica como considera a sus muestras cuando tienen absorbancias entre 0.350 a 1.0. **Este comportamiento de las sondas confirma el hecho de que no todas trabajan con la misma eficiencia** debido a que las sondas fueron diseñadas y probadas con el fin de identificar aquellas que dieron la mejor discriminación entre los distintos alelos del gen rpoB de tipo salvaje (Garcia et al., 2001) y alelos de tipo mutante o resistente (Zhou et al., 2020) respectivamente.

Para la evaluación piloto se recibieron 20 muestras de esputo con BK positiva y cuyo perfil de resistencia fue determinado por Genotype MDRTBplus. Las muestras provenían del LRNM y

se desconocían los resultados de perfil de resistencia (ciego). A estas muestras se les extrajo ADN por el método CTAB-lyz y cuantificadas (Tabla 19), además se observó la calidad de los ADN (figura 8). Se les realizó el PCR-ELISA con las condiciones optimizadas (tabla 20, 21 y 28).

Los resultados del PCR-ELISA de las 20 muestras mostraron que 3 de ellas (M-4, M-5 y M-18) tenían un BK entre (1 a 2 +) y pese a tener una mayor concentración de ADN no hubo amplificación de producto de PCR, probablemente debido a que la concentración de ADN detectada fuera más ADN humano que de *Mycobacterium tuberculosis*. Por ello el análisis del PCR-ELISA se realizó en base a 17 muestras (tabla 35).

Al revelarse los resultados del ciego se encontró que 2 muestras (M-11 y M-13) fueron detectadas indirectamente y consideradas como resistentes a RIF por resistencia inferida (Vigo et al., 2019), debido a la ausencia del Wild Type (WT8) entre los codones 447 al 452 (Andre et al., 2017) puesto que ambas muestras no se encontraron definidas en las bandas de mutaciones de resistencia del GenotypeMDRTBplus. Estas muestras tuvieron que ser secuenciadas para poder verificar la presencia de mutaciones fuera de las regiones que detecta el GenotypeMDRTBplus. En la muestra 11 se encontró la sustitución de Citosina por Guanina del nucleótido 1350, donde se ubicó la mutación en el codón 450 de Serina por Triptófano (S450W, figura 32) y para la muestra 13 se halló la sustitución Timina por Citosina del nucleótido 1356 donde se ubica la mutación en el codón 452 de Leucina por Prolina (L452P, figura 33).

(Vigo et al., 2019) señaló que la mutación S450W tiene una alta frecuencia en el mundo, pero no en Perú y para la mutación L452P tiene una frecuencia moderada pero que en Perú no es frecuente. Las sondas utilizadas en este sistema no detectan esas 2 mutaciones descritas anteriormente, por lo tanto, las muestras M-11 y M-13 fueron retiradas del análisis de concordancia

por lo que para el PCR-ELISA ambas muestras fueron sensibles debido a que las sondas usadas únicamente detectan las mutaciones H445Y, H445D y S450L.

Se calculó la concordancia (Índice de kappa “k”) entre GenotypeMDRTBplus (estándar de referencia) y la técnica PCR-ELISA (tabla 35 y figura 31). Se encontró un valor  $k = 0.737$  (tabla 37), que correspondió a una buena concordancia entre ambas técnicas (tabla 16). Se observó una sensibilidad del 86.7% del sistema PCR-ELISA que correspondió a una detección certera de 13 de 15 muestras, como se observa en la tabla 36.

Por otro lado, las muestras (M-9 y M-14) fueron discordantes en la detección de la resistencia, porque se observó una relación entre la extensa cantidad de días de refrigeración de las muestras y una baciloscopia menor a 3+, que conllevó a una baja concentración de ADN, que generó tenue amplificado, y a su vez a una pobre hibridación y por ende a un resultado falso sensible en el PCR-ELISA.

En el análisis total del PCR-ELISA, al retirar las 4 muestras discordantes: M-9 y M-14 por baja concentración de ADN y que generó un resultado falso sensible y para el caso de M-11 y M-13, porque se encontraron fuera de la zona de detección de las sondas usadas, se obtuvo un valor ( $k = 0.553$ ), que determinó una concordancia aceptable entre ambas técnicas obteniéndose una sensibilidad del 76.5% que correspondió a una detección acertada 13 de 17 muestras.

Debido a estos hallazgos se determinó que la capacidad de detección del PCR-ELISA se verá afectada en su sensibilidad cuando existan muestras con mutaciones que no sean detectadas por las sondas utilizadas en esta tesis.

Finalmente, en esta tesis se confirma lo mencionado por (García et al., 2001) y (Zhou et al., 2020) que señalaron que la mutación más predominante fue S450L. En esta tesis se determinó que esta mutación estuvo presente en 7/13 muestras (53.8 %). Además, se determinó que el 46.2

% (6/13) correspondieron a muestras sensibles. Finalmente, no se reportó muestras con las mutaciones H445D y H445Y en el PCR-ELISA ni en el GenotypeMDRTBplus.

Del análisis de kappa realizado se determinó que la concordancia real del sistema PCR-ELISA fue de  $k= 0.737$  correspondiente a una sensibilidad del 86.7% de (13/15) y una especificidad del 100%.

El PCR-ELISA a diferencia de otras pruebas moleculares, no requiere el uso de equipos costosos, como la PCR en tiempo real o la secuenciación de ADN; en su lugar, utiliza instrumentos básicos, económicos y reactivos comúnmente disponibles, que ya están presentes en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico. Por lo tanto, el PCR-ELISA resultó ser una técnica sencilla, de bajo costo y de fácil implementación en cualquier establecimiento de salud para la detección rápida de la resistencia.

## VI. CONCLUSIONES

- Se logró optimizar los parámetros del PCR para obtener una amplificación exitosa de los 3 genes implicados en la resistencia a RIF.
- Se estandarizaron todos los parámetros del PCR-ELISA estableciéndose una temperatura de hibridación a 50°C, buffer de hibridación (SPPE 3X) a baja astringencia, concentración de estreptavidina a 10 µg/mL, concentración de sonda a 20 pmol/mL, concentración de producto de PCR a 4ng y concentración de conjugado a 150mU (1/1000).
- La sensibilidad del sistema PCR-ELISA fue de 400 pg para las sondas sintetizadas H445D y H445Y y de 40 pg únicamente para la sonda S450L y la especificidad del PCR-ELISA fue del 100% únicamente para *Mycobacterium tuberculosis*.
- Se logró optimizar un PCR-ELISA para la detección de las 3 mutaciones más frecuentes a RIF con una “buena concordancia” K (0.737) y se identificaron 2 mutaciones S450W (M-11) y L452P (M-13), que no fueron detectadas por el sistema PCR-ELISA.
- No se detectaron las mutaciones H445D y H445Y en las muestras analizadas por el sistema PCR-ELISA y GenotypeMDRTBplus. La mutación más frecuente fue S450L (53.8%) en las muestras analizadas en el PCR-ELISA (ensayo piloto), las muestras restantes fueron sensibles (46.2%).

## VII. RECOMENDACIONES

- Se sugiere buscar un método de extracción más eficiente y rápido que permita recuperar mayor concentración de ADN proveniente de muestras de esputos con menos de (1+) cruz de baciloscopia y en menor tiempo.
- Se recomienda usar muestras de esputo con baciloscopia con mínimo de 2+ y que sean procesadas dentro de las 72hrs desde la toma de muestra.
- De las evaluaciones en el PCR ELISA se recomienda que el conjugado y la sonda deben ser preparados en el momento de procesamiento pudiéndose reutilizar dentro de las 24 hrs siguientes porque pasado ese tiempo se reduce la eficiencia de dichos componentes.
- Se recomienda que el Sistema PCR-ELISA, incorpore sondas Wild type para ampliar la detección de otras mutaciones no detectadas por las sondas y que también otorgan resistencia a Rifampicina.
- Se sugiere realizar un estudio para poder determinar el poder real del PCR-ELISA en la detección de la resistencia a RIF.
- Se recomienda complementar la evaluación con sondas para la detección de la resistencia a INH y así tener un sistema que detecte las 2 principales drogas para el tratamiento de la tuberculosis.

### VIII. REFERENCIAS

- Agapito, J., Neyra, V., Castro, J., Accinelli, R., Rodríguez, I., & Espinoza, J. R. (2002). Caracterización de las mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a la rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 19(3), 117–123. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1726-46342002000300003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-46342002000300003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Alcaide, F. (2017). Diagnóstico microbiológico actual de la tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(7), 399–402. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.06.003>
- Andre, E., Goeminne, L., Cabibbe, A., Beckert, P., Kabamba Mukadi, B., Mathys, V., Gagneux, S., Niemann, S., Van Ingen, J., & Cambau, E. (2017). Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(3), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.006>
- Arias, F., & Herrera, T. (2016). Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 32(4), 254–259. <https://doi.org/10.4067/S0717-73482016000400007>
- Arseneau, J.-R., Steeves, R., & Laflamme, M. (2017). Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues. *Molecular Ecology Resources*, 17(4), 686–693. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12616>
- Asencios Solis, L., Acurio Usca, M., Quispe Torres, N., & Vásquez Campos, L. (2012). *Susceptibilidad a drogas de Mycobacterium tuberculosis mediante observación microscópica (MODS)*. Instituto Nacional de Salud. <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/1118>
- Asencios Solis, L., Galarza, M., Quispe, N., Vásquez, L., Leo, E., Valencia, E., Ramírez, J., Acurio, M., Salazar, R., Mendoza-Ticona, A., & Cáceres, O. (2012). Prueba molecular genotype® MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. *Revista*



- Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2012.291.314>
- Asencios Solis, L., Sloutsky, A., & Stowel, M. (2012). *Método de nitrato-reductasa (GRIESS) para la detección rápida de la susceptibilidad a isoniacida y rifampicina*. Instituto Nacional de Salud.  
<https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/1117>
- Bazzichi, A., Guidi, F. V., Rindi, L., Incaprera, M., & Garzelli, C. (1998). PCR ELISA for the quantitative detection of Epstein-Barr virus genome. *Journal of Virological Methods*, 74(1), 15–20.  
[https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00060-3](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00060-3)
- Boehme, C. C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M. P., Shenai, S., Krapp, F., Allen, J., Tahirli, R., Blakemore, R., Rustomjee, R., Milovic, A., Jones, M., O'Brien, S. M., Persing, D. H., Ruesch-Gerdes, S., Gotuzzo, E., Rodrigues, C., Alland, D., & Perkins, M. D. (2010). Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *The New England Journal of Medicine*, 363(11), 1005–1015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907847>
- Campo-Arias, A., & Herazo, E. (2010). Concordancia intra- e interevaluadores. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 39(2), 424–432. [https://doi.org/10.1016/S0034-7450\(14\)60261-4](https://doi.org/10.1016/S0034-7450(14)60261-4)
- Canetti, G., Rist, N., & Grosset, J. (1963). [Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation]. *Revue De Tuberculose Et De Pneumologie*, 27, 217–272.
- Caviedes, L., & Moore, D. a. J. (2007). Introducing MODS: A low-cost, low-tech tool for high-performance detection of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 25(2), 87–88. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.32711>
- Comas, I., & Gil, A. (2016). Secuenciación masiva para el diagnóstico y la epidemiología de tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34, 32–39. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(16\)30217-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(16)30217-8)

- Cormican, M. G., Barry, T., Gannon, F., & Flynn, J. (1992). Use of polymerase chain reaction for early identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive cultures. *Journal of Clinical Pathology*, *45*(7), 601–604. <https://doi.org/10.1136/jcp.45.7.601>
- Coutlée, F., Bobo, L., Mayur, K., Yolken, R. H., & Viscidi, R. P. (1989). Immunodetection of DNA with biotinylated RNA probes: A study of reactivity of a monoclonal antibody to DNA-RNA hybrids. *Analytical Biochemistry*, *181*(1), 96–105. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90399-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90399-0)
- Cuevas-Córdoba, B., & Zenteno-Cuevas, R. (2010). [Drug resistant tuberculosis: Molecular mechanisms and diagnostic methods]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *28*(9), 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.12.005>
- Di Pinto, A., Terio, V., Di Pinto, P., Colao, V., & Tantillo, G. (2012). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *Letters in Applied Microbiology*, *54*(6), 494–498. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03231.x>
- Dorransoro, I., & Torroba, L. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, *30*, 67–85. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1137-66272007000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1137-66272007000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Fontalvo Rivera, D., & Gómez Camargo, D. (2015). Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Medicas UIS*, *28*(1), 39–51. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0121-03192015000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-03192015000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- García, L., Alonso-Sanz, M., Rebollo, M. J., Tercero, J. C., & Chaves, F. (2001). Mutations in the *rpoB* Gene of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Spain and Their Rapid Detection by PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(5), 1813–1818. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1813-1818.2001>

- Gill, P., Forouzandeh, M., Rahbarizadeh, F., Ramezani, R., & Rasaei, M. J. (2006). Production of anti-digoxigenin antibody HRP conjugate for PCR-ELISA DIG detection system. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 27(4), 303–318. <https://doi.org/10.1080/15321810600861910>
- Gómez-Tangarife, V. J., Gómez-Restrepo, A. J., Robledo-Restrepo, J., & Hernández-Sarmiento, J. M. (2018). Resistencia a Medicamentos en Mycobacterium tuberculosis: Contribución de mecanismos constitutivos y adquiridos. *Revista de Salud Pública*, 20, 491–497. <https://doi.org/10.15446/rsap.v20n4.50575>
- Helb, D., Jones, M., Story, E., Boehme, C., Wallace, E., Ho, K., Kop, J., Owens, M. R., Rodgers, R., Banada, P., Safi, H., Blakemore, R., Lan, N. T. N., Jones-López, E. C., Levi, M., Burday, M., Ayakaka, I., Mugerwa, R. D., McMillan, B., ... Alland, D. (2010). Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1), 229–237. <https://doi.org/10.1128/JCM.01463-09>
- Hillemann, D., Rüscher-Gerdes, S., & Richter, E. (2007). Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2635–2640. <https://doi.org/10.1128/JCM.00521-07>
- Instituto de Biotecnología. (2015). *Cuantificación de Oligonucleótidos y Ácidos Nucleicos por Espectroscopía de UV*. <http://oldwww.ibt.unam.mx/sintesis/cuantificacion.html>
- Jain, A., Tiwari, V., Guleria, R., & Verma, R. (2002). Qualitative Evaluation of Mycobacterial DNA Extraction Protocols for Polymerase Chain Reaction. *Mol Biol Today*, 3.
- Karimi, H., Oudghiri, A., En-nanei, L., Mzibri, M. E., Laglaoui, A., Chaoui, I., & Abid, M. (2020). Frequency of genomic mutations mediating resistance of Mycobacterium tuberculosis isolates to rifampicin in Northern Morocco. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 62, e37. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062037>

- Kobets, T., Badalová, J., Grekov, I., Havelková, H., Svobodová, M., & Lipoldová, M. (2010). Leishmania parasite detection and quantification using PCR-ELISA. *Nature Protocols*, 5(6), 1074–1080. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.68>
- Kuntz, I. D., Chen, K., Sharp, K. A., & Kollman, P. A. (1999). The maximal affinity of ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18), 9997–10002.
- Luk, J. M., Kongmuang, U., Tsang, R. S., & Lindberg, A. A. (1997). An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the rfbS gene from serogroup D salmonellae: A rapid screening prototype. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(3), 714–718. <https://doi.org/10.1128/JCM.35.3.714-718.1997>
- Masake, R. A., Njuguna, J. T., Brown, C. C., & Majiwa, P. a. O. (2002). The application of PCR-ELISA to the detection of Trypanosoma brucei and T. vivax infections in livestock. *Veterinary Parasitology*, 105(3), 179–189. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00020-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00020-1)
- Mendoza, A., & Gotuzzo, E. (2008). Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR): Historia y situación actual. *Acta Médica Peruana*, 25(4), 236–246. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1728-59172008000400011&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1728-59172008000400011&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Minas, K., McEwan, N. R., Newbold, C. J., & Scott, K. P. (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 325(2), 162–169. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02424.x>
- MINSA. (2006). *Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis*. <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/recursos/20171204133920.pdf>
- MINSA. (2013). *NORMA TÉCNICA DE SALUD PARA LA ATENCIÓN INTEGRAL DE LAS PERSONAS AFECTADAS POR TUBERCULOSIS*. <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/recursos/20180308083418.pdf>

- MINSA. (2018). *Resolución Ministerial N° 752-2018/MINSA*.  
<https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/186788-752-2018->
- MINSA. (2020). *Sistema de Información Gerencial de Tuberculosis* [MINSA - DPCTB :: Portal de Información]. <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/Dashboard.aspx>
- Morán, E., & Lazo, Y. (2001). Tuberculosis. *Revista Cubana de Estomatología*, 38(1), 33–51.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0034-75072001000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-75072001000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Muralidharan, K., & Zhang, W. (2003). Molecular detection of galactosemia mutations by PCR-ELISA. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 217, 111–118. <https://doi.org/10.1385/1-59259-330-5:111>
- Murillo-Godínez, G. (2009). Las gotitas de Flüggé. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, 47(3), 290  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2009/im093j.pdf>
- Ndhlovu, V., Mandala, W., Sloan, D., Kamdolozi, M., Caws, M., & Davies, G. (2018). Evaluation of the efficacy of two methods for direct extraction of DNA from Mycobacterium tuberculosis sputum. *Journal of Infection in Developing Countries*, 12(12), 1067–1072.  
<https://doi.org/10.3855/jidc.10592>
- OMS. (2008). *Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World*.  
[https://www.who.int/tb/publications/2008/drs\\_report4\\_26feb08.pdf](https://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf)
- OMS. (2018). *Tuberculosis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- OPS. (2017, March 23). *Tuberculosis: OPS/OMS: Llama a No Dejar a Nadie Atrás*. Pan American Health Organization / World Health Organization.  
[https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13081:tuberculosis-opsoms-llama-a-no-dejar-a-nadie-atras&Itemid=1926&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13081:tuberculosis-opsoms-llama-a-no-dejar-a-nadie-atras&Itemid=1926&lang=es)
- Ortega Alvelay, A., Osorio Pagola, M., Barrios Fuentes, P., & García Morales, S. (2010). La desnutrición y la tuberculosis: Dos flagelos del subdesarrollo. A propósito de un caso atendido en Timor Leste.

- MediSur*, 8(2), 64–70. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1727-897X2010000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1727-897X2010000200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: Historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química*, 24(2), 237–246. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)72468-6](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72468-6)
- Pfyffer, G. E., Palicova, F., & Rüscher-Gerdes, S. (2002). Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1670–1674. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.5.1670-1674.2002>
- Piffardi F., S., Luna H., A., Sakurada Z., A., & Lepe L., R. (2004). Evaluación comparativa del método automatizado BACTEC MGIT 960 con el método de las proporciones para determinar susceptibilidad a drogas antituberculosas en Chile. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 139–143. <https://doi.org/10.4067/S0717-73482004000300003>
- Poulsen, L., Sørensen, M. J., Snakenborg, D., Møller, L. B., & Dufva, M. (2008). Multi-stringency wash of partially hybridized 60-mer probes reveals that the stringency along the probe decreases with distance from the microarray surface. *Nucleic Acids Research*, 36(20), e132. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn600>
- Puppe, W., Weigl, J., Gröndahl, B., Knuf, M., Rockahr, S., von Bismarck, P., Aron, G., Niesters, H. G. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Schmitt, H.-J. (2013). Validation of a multiplex reverse transcriptase PCR ELISA for the detection of 19 respiratory tract pathogens. *Infection*, 41(1), 77–91. <https://doi.org/10.1007/s15010-012-0298-6>
- Rahmah, N., Ashikin, A. N., Anuar, A. K., Ariff, R. H., Abdullah, B., Chan, G. T., & Williams, S. A. (1998). PCR-ELISA for the detection of *Brugia malayi* infection using finger-prick blood. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(4), 404–406. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(98\)91066-5](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(98)91066-5)

- Ramirez, N., Cocotle, B., Méndez, A., & Arenas, J. (2002). *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*.  
[https://www.uv.mx/rm/num\\_anteriores/revmedica\\_vol2\\_num2/articulos/mycobaterium.html](https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol2_num2/articulos/mycobaterium.html)
- Riojas, M. A., McGough, K. J., Rider-Riojas, C. J., Rastogi, N., & Hazbón, M. H. (2018). Phylogenomic analysis of the species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex demonstrates that *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 324–332.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002507>
- Rose, K., Mason, J. O., & Lathe, R. (2002). Hybridization parameters revisited: Solutions containing SDS. *BioTechniques*, 33(1), 54–56, 58. <https://doi.org/10.2144/02331st01>
- Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.)* (Cold Spring Harbor).
- Senra, C., Gomes, L. I., Siqueira, L. M. V., Coelho, P. M. Z., Rabello, A., & Oliveira, E. (2018). Development of a laboratorial platform for diagnosis of schistosomiasis mansoni by PCR-ELISA. *BMC Research Notes*, 11(1), 455. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3571-7>
- Seo, D. J., Tahk, H., Lee, K. B., Lee, M. H., Son, N. R., Seo, S., Cheon, D.-S., Lee, B.-H., & Choi, C. (2012). Detecting hepatitis E virus with a reverse transcription polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay. *Food and Environmental Virology*, 4(1), 14–20.  
<https://doi.org/10.1007/s12560-011-9073-6>
- Servei Genòmica Bioinformàtica. (2016). *Qubit*. <https://sct.uab.cat/genomica-bioinformatica/es/content/qubit-0>
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), 503–517. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(75\)80083-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(75)80083-0)

- Sow, A., Sidibé, I., Desquesnes, M., Bengaly, Z., & Pangui, L. J. (2006). The application of PCR-ELISA to the detection of *Trypanosoma congolense* type savannah (TCS) in bovine blood samples. *Tropical Biomedicine*, 23(1), 123–129.
- Stop TB Partnership. (2019). *Line probe assays for drugresistant tuberculosis detection Interpretation and reporting guide for laboratory staff and clinicians*. [http://stoptb.org/wg/gli/TrainingPackage\\_XPERT\\_MTB\\_RIF\\_Ultra.asp](http://stoptb.org/wg/gli/TrainingPackage_XPERT_MTB_RIF_Ultra.asp)
- Sue, M. J., Yeap, S. K., Omar, A. R., & Tan, S. W. (2014). Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *BioMed Research International*, 2014, 653014. <https://doi.org/10.1155/2014/653014>
- Talkhabifard, M., Javid, N., Moradi, A., Ghaemi, A., & Tabarraei, A. (2017). Evaluation of a Probe-Based PCR-ELISA System for Simultaneous Semi Quantitative Detection and Genotyping of Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection in Clinical Specimens. *The Open Microbiology Journal*, 11, 83–91. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010083>
- Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M. J., Matter, L., Schopfer, K., & Bodmer, T. (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet (London, England)*, 341(8846), 647–650. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90417-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90417-f)
- Tortoli, E., Benedetti, M., Fontanelli, A., & Simonetti, M. T. (2002). Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: Comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 607–610. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.607-610.2002>
- Turco, J., & Byrd, M. (2001). An Interdisciplinary Perspective: Infectious Diseases & History. *The American Biology Teacher*, 63(5), 325–335. <https://doi.org/10.2307/4451119>
- Ugarte-Gil, C., Ponce Alvarez, M., & Moore, D. A. J. (2008). Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Médica Peruana*, 25(3), 171–175.



- [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1728-59172008000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1728-59172008000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Vásquez, A. (2018). *ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA PCR-ELISA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE M. tuberculosis MULTIDROGORESISTENTE*. Universidad Nacional Federico Villarreal.
- Vigo, A., Solari, L., Santos, D., & Puyén, Z. M. (2019). Mutaciones que confieren resistencia a fármacos antituberculosis de primera línea en Perú: Una revisión sistemática de la literatura. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 36(4), 636–645. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.364.4722>
- WHO. (2021). *WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: Diagnosis - Rapid diagnostics for tuberculosis detection*. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240030589>
- World Health Organization. (2016). *The Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Policy Guidance*. World Health Organization. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK384520/>
- World Health Organization. (2020). *Global tuberculosis report*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
- Yam, W. C., Tam, C. M., Leung, C. C., Tong, H. L., Chan, K. H., Leung, E. T. Y., Wong, K. C., Yew, W. W., Seto, W. H., Yuen, K. Y., & Ho, P. L. (2004). Direct Detection of Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Specimens by PCR-DNA Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4438–4443. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4438-4443.2004>
- Zaw, M. T., Emran, N. A., & Lin, Z. (2018). Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Infection and Public Health*, 11(5), 605–610. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.005>
- Zhang, Y., & Yew, W.-W. (2015). Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: Update 2015. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the*

*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 19(11), 1276–1289.

<https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0389>

Zhou, Y.-C., He, S.-M., Wen, Z.-L., Zhao, J.-W., Song, Y.-Z., Zhang, Y., & Zhang, S.-L. (2020). A Rapid and Accurate Detection Approach for Multidrug-Resistant Tuberculosis Based on PCR-ELISA Microplate Hybridization Assay. *Laboratory Medicine*, 51(6), 606–613.  
<https://doi.org/10.1093/labmed/lmaa016>

## IX. ANEXOS

### Anexo A

#### ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico.
<b>Anti-TB</b>	Anti - tuberculosis
<b>APP</b>	Agar Plate Proportions (Proporciones en Agar en Placa).
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico.
<b>ARNr</b>	Ácido Ribonucleico ribosomal
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection (Colección de cepas referenciales a nivel mundial).
<b>BAAR</b>	Bacilo Ácido-Alcohol Resistente.
<b>BK</b>	Baciloscopia.
<b>°C</b>	Grados Celsius.
<b>CBS</b>	Cabina de bioseguridad.
<b>CTAB</b>	Cetyl Trimethylammonium Bromide (Bromuro de Cetiltrimetilamonio).
<b>dNTP's</b>	Deoxynucleotide Triphosphates (Desoxinucleótido Trifosfato).
<b>DO</b>	Densidad Óptica.
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas).
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>HCL</b>	Ácido clorhídrico
<b>INH</b>	Isoniacida.
<b>INS</b>	Instituto Nacional de Salud.
<b>L</b>	Litro.

<b>LPA</b>	Line probe assay (Ensayo de sonda en línea)
<b>LRNM</b>	Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias.
<b>LJ</b>	Löwenstein-Jensen.
<b>Mg</b>	Miligramo.
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio.
<b>MI</b>	Mililitro.
<b>mM</b>	Mili molar.
<b>MODS</b>	Microscopic Observation Drug Susceptibility (Susceptibilidad a drogas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante observación microscópica).
<b>MGIT</b>	Mycobacteria Growth Indicator Tube
<b>MNTB</b>	Micobacterias No tuberculosis
<b>MTB</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MR</b>	Muestra resistente aquella que posee mutación en el gen rpoB
<b>MS</b>	Muestra sensible no posee mutación en el gen rpoB
<b>Ng</b>	Nanogramo.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).
<b>pb</b>	Pares de bases.
<b>pg</b>	Picogramos.
<b>Pmol</b>	Picomol.
<b>POD</b>	Peroxidasa.
<b>PS</b>	Prueba de sensibilidad

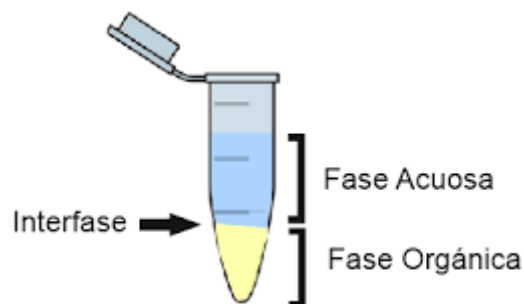
<b>RAM</b>	Resistencia Antimicrobiana
<b>RIF</b>	Rifampicina.
<b>RRDR</b>	Región Determinante de la Resistencia a Rifampicina
<b>Seg.</b>	Segundos.
<b>SR</b>	Sonda resistente que detecta la mutación en el <i>gen rpoB</i> que confiere resistencia a RIF.
<b>SS</b>	Sonda sensible que reconoce la secuencia de H37Rv no mutada
<b>SSPE</b>	Solución Salina Fosfato EDTA.
<b>T°</b>	Temperatura.
<b>TAE</b>	Tris, Acetato y EDTA.
<b>TB</b>	Tuberculosis.
<b>TB-MDR</b>	Tuberculosis Multidrogorresistente.
<b>TB-XDR</b>	Tuberculosis extensamente-resistente.
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>Tm</b>	Temperatura de melting.
<b>UFC</b>	Unidad Formadora de Colonias.
<b>µg</b>	Microgramo.
<b>µL</b>	Microlitro.
<b>Mm</b>	Micromolar.
<b>U</b>	Unidades.
<b>UV</b>	Ultraviolet light (Luz Ultravioleta).

## Anexo B

### Protocolo de extracción de ADN por Método CTAB y Lisozima

Realizar los procedimientos en una cabina de Bioseguridad clase II (*LABCONCO*).

- 1) Concentrar las bacterias por centrifugación durante 15 min. Utilizando una microcentrifuga marca Eppendorf a 12000 RPM o retiras el sobrenadante si te dan la cepa resuspendida en H<sub>2</sub>O MiliQ)
- 2) Resuspender el sedimento en 300  $\mu$ L de Buffer TE 1X (Invitrogen).
- 3) Dentro de la cabina a los tubos se le adiciona 40  $\mu$ L de lisozima (20 mg/mL), Vortexear e incubar por mínimo 2 hrs. a 37°C o dejar toda la noche (aprox. 18hrs.) en baño maría (usando Thermoblock). Este procedimiento destruye la pared celular de *M. tuberculosis*.
- 4) Adicionar a cada tubo 70  $\mu$ L SDS y 10  $\mu$ L de Proteinasa K (10 mg/mL) por cada muestra y Vortexear e incubar en baño maría a 65°C por 40 min. Esto ayudara a que se perfore y se rompa más la pared celular.
- 5) Adicionar 100  $\mu$ L NaCl 5M (esto aumentara la concentración de sales)
- 6) Adicionar 100  $\mu$ L de solución CTAB/NaCl (previamente calentado a 65°C). Vortexear hasta que el líquido se haga de color blanco lechoso, luego incubar por 10min. a 65°C. (CTAB/NaCl ayudara a precipitar glúcidos y proteínas).
- 7) Adicionar 750  $\mu$ L (Cloroformo/ alcohol isoamílico) en una proporción de 24:1, recuerda que tanto el cloroformo y el OH isoamílico se encarga de precipitar lípidos.
  - a. Vortexear y luego centrifugar a 14000 RPM por 5 minutos.
  - b. Nota: Calcular según la cantidad de Mx el volumen que debes preparar
  - c. Este paso consta de 3 fases:



8) Transferir toda la fase superior o acuosa (que contiene el ADN) a un tubo de 1.5 ml estéril cuidando de no arrastrar la interfase.

9) Cuidadosamente adicionar 500  $\mu$ L de Isopropanol, 2 propanol o Alcohol Isopropílico (mantener en frío a  $-20^{\circ}\text{C}$  para usarlo), este sirve para precipitar los ácidos nucleicos. Mezclar cuidadosamente y lentamente por inversión más 20 veces.

10) Dejar 30min. a 1 hora como máximo a  $-20^{\circ}\text{C}$  o dejar toda la noche y luego continuar al día siguiente.

11) Centrifugar por 15 minutos a 14000 RPM a temperatura ambiente (mirar el tamaño del precipitado para estimar la cantidad de buffer TE 1X, en el cual el ADN puede ser disuelto en el paso 14.

12) Eliminar el sobrenadante cuidadosamente evitando llevarse el pelle, adicionar 1ml de Etanol 70% helado y mezclar por inversión 20 veces hasta que el pellet se desprenda de la pared del tubo. **No demores en lograr desprenderlo.**

13) Centrifugar por 5min. a 14000 RPM. Descartar el sobrenadante vertiéndolo al caño, luego sacar cada tubo en un papel toalla boca abajo y los dejás destapados para eliminar el resto de alcohol o sino en la incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  destapados por 10min. los dejás secar. Nota: dale golpecitos al tubo cerrado para verificar si aún hay gotas de Etanol.

14) Redisolver el pellet en 300ul de buffer TE a 1X “no demores tanto puede secarse tu ADN”. Guardar a 4°C, si el ADN no se utiliza en los siguientes 30 días guardar a -20°C.

15) Cuantificar la concentración de ADN por espectrofotometría usando *NanoDrop 8000*.

16) Para estimar la concentración y la integridad del ADN, correr una electroforesis horizontal en el gel de agarosa al 1 % junto con un marcador de peso molecular.

Nota: Mínimo 250 µL de Buffer TE, máximo 500 µL de Buffer TE

### Preparación de soluciones para Extracción de ADN por el método de CTAB y Lisozima

- **Solución de Lisozima (20mg/mL)**

20mg de lisozima

1 mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q

Almacenar a -20°C

- **Proteínasa K**

10mg de Proteínasa K

1 mL de H<sub>2</sub>O mili-Q

Almacenar a -20°C

- **Solución de CTAB/NaCl**

4,1 gr de NaCl

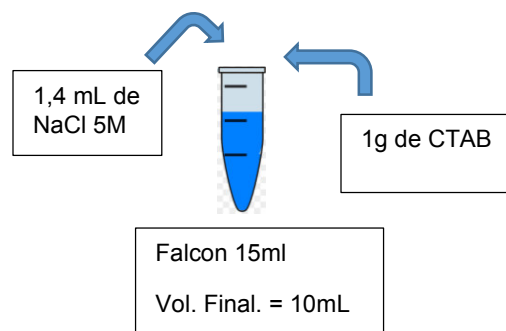
10g de CTAB

Disolver la sal y luego agregar el detergente, si es necesario calentar la solución a 65°C. Ajustar el volumen a 100 mL con agua Mili-Q, almacenar a temperatura ambiente por no más de 6 meses.

10g ----- 100mL --→10%

1g ----- 10mL →10%

Si preparas para un volumen de 10mL:





$$M = 0,41 / 58,44 \times 0,01 = 0,7M$$

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

$$5M \cdot X = 0,7 \cdot 10mL$$

$$X = 1,4 mL$$

- **Cloroformo / Alcohol Isoamílico (24:1)**

$$2,4 mL \text{ cloroformo} \diamond 7,2 mL \diamond 100 \mu L$$

$$0,1mL \text{ alcohol Isoamílico} \diamond 100 \mu L$$

- **SDS al 10%**

1g de SDS

Agua Mili-Q 10mL

Disolver calentando a 65°C en baño maría por 20min. (este procedimiento debe realizarse con mascarilla).

$$M = \frac{4,1gr}{58,44 gr \times 0,1L}$$

$$M = \frac{4,1gr}{5,844 gr/L} = 0,7M$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$5M \cdot X = 0,7M \times 100ml$$

$$X = 14 mL$$

- **Cloruro de Sodio 5M**

29,2gr de NaCl

Agua Mili-Q (100mL)

Autoclavar. Almacenar a Temperatura ambiente por no más de 1 año

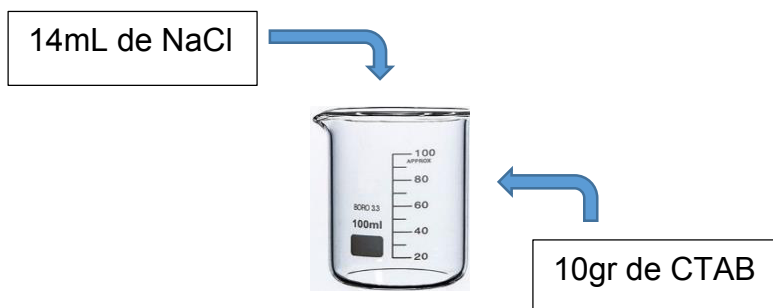
- **10X Buffer TE (Tris/HCl 100mM, EDTA 10mM, pH 8)**

Mezclar 10mL Tris HCl 1M pH 8 y 2mL con agua mili-Q, autoclavar y guardar a 4°C

- **1X TE Buffer**

Disolver 10ml Buffer 10X y enazar hasta 100mL con H2O Mili-Q

Autoclavar y guardar a 4°C



### Anexo C

#### Cuantificación por Fluorometría mediante Qubit 2.0

El Qubit mide la concentración de ADN mediante el método de Fluorometría; el cual consiste de usar un buffer alta sensibilidad (HS), para ADN doble hebra y de un fluoróforo.

1) Ambos reactivos se deben homogenizar en un tubo eppendorf de 1.5mL por vortex hasta que se observe de forma transparente.

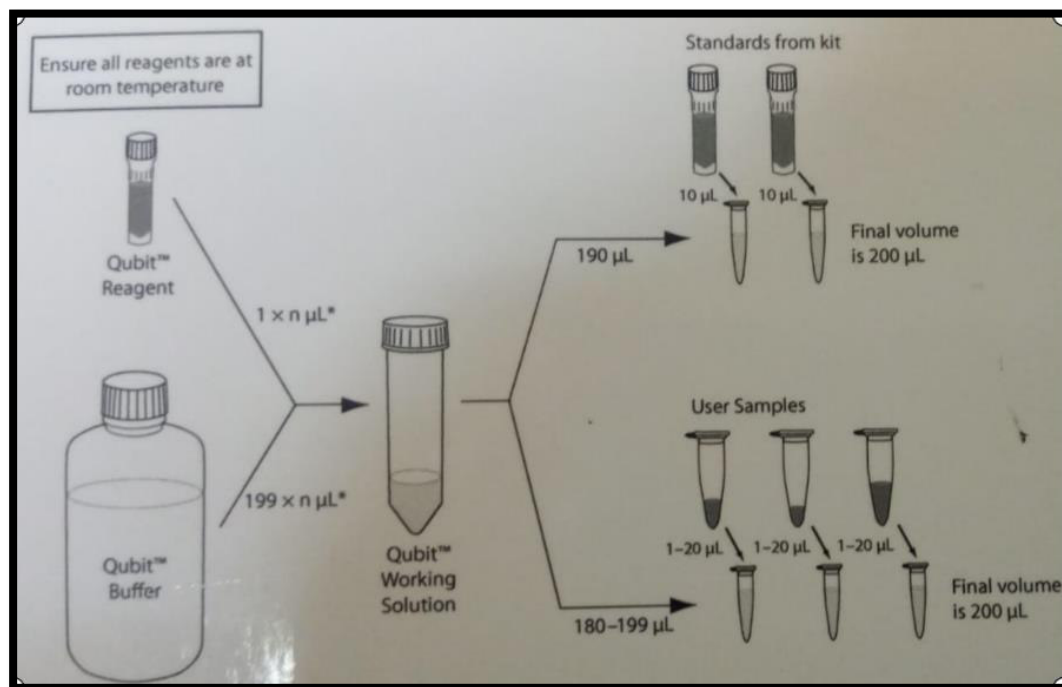
2) Posteriormente, el homogenizado se debe repartir en 198  $\mu$ L para "N" tubos de 0.5mL según sea la cantidad de muestras a analizar.

3) Para el análisis se usó 2  $\mu$ L del ADN extraído junto al mix de cuantificación de 198  $\mu$ L, cada tubo se homogenizo por vortex y spin, dejándose en reposo por 1 minuto. Tal como se observa en la figura 34.

4) Finalmente, se procedió a colocar cada tubo para su lectura al equipo.

**Figura 34.**

*Preparación del Mix de cuantificación de ADN y productos de PCR*



## Anexo D

### Purificación de productos de PCR mediante el Kit PureLink

Volumen Final por tubo = 15  $\mu$ L de producto de PCR

Procedimiento:

- 1) Adicione 4 volúmenes de Binding Buffer B2 de Kit PureLink con Isopropanol para 1 volumen de producto de PCR (50 – 100  $\mu$ L) en el mismo tubo de PCR 0,2 mL. Mezclar (Vortex y Spin).
- 2) Remueva la Spin Column PureLink de la bolsa y colóquelo en el tubo colector.
- 3) Adicione la mezcla (paso 1) para la columna sin tocar la base de la columna y las paredes del tip.
- 4) Centrifugue la columna a temperatura ambiente a 10000g (RCF) por 1 minuto.
- 5) Descarte el flujo del tubo colector y coloque la columna nuevamente en el tubo colector

#### Proceda al paso de lavado del DNA (Washing DNA)

- 1) Adicione 650  $\mu$ L de Wash Buffer con etanol en la columna.
- 2) Centrifugue la columna a Temperatura ambiente a 10 000g por 1 min. descarte el flujo de contenido dentro del tubo colector, y luego vuelva a colocar la columna.
- 3) Centrifugue la columna a la máxima velocidad de la centrifuga 14000g a temperatura ambiente por 3 min para eliminar algún residuo del Washing Buffer, y descartar el tubo colector.

**Proceda al paso de Eluting DNA**

- 1) Coloque la columna en un tubo limpio 1.7 mL suministrado por el Kit Purelink.
- 2) Adicione 50  $\mu$ L de Elution Buffer (10mM Tris HCl pH 8,5) para el centro de la columna sin chocar las paredes con el tip.
- 3) Incubar la columna a temperatura ambiente por 1 minuto.
- 4) Centrifugue la columna a la máxima velocidad de 14000g de la centrifuga por 2 min.
- 5) El eluido contenido en el tubo tiene el producto purificado. Remueva y descarte la columna. Lo Recobrado del eluido es  $\sim$ 48  $\mu$ L. Descarte la columna. Puede guardarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$  el producto purificado sino lo usara ese mismo día.

**Anexo E**  
**PROTOCOLO PARA LA REACCIÓN DE SECUENCIAMIENTO**

1. Preparar la siguiente reacción en un tubo de microcentrífuga de 0.2 mL

<b>Mix de Secuenciamiento</b>	<b>1 tubo</b>
Buffer 5X de Secuenciamiento	2 $\mu$ L
Big Dye	2 $\mu$ L
Primer 2.5 $\mu$ M	1 $\mu$ L

2. Repartir 5  $\mu$ L del mix de Secuenciamiento en tubos de PCR.
3. Añadir 3  $\mu$ L del producto de amplificación purificado (concentración final 15 - 20 ng). Completar a un volumen final de 10  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O libre de ARNasas.
4. Colocar los tubos de PCR en el Termociclador y correr el siguiente programa de Secuenciamiento:

	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
<b>Denaturación Inicial:</b>	96 °C	1 minutos	1 ciclo
<b>Denaturación:</b>	96 °C	10 segundos	
<b>Temp. de Hibridación:</b>	60 °C	45 segundos	35 ciclos
<b>Extensión:</b>	68 °C	4 minutos	
<b>Refrigeración a:</b>	4 °C		$\infty$

## Anexo F

### Protocolo Dye Ex 2.0 Spin Kit para Purificación de Productos de Reacción de Secuenciamiento

Este protocolo es adecuado para reacciones de Secuenciamiento de 10 – 20  $\mu$ L Centrifugar sobre 750 g (15°-25°C)

1. Gentilmente Vortexear la columna para resuspender la Resina.
2. Quite la tapa debajo de la columna y gire  $\frac{1}{4}$  de la tapa superior de la columna.
3. Lleve la columna a un tubo colector de 2mL provisto por el Kit.
4. Centrifugue por 3 minutos a 750 g y deje abierto ligeramente la tapa.
5. Con cuidado transfiera la columna a un tubo limpio de 1.5 mL. Aplique despacio la reacción de Secuenciamiento directamente al centro sin tocar la base de la columna.
6. Centrifugue por 3 minutos a 750 g. Remover la columna del tubo de 1.5 mL. El eluido contenido tiene el producto purificado de la reacción de Secuenciamiento.
7. Las muestras se colocaron en el Centrivap por 10 minutos para concentrarlas y evaporarlas posteriormente se añade 10  $\mu$ L de Formamida. Guardar las muestras a 4° C.
8. Transferir la Formamida (que contiene los productos purificados de la reacción de Secuenciamiento) a las placas de PCR.
9. Denaturar a 95°C por 5 minutos en el termobloque para calentar los tubos para luego realizar un shock térmico, al colocar los tubos en frio por 5 minutos.
10. Colocar en el Analizador Genético marca Applied Biosystems modelo 3500 XL, para realizar la Electroforesis por Capilaridad (Sanger).

## **Anexo G**

### **PROTOCOLO de ELISA**

1. Recubrir cada pocillo de una placa de ELISA de fondo plano con 100  $\mu$ L de (Estreptavidina de 10  $\mu$ g /mL de concentración disuelta en Buffer Carbonato pH 9.6 **Adicionar esa mezcla a los pocillos.**
2. Tapar la placa con papel aluminio y dejar incubar toda la noche a 4°C, para la impregnación.
3. Cada sonda biotinilada será inmovilizada en estreptavidina mediante una incubación por 45 minutos a 37°C en PBS. **Recordar que previamente se debe precalentar el Buffer PBS, pH 7.2**
4. Se utilizarán 3 pocillos para cada muestra amplificada por PCR, un pocillo para cada sonda de captura resistente: **H445D, H445Y y S450L**, en el sistema PCR-ELISA.
5. Luego lavar la placa 3 veces con Buffer de lavado (PBS-Tween-20 pH 7.2). Añadir 200  $\mu$ L del Buffer a cada pocillo de la placa de ELISA.
6. Paralelamente en un tubo de PCR estéril de 0.2mL, denaturar un volumen de Producto de PCR puro que este en una concentración de 4ng.
7. En un nuevo tubo de microcentrífuga de 1mL, incorporar 100  $\mu$ L (proveniente del Buffer de hibridación (SSPE 3X) y un volumen de Producto de PCR con una concentración a 4ng denaturado), homogenizar y transferir todo el volumen a cada pocillo de la placa. Previamente, precalentar 30 minutos el volumen a utilizar de Buffer de hibridación SSPE 3X.
8. Incubar la placa de ELISA por 1 hora a 50°C, en agitación constante.
9. Lavar la placa 3 veces con 200  $\mu$ L Buffer de lavado (PBS- Tween-20).

10. Añadir a cada pocillo 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo antidigoxigenina conjugado con peroxidasa, diluido (1:1000). Tapar la placa con papel aluminio.
11. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, en agitación constante.
  - a. Lavar la placa 2 veces con PBS-T y 1 vez con PBS solo, añadiendo 200  $\mu\text{L}$  del buffer en cada pocillo de la placa de ELISA.
12. Añadir a cada pocillo 100  $\mu\text{L}$  de la solución de sustrato Tetrametilbenzidina (TMB). Tapar la placa con papel aluminio. **Recordar retirar de la refrigeración el TMB, 30 min, antes de usar.**
13. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad.
14. Detener la reacción añadiendo a cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 0.5 M y medir la densidad óptica (OD) a 450nm en un lector de ELISA.

### Preparación de soluciones

#### Preparación de Estreptavidina

Pesa 1mg de la estreptavidina y resuspender en 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  Mili-Q. Luego en un nuevo tubo 1.5mL; estéril agregar 990  $\mu\text{L}$  de Buffer Carbonato y 10  $\mu\text{L}$  de la solución resuspendida de estreptavidina (concentración final 10  $\mu\text{g}$  / mL). Almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$

Cálculos:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

$$\frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \cdot V_i = 10 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 1000 \mu\text{L}$$

$$\frac{1 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \cdot \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \cdot V_i = 10 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \cdot 1000 \mu\text{L}$$

$$V_i = 10 \mu\text{L}$$



Entonces:

10  $\mu\text{L}$ : de la solución resuspendida de estreptavidina de 1 mg/mL

990  $\mu\text{L}$ : de Buffer Carbonato pH 9.6

### Buffer Carbonato 115 mM a pH 9.6

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 31 mM

$$W(g) = PM \times V \times Mol$$

PM = 105.9 g/mol

$$W(g) = 105.9 \times 0.5 \times 0.31$$

V = 0.5 L

$$W(g) = 16.41 \text{ g}$$

$\text{NaHCO}_3$  a 84 mM

$$W(g) = PM \times V \times Mol$$

PM = 84 mM

$$W(g) = 84 \times 0.5 \times 0.84$$

V = 0.5 L

$$W(g) = 35.28 \text{ g}$$

Entonces:

Se pesará 16.41 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 35.28g  $\text{NaHCO}_3$  para un volumen de 500 ml en agua Mili-

Q. Ajustar el pH con NaOH.

### Solución de PBS a pH 7.2

10 mM  $\text{N}_2\text{HPO}_4$

$$W(g) = PM \times V \times Mol$$

PM: 142 g/mol

$$W(g) = 142 \times 0.5 \times 0.1$$

Volumen: 0.5 L

$$W = 7.1 \text{ g}$$

**NaCl 136 mM:**

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$5M \times V_i = 1.36M \times 500 \text{ ml}$$

$$V_i = 136 \text{ ml}$$

**$\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 1.8 mM**

$$W(g) = 136.1 \times 0.5 \times 0.018$$

PM = 136.1

$$w(g) = 1.22 \text{ g}$$

V = 0.5 L

M = 0.018M

**KCl a 2.7 mM**

PM = 74.5

V = 0.5 L

M = 0.027 M

$$W(g) = 74.5 \times 0.5 \times 0.027$$

$$W(g) = 1g$$

Entonces:

136 mL de **NaCl 5M**, 7.1 gr de **N<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**, 1g de KCl a **2.7 mM** y 1.2g de **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** a **1.8 mM**.

Completar el volumen hasta 500 mL con H<sub>2</sub>O Mili-Q. Ajustar a pH 7.2

### Solución PBS-T

Se prepara según la receta de PBS a pH 7.2 con Tween 20 al 0.05%

#### Tween 20:

$$C_i.V_i = C_f.V_f$$

$$100\% .V_i = 0.05\% .500mL$$

$$V_i = 0.25ml = 250\mu L$$

### Preparación de las sondas

Sonda	Secuencia 5' to 3'	Agregar x uL para 100uM
rif 516-S	GCCAATTCATGGACCAGAACAACC	80 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O Mili-Q
rif 526-S	GTTGACCCACAAGCGCCG	111 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O Mili-Q
rif 531-533	GACTGTCGGCGCTGGGG	118 $\mu$ L de H <sub>2</sub> O Mili-Q

Según el cuadro anterior el stock de las sondas está a 100  $\mu$ M.

**Luego se hace una dilución para llevar las sondas a una concentración de 10  $\mu$ M.**

**Cálculos:**

$$1\mu M = 1 \frac{pmol}{\mu L}$$

$$1\mu M \cdot Vi = 100 \frac{pmol}{mL} \cdot 1000\mu L$$

$$1 \frac{pmol}{\mu L} \cdot \frac{1000\mu L}{1mL} \cdot Vi = 100 \frac{pmol}{1mL} \cdot 1000\mu L$$

$$1000 \cdot Vi = 100000$$

$$Vi = 100\mu L$$

Entonces:

**100  $\mu$ L: Sonda diluida a 100 pmol/mL**

**900  $\mu$ L: H<sub>2</sub>O Mili-Q**

**Buffer de SSPE 20X**

Disolver 17.53 gr de NaCl, 2.76 gr de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O y 0.74 gr de EDTA en 80 mL de H<sub>2</sub>O

Mili-Q. Ajustar a pH 7.4 (con la ayuda de NaOH a 10N). Esterilice por autoclave.

3X SSPE

$$20X \cdot Vi = 3X \cdot 100mL$$

$$Vi = 15 mL$$

Donde:

15 mL de la solución de 20X SSPE, 10 mL de solución de Denhardt 5X, 200  $\mu$ L de SDS al 0.02% y 75 mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q.

**Solución de DENHARDT 50X**

$$50X \cdot Vi = 5X \cdot 100mL$$

$$Vi = 10mL$$

**SDS al 0.02%**

$$10\% \cdot Vi = 0.02\% \cdot 100mL$$

$$Vi = 0.2mL = 200\mu L$$

**Buffer Peroxidasa**

Preparar el buffer peroxidasa que contiene 100mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, pH

7.4.

Cálculos:

100mM de Tris-HCl:

$$\begin{aligned}
 C_i . V_i &= C_f . V_f \\
 1M . V_i &= 0.1M . 10mL \\
 V_i &= 1mL \rightarrow 1000uL
 \end{aligned}$$

150mM de NaCl:

$$\begin{aligned}
 C_i . V_i &= C_f . V_f \\
 5M . V_i &= 0.15M . 10ml \\
 5M . V_i &= 1.5mL \\
 V_i &= 0.3mL \rightarrow 300uL
 \end{aligned}$$

Entonces:

1000  $\mu$ L de Tris-HCl, 300  $\mu$ L: de NaCl y 8.7ml: de H<sub>2</sub>O Mili-Q. Enrazar a 10 mL.

**Revisar el pH del Buffer peroxidasa antes de su uso.**

**Preparación de anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa:**

Luego realizar la disolución (1:1000) en Buffer Peroxidasa, pH 7.2

Entonces:

Disolución: 1/1000

5  $\mu$ L: del conjugado con peroxidasa.

4995  $\mu$ L: de Buffer Peroxidasa

**Preparación de Tetrametilbenzidina (TMB):**

El sustrato está listo para utilizar. Añadir 100  $\mu$ L de solución TMB por cada pocillo.

Antes de usar. Dejar a temperatura ambiente la solución de TMB durante 30 min.

Verificar que el TMB (single reaction) sea para ELISA. Descartar el excedente usados en el día de proceso.

**Ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1N (solución de Parada)**

Agregar a 6mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q, y luego añadir 266 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puro. Ajustar el volumen a 10 mL con H<sub>2</sub>O Mili-Q. Almacenar a temperatura ambiente y cubrir el tubo con papel aluminio.

**Cálculos:**

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

PM: 98.079 g/mol

Volumen: 1L

Entonces:

$98.079 \rightarrow 1 \text{ mol}$

$1840 \rightarrow x \text{ mol}$

$X = 18.76 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \rightarrow 18.76M$

Considerar que:

$1.84 \text{ g/cm}^3 = 1.84 \text{ g/mL}$

Por lo tanto:

$C_i . V_i = C_f . V_f$

$18.76M . V_i = 0.5M . 10mL$

$V_i = 266\mu\text{L}$