

Optimización de un método de preparación de ADN a partir de muestras de esputo para la detección por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de *Mycobacterium tuberculosis*

Armando Guevara¹, Emir Reyes¹, Jacobus de Waard² y María Araque^{1*}

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida 5101-A, Venezuela.

²Laboratorio de Tuberculosis. Instituto de Biomedicina. Caracas. Venezuela.

Recibido: 17-01-05 Aceptado: 15-03-06

Resumen

En este estudio optimizamos un procedimiento casero para la preparación y extracción del ADN de micobacterias en esputos para el diagnóstico por la RCP de la tuberculosis pulmonar. Inicialmente se utilizaron 14 esputos (BK+++) para evaluar la actividad fluidificante de 5 sustancias: N-acetil-L-cisteína (NALC) 30mM-Hidróxido de sodio (NaOH) al 4%, NALC 30 mM, NaOH al 4%, Cloruro de cetilpiridinium (CPC) del 1% al 3%-Cloruro de sodio (NaCl) al 2% e Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 4,5%. Las muestras fluidificadas se sometieron a la acción independiente de la lisozima o el tritón X-100 conjuntamente con estrés térmico. La extracción del ADN se confirmó mediante la detección de la secuencia de inserción IS6110 de *M. tuberculosis* por la RCP. De las sustancias fluidificantes probadas, el NaOCl al 4,5% produjo una fluidificación rápida del esputo. El tratamiento posterior de la muestra con lisozima y los cambios térmicos permitieron evidenciar la amplificación de la secuencia IS6110. El valor diagnóstico de esta optimización se evaluó en 30 esputos positivos para *M. tuberculosis* por baciloscopia y cultivo. Los resultados demostraron que en el 66,67% de las muestras se logró detectar la secuencia IS6110 y en el 33,33% de las muestras restantes con baja carga bacteriana (8, BK++ y 2, BK+), la secuencia IS6110 se detectó luego de diluir el ADN o agregar albúmina sérica bovina acetilada a la mezcla de amplificación. La metodología propuesta tiene una limitada sensibilidad, pero puede aumentarse diluyendo el ADN o adicionando sustancias que reviertan los inhibidores de la RCP. Este es el primer trabajo donde se utiliza el NaOCl al 4,5%, como sustancia fluidificante para la preparación de esputos que serán utilizados en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar mediante la RCP.

Palabras clave: Fluidificación; NaOCl; IS6110; *Mycobacterium tuberculosis*; RCP.

* Autor para la correspondencia. Fax: +58-274-2403568. E-mail: araquemc@ula.ve

Optimization of a method for preparation of DNA from sputum samples for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction (PCR)

Abstract

In this study we present an in-house method to optimize preparation and DNA extraction of mycobacteria in sputum samples to diagnose pulmonary tuberculosis using PCR. Initially, 14 positive sputum samples (BK +++) were utilized to evaluate the mucolytic capacity of 5 different substances: 30mM N-acetyl cysteine-4% NaOH, sodium hydroxide (NaOH), NALC 30 mM, cetilpiridinium chloride (1%, 2% and 3%)-2% NaCl and 4,5% sodium hypochlorite (NaOCl). Fluidified samples underwent lysozyme or triton X-100 treatment together with heat shock. The DNA extraction was confirmed by means of detection of the IS6110 gene sequence in *M. tuberculosis*. Of the 5 mucolytic substances tested, 4,5% NaOCl produced a fast fluidification of the sputum. The amplification of IS6110 on samples fluidified with 4,5% NaOCl and treated with lysozyme was observed by PCR assays. The diagnostic value of this method was evaluated on 30 Ziehl Neelsen-positive sputum samples and cultures. Results show that the IS6110 gene sequence was detected in 66.67% of the samples. On the remaining 33.33% of low bacterial load positive sputum samples (8, BK++ and 2, BK+), the IS6110 was detected after diluting the DNA or adding acetylated bovine serum albumin to the PCR mix. Our tests indicate that even when the IS6110 detection has a limited sensitivity, the latter can be greatly increased by means of diluting the DNA or by adding PCR enhancers. This is the first report where the 4,5% NaOCl has been used for preparation of DNA from sputum samples for detection of *M. tuberculosis* by PCR.

Key words: Fluidification; NaOCl; IS6110; *Mycobacterium tuberculosis*; PCR.

Introducción

El diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis se basa en la baciloscopia y la confirmación del agente causal por cultivo. Estos métodos, aunque ampliamente usados, tienen como desventaja una baja sensibilidad en el caso de la baciloscopia, y el arrojar resultados tardíos en el caso del cultivo y la identificación bioquímica (1, 2), por lo que es necesario la búsqueda de métodos que combinen la rapidez y la facilidad de la baciloscopia con la elevada sensibilidad y especificidad del cultivo. La amplificación de ácidos nucleicos a través de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) podría ser una alternativa para superar esta dificultad. La RCP ha demostrado ser un método muy eficiente para la identificación de *M. tuberculosis* cuando es aplicada a cultivos pu-

ros. No obstante, diferentes autores han demostrado que la RCP también es útil cuando se aplica sobre el ADN extraído de las muestras clínicas (3-6). Sin embargo, son pocos los investigadores que han diseñado procedimientos sencillos y relativamente económicos que permitan que esta metodología esté al alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos. El principal blanco de amplificación elegido para el diagnóstico de *M. tuberculosis* por la RCP es la secuencia de inserción IS6110 (7). Ésta es una secuencia genética repetitiva de 1.355 pb, presente habitualmente entre 1 a 25 copias en el genoma de los miembros del complejo *M. tuberculosis* (8). Con base a ello, en este trabajo se realizó la optimización de un método casero, sencillo y rápido, para la preparación y extracción del ADN de micobacterias en muestras de esputo, para el diagnóstico de la tu-

berculosis mediante la detección de la secuencia de inserción IS6110 aplicando la técnica de la RCP.

Materiales y Métodos

Primera fase

Optimización del procedimiento para la preparación y extracción de ADN de micobacterias en muestras de esputo.

a. Muestras clínicas: Se utilizaron un total de 14 muestras de esputo mucopurulentas de reciente emisión, con baciloscopia de tres cruces (BK+++), provenientes de pacientes sintomáticos respiratorios que acudieron al Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela en febrero de 2002. La baciloscopia se realizó por la técnica de Zielh Neelsen utilizando los criterios del Programa Nacional Integrado para el Control de la Tuberculosis (9).

b. Fluidificación de las muestras de esputo: Las sustancias fluidificadoras ensayadas correspondieron a las ya conocidas para la descontaminación y fluidificación de esputos como paso previo a la inoculación en medios de cultivo (10,11). Estas sustancias fueron: N-acetil-L-cisteína (NALC) 30 mM-Hidróxido de sodio (NaOH) al 4%, NALC 30 mM, NaOH al 4%, Cloruro de cetilpiridinium (CPC) al 1%-Cloruro de sodio (NaCl) al 2%, CPC al 2%-NaCl al 2% y CPC al 3%-NaCl al 2%. Adicionalmente, se incluyó el hipoclorito de sodio (NaOCl) al 4,5% (cloro de uso doméstico). Estas sustancias se mezclaron individualmente con las muestras de esputo en una proporción 1:1, dejándolas actuar durante 15 min en el caso de la NALC 30 mM-NaOH al 4%, NALC 30 mM y NaOH al 4%, 24 horas en el caso de CPC al 1%, 2% y 3%-NaCl al 2% (10,11) y 2 min para el NaOCl al 4,5%. Una vez transcurrido el tiempo establecido para la fluidificación, se agregó agua destilada estéril a cada mezcla hasta completar un volumen final de 50 mL. Luego se procedió a centrifugar la mezcla a 3.500 rpm por 30 m para concentrar las células. Las células y los

sedimentos se lavaron con agua destilada estéril en 3 oportunidades y se resuspendieron en 100 μ L de buffer TE (Tris-EDTA: 10mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8).

c. Extracción de ADN: Cada sedimento resuspendido en TE se dividió en dos alícuotas de 50 μ L, a una se le añadió 1 μ L de lisozima (20mg/mL) y a la otra 0,5 μ L de tritón X-100 al 1%, ambas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, estas alícuotas se sometieron a estrés térmico (80°C por 30 min, -70°C por 20 min y 80°C por 5 min) y se centrifugaron a 14.000 rpm por 2 min a temperatura ambiente, quedando el ADN bacteriano en el sobrenadante. Este se recolectó en un tubo eppendorf y se almacenó a -20°C hasta su uso.

d. Detección de la secuencia de inserción IS6110: Usando los cebadores INS1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3') e INS2 (5'-GCGTAGGCGTCGCGTGACAAA-3') (12), se amplificó un segmento de 245 pares de bases de la secuencia de inserción IS6110. A la mezcla de amplificación (dNTPs 200mM [5 μ L], INS1 5pmol/ μ L [5 μ L], INS2 5pmol/ μ L [5 μ L], MgCl₂ 25mM [5 μ L], 10X RCP buffer [5 μ L], Taq polimerasa 5 U/ μ L (Promega®) [0,25 μ L]) se le agregó en ensayos diferentes, 10, 5 y 2 μ L los extractos crudos de ADN o de ADN diluido en agua bidestilada estéril, en una proporción 1:20. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L. La amplificación se realizó en un termociclador (M.J Research, Inc., modelo PCT-100) bajo las siguientes condiciones: 94°C por 4 minutos, 65°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, en 30 ciclos, seguido de un ciclo de extensión a 72°C por 4 minutos. Como control positivo se utilizó 100 pg de ADN de *M. tuberculosis* y como negativo se usó la mezcla de amplificación sin ADN. El producto obtenido por la RCP se observó por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados con una cámara digital Mavica (Sony®).

Una vez concluida la fase de estandarización, se procedió a analizar los resultados

para evaluar cual fue la sustancia fluidificante que permitió obtener mediante la RCP, bandas visibles de la secuencia IS6110, independientemente de los volúmenes de ADN empleados, con la finalidad de ser seleccionada para la fase de validación.

Segunda fase

Validación del procedimiento de preparación y extracción de ADN de micobacterias en muestras de esputo.

En esta fase se utilizaron 30 muestras de esputos con baciloscopia positiva y cultivos positivos para *M. tuberculosis*, provenientes de pacientes sintomáticos respiratorios que acudieron al Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina Caracas, Venezuela, durante el período de julio a diciembre del 2001 (conservados a -70°C). La baciloscopia, el cultivo y la identificación bioquímica de las cepas se realizaron según los criterios del Programa Nacional Integrado para el Control de la Tuberculosis (9). Todos los esputos se fluidificaron con el agente fluidificante seleccionado en la primera fase. La extracción del ADN y la amplificación por la RCP de la secuencia IS6110, se realizó de acuerdo a los pasos llevados a cabo en la fase de optimización. El volumen de ADN utilizado en estas pruebas fue de 5 μL . En aquellos casos en donde la amplificación de la secuencia IS6110 resultó negativa, las muestras se sometieron a un nuevo ensayo de amplificación diluyendo el ADN en agua bidestilada estéril en una proporción 1:20, o a la mezcla para la RCP se le agregó 5 μL de albúmina sérica bovina acetilada (Promega[®]).

Resultados

Todas las sustancias fluidificantes probadas produjeron actividad fluidificante sobre los esputos, excepto el CPC al 1%-NaCl al 2%. Sin embargo, destaca el hecho que el NaOCl al 4,5% fluidificó las muestras de esputo en forma completa e instantánea, obteniéndose sedimentos que oscilaron entre 0,1 a 0,2 mL. Luego del proceso de fluidifica-

ción, cada una de las muestras fue sometida a la acción de la lisozima o el tritón X-100 al 1% y al estrés térmico, para luego realizar la detección de la secuencia de inserción IS6110 mediante la RCP. En ninguna de las muestras tratadas con tritón X-100 se detectó productos de amplificación. Por el contrario, en la mayoría de las muestras tratadas con lisozima fue posible detectar la secuencia IS6110. La amplificación fue eficiente al utilizar los extractos crudos de ADN sin diluir en las muestras fluidificadas con NaOCl al 4,5% (Figura 1A, canales 10-12) y NaOH al 4% (Figura 1A, canales 7-9), obteniéndose bandas claramente visibles de la secuencia IS6110, independientemente del volumen de ADN probado. En las muestras tratadas con NALC se obtuvieron bandas tenues, poco definidas (Figura 1A, canales 19-21), mientras que al usar NALC 30 mM-NaOH al 4%, sólo se observó una banda de amplificación al utilizar un volumen de 2 μL de ADN (Fig. 1A, canal 4). Por otra parte, no se observó amplificación de la secuencia IS6110 en las muestras fluidificadas con CPC al 1%, 2% y 3%-NaCl 2% (Figura 1A, canales 13-18).

En un segundo ensayo donde la RCP se llevó a cabo con ADN diluido, se observó la presencia de bandas de amplificación de la secuencia IS6110 de mayor intensidad en las muestras fluidificadas con NALC-NaOH al 2%, NaOH al 4% y NaOCl al 4,5% (Figura 1B, canales 4-12). Por el contrario, bandas de amplificación muy tenues fueron observadas al usar 10 y 5 μL de ADN provenientes de las muestras tratadas con NALC (Figura 1B, canales 20 y 21), y no hubo amplificación de la secuencia IS6110 en las muestras fluidificadas con CPC al 2% y 3%-NaCl 2% (Figura 1B, canales 13-18).

Para la validación del procedimiento descrito anteriormente, 30 esputos provenientes de pacientes sintomáticos respiratorios se clasificaron de acuerdo a sus características macroscópicas y a la interpretación de la baciloscopia (Tabla 1). Basados en los resultados obtenidos en la fase de opti-

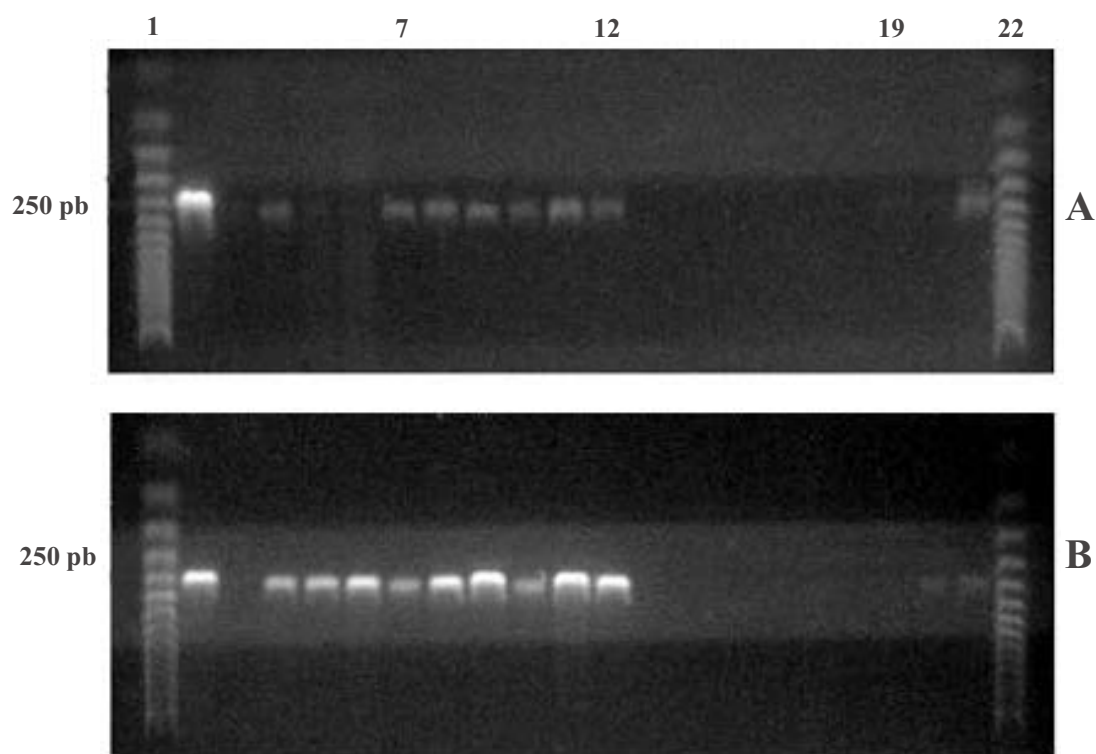


Figura 1. Electroforesis del producto amplificado por la RCP de la secuencia génica de inserción *IS6110* presente en el ADN extraído de las muestras de esputo fluidificadas con diferentes sustancias y tratadas con lisozima. ADN sin diluir (A) y ADN diluido (B) 1 y 22. Marcador de peso molecular [Ladder 50 bp (Promega®)]. 2. Control positivo. 3. Control negativo. 4, 5 y 6, fluidificación con NALC-NaOH al 4%, ADN en volúmenes de 2, 5 y 10 μ L, respectivamente. 7, 8 y 9, fluidificación con NaOH al 4%, ADN en volúmenes de 2, 5 y 10 μ L, respectivamente. 10, 11 y 12, fluidificación con NaOCl al 4,5%, ADN en volúmenes de 2, 5 y 10 μ L, respectivamente. 13, 14 y 15, fluidificación con CPC al 3%-NaCl al 2%, ADN en volúmenes de 2, 5 y 10 μ L, respectivamente. 16, 17 y 18, fluidificación con CPC al 2%-NaCl al 2%, ADN en volúmenes de 2, 5 y 10 μ L, respectivamente. 19, 20 y 21, fluidificación con NALC, ADN en volúmenes de 2, 5 y 10 μ L, respectivamente.

mización, el NaOCl al 4,5% fue seleccionado para esta etapa de validación como la mejor sustancia fluidificante, al producir un excelente efecto fluidificador en las muestras de esputo y por no interferir con la amplificación de la secuencia *IS6110*. En 20 de las 30 muestras procesadas (66,67%), se logró detectar la secuencia *IS6110*. Estas muestras correspondieron a ADNs sin diluir provenientes de 8 esputos con BK+++ , 8 con BK++ y 4 esputos con BK+ (Figura 2.A). Las 10 muestras restantes (4 con BK++ y 6 con BK+) en donde no se obtuvo amplificación,

fueron sometidas a un nuevo ensayo de la RCP, con el mismo volumen de ADN pero diluido. Sin embargo, sólo se logró obtener amplificación de la secuencia *IS6110* en 2 muestras, ambas con BK++ (Figura 2.B). El resto de las muestras (6 con BK+ y 2 con BK++) fueron nuevamente sometidas a otro ensayo de RCP, usando en esta oportunidad 5 μ L de ADN sin diluir y adicionando 5 μ L de albúmina sérica bovina acetilada. Con ello se logró obtener finalmente la amplificación de la secuencia de inserción *IS6110* en estas 8 muestras (Figura 2C).

Tabla 1
Características de las muestras de esputo seleccionadas para la fase de validación*

N° de muestra	Aspecto macroscópico	Baciloscopia
LT 730	Mucosa	+
LT789	Mucosa	+
LT 837	Mucosa	+
LT 840	Hemoptoica	+
LT 1013	Mucopurulenta	+
LT 1034	Mucopurulenta	+
LT 1042	Mucopurulenta	+
LT 1114	Mucosa	+
LT 1161	Mucosa	+
LT 1197	Mucopurulenta	+
LT52	Mucopurulenta	++
LT 302	Mucosa	++
LT 367	Hemoptoica	++
LT 597	Mucopurulenta	++
LT 957	Mucopurulenta	++
LT 943	Mucopurulenta	++
LT 982	Mucosa	++
LT 1113	Mucosa	++
LT 1157	Mucosa	++
LT 1179	Mucosa	++
LT 1217	Hemoptoica	++
LT 1296	Mucopurulenta	++
LT 145	Mucopurulenta	+++
LT 600	Mucopurulenta	+++
LT 763	Mucosa	+++
LT 782	Hemoptoica	+++
LT 798	Mucosa	+++
LT 851	Mucopurulenta	+++
LT 899	Mucopurulenta	+++
LT 1084	Hemoptoica	+++

*Interpretación realizada según la Normativa del Programa Nacional Integrado para el Control de la Tuberculosis, 1998 (9).

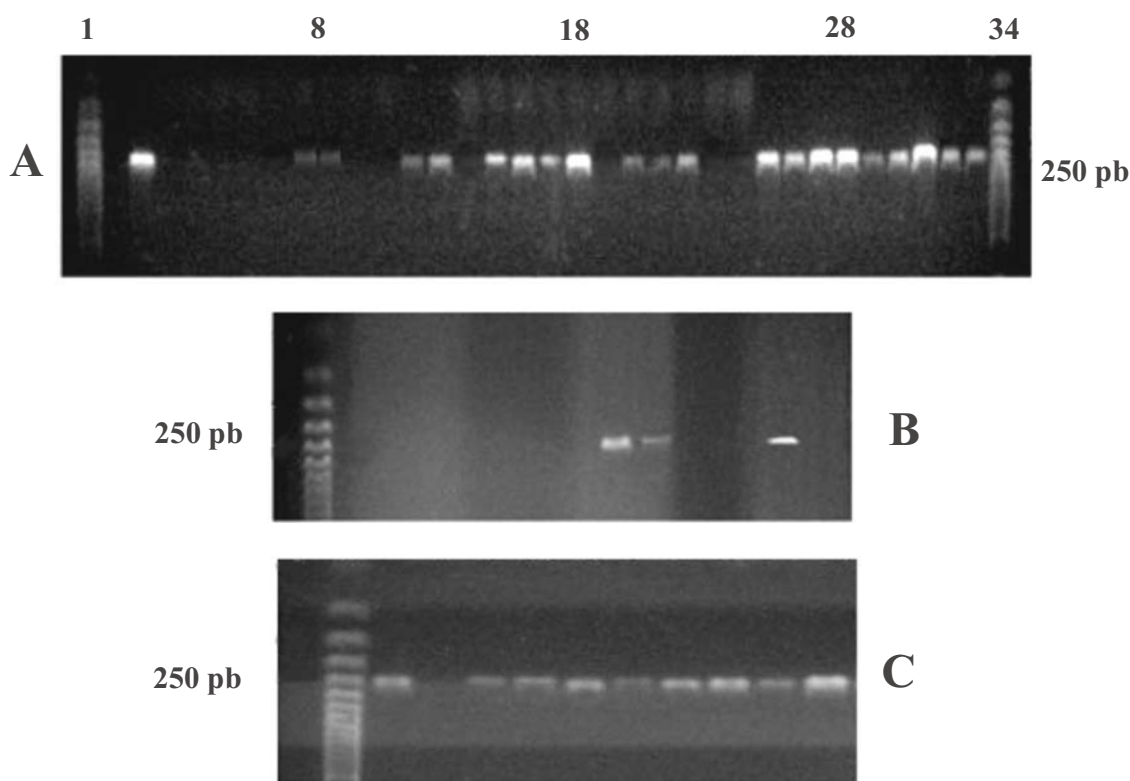


Figura 2. **A.** Electroforesis del producto amplificado por la RCP de la secuencia génica de inserción *IS6110* presente en el ADN extraído de las muestras de esputo fluidificadas con NaOCl al 4,5% y tratadas con lisozima. 1 y 34. Marcador de peso molecular [Ladder 50 bp (Promega®)] 2. Control positivo 3. Control negativo 4. LT730 (BK +) 5. LT789 (BK +) 6. LT837 (BK +) 7. LT840 (BK +) 8. LT1013 (BK +) 9. LT1034 (BK +) 10. LT1042 (BK +) 11. LT1114 (BK +) 12. LT1161 (BK +) 13. LT1197 (BK +) 14. LT52 (BK ++) 15. LT302 (BK ++) 16. LT367 (BK ++) 17. LT597 (BK ++) 18. LT957 (BK ++) 19. LT943 (BK ++) 20. LT982 (BK ++) 21. LT1113 (BK ++) 22. LT1157 (BK ++) 23. LT1179 (BK ++) 24. LT1217 (BK ++) 25. LT1296 (BK ++) 26. LT145 (BK +++) 27. LT600 (BK +++) 28. LT763 (BK +++) 29. LT782 (BK +++) 30. LT798 (BK +++) 31. LT851 (BK +++) 32. LT899 (BK +++) 33. LT1084 (BK +++)). **B.** Electroforesis de la amplificación por la RCP del *IS6110* a partir de ADN diluido 1:20 y con adición de albúmina sérica bovina acetilada (C) de las muestras que presentaron un resultado falso negativo en el ensayo inicial de RCP.

Discusión

Algunos investigadores afirman que la detección de *M. tuberculosis*, directamente de muestras clínicas mediante técnicas de amplificación de secuencias específicas de ADN, tiene especificidad y sensibilidad variable, debido a la diversidad de protocolos utilizados en la preparación previa de las muestras clínicas, en la extracción del ADN

y en los blancos de amplificación elegidos (3, 6, 7). En esta investigación, la preparación de las muestras de esputo para la extracción del ADN se inició al someter a las muestras a la acción individual de varias sustancias fluidificantes. En esta etapa se pudo observar que todas las sustancias ensayadas fueron eficientes como agentes fluidificantes, excepto el CPC al 1%-NaCl al 2%. Sin embargo, el NaOCl al 4,5% resultó ser la sus-

tancia que produjo mejor fluidificación, ya que al colocarla en contacto con las muestras clínicas mucopurulentas se observó la fluidificación inmediata de las mismas. El NaOCl al 4,5% se le conoce más por sus efectos desinfectantes que por sus usos en el laboratorio de microbiología, aunque algunos autores refieren la utilidad del NaOCl al 4,5% como fluidificante para la preparación de frotis a partir de esputos (13, 14).

Posterior a la fluidificación y concentración celular, se procedió a dividir las muestras en dos alícuotas y someter a cada una de ellas a la acción de la lisozima o el tritón X-100, conjuntamente con estrés térmico para la liberación del ADN micobacteriano, al realizar la RCP para la detección de la secuencia de inserción IS6110, no se observaron bandas de amplificación en el grupo de muestras fluidificadas y tratadas con tritón X-100. Es probable que el tritón X-100, por ser un detergente no iónico que se une principalmente a los sitios hidrofóbicos de las proteínas, actuó con poca acción sobre la pared celular de las micobacterias que está compuesta principalmente por lípidos (15). Por el contrario, al realizar los ensayos con las muestras fluidificadas con NaOH al 4%, NALC 30 mM-NaOH al 4%, NaOCl al 4,5% y NALC 30 mM y tratadas con lisozima, se pudo observar la amplificación de la secuencia IS6110, especialmente en las muestras fluidificadas con NaOH al 4% y NaOCl al 4,5%, donde se observaron bandas de amplificación claramente visibles independientemente del volumen de ADN utilizado. Es posible que estas sustancias fluidificadoras ejerzan un efecto facilitador de la RCP, tal como ha sido reportado por algunos autores (16, 17). A pesar de la escasa literatura antecedentes sobre el uso del hipoclorito de sodio en la fluidificación de muestras de esputo, como paso previo para la detección de *M. tuberculosis* por la RCP, esta sustancia, a una concentración de 0,5%, ha sido utilizada para la extracción de ADN de microsporidia a partir de muestras de heces, sin evidencia de inhibición de la RCP o alteración

del ADN obtenido (16). Por otra parte, cuando se utilizó el CPC-NaCl como agente fluidificante, no se logró obtener señal de amplificación de la secuencia IS6110, lo cual indica que la inhibición de la RCP probablemente fue ocasionada por la sustancia fluidificante.

Basados en los resultados obtenidos en la fase de estandarización donde las muestras fluidificadas con NaOCl al 4,5% y tratadas con lisozima se logró evidenciar la presencia de bandas de amplificación intensas correspondientes a la secuencia IS6110, independientemente de los volúmenes de ADN probados, se decidió utilizar el NaOCl al 4,5% para realizar la validación del procedimiento de preparación y extracción de ADN en muestras clínicas con baciloscopia y cultivo positivo para *M. tuberculosis*.

En el 66,67% (20/30) de las muestras analizadas, se evidenció bandas visibles correspondientes a la secuencia IS6110, al usar 5 µL de ADN sin diluir. Diez (n = 10) muestras (33,33%) presentaron inhibición de la RCP. Es posible que el elevado porcentaje de muestras inhibidas se deba a la utilización de extractos crudos de ADN que pueden contener sustancias capaces de interferir con la RCP (18,19). Por consiguiente, estas muestras fueron sometidas a un nuevo ensayo, en donde el ADN se diluyó, lográndose así la amplificación de la secuencia IS6110 en 2 de ellas solamente. Es importante resaltar que los ocho (n = 8) casos donde no se logró la amplificación del fragmento IS6110, los ADNs provenían de muestras de esputo con baciloscopia de una y dos cruces (6 con BK+ y 2 con BK++). Es probable que al diluir la muestra de ADN también se diluyó el blanco de amplificación disminuyendo la sensibilidad de la RCP. No obstante, se decidió someter estas 8 muestras con resultado falso negativo a la acción de la albúmina sérica bovina, considerando que esta sustancia tiene la capacidad de desinhibir la RCP ante una amplia variedad de sustancias orgánicas presentes en la muestra (6, 18, 19). En esta investigación se utilizó albúmina sé-

rica bovina acetilada como sustancia facilitadora de la RCP, incorporándose en una concentración final de 0,1 µg/µL por reacción. De esta manera, se logró evidenciar la amplificación del fragmento IS6110 en las 8 muestras probadas. Estos resultados demuestran que la sensibilidad del método propuesto al usar ADN sin diluir y sin uso de facilitadores de la RCP fue de un 66,7%, que luego aumentó a 100% cuando se agregó albúmina sérica bovina acetilada a la mezcla de amplificación. En tal sentido, se puede afirmar que es posible mejorar la sensibilidad de la técnica de la RCP para la detección del complejo *M. tuberculosis* en esputos, optimizando el procedimiento para la preparación de la muestra y la extracción del ADN de micobacterias. De acuerdo con este contexto, se concluyó proponiendo el siguiente protocolo de trabajo:

1. Fluidificar las muestras clínicas utilizando hipoclorito de sodio al 4,5% en una proporción 1:1 por 2 minutos.
2. Agregar agua destilada estéril hasta un volumen final de 50 mL y concentrar la carga bacteriana por centrifugación a 3.500 rpm por 30 minutos.
3. Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento con agua destilada estéril. Resuspender en 100 µL de TE (10mM Tris HCL, 1mM EDTA pH 8).
4. Transferir 50 µL de la suspensión a un tubo eppendorf y adicionar la lisozima (20 mg/mL) e incubar a 37°C durante toda la noche.
5. Centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos y transferir el sobrenadante a tubo eppendorf.
6. Someter la muestra a estrés térmico: 20 minutos a 80°C, 10 minutos a -70°C y 5 minutos a 80°C
7. Detectar la secuencia de inserción IS6110 por la RCP de acuerdo a Kolk y col., 1992.
8. Opcional: se recomienda utilizar albúmina sérica bovina acetilada a una concentración final de 0,1 µg/µL en muestras con baja carga de micobacterias (BK+ ó ++) o cuando se sospeche de falsos negativos.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el FONACIT a través del proyecto No. F2000001633 y por el Consejo de Estudios de Postgrado (CEP) de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Referencias Bibliográficas

1. HERNÁNDEZ C., GÓMEZ M. *Acta Cient Venez* 52 (Suppl 1): 23-25, 2001.
2. NAVA O., PRIETO L. *Kasmera* 29: 51-53, 2001.
3. IEVEN M., GOOSENS H. *Clin Microbiol Rev* 10: 242-256, 1997.
4. KIRVIHYA-NDUGGA L., VAN CLEEFF M., JUMA E., KIMWOMI J., GITHUI W., OSKAM L., SCHITEMA A., VAN SOOLINGEN D., NGANGA L., KIBUGA D., ODHIAMBO J., KLATSER P. *J Clin Microbiol* 42: 1012-1015, 2004.
5. SCHIJMAN A.G., LOSSO M.H., MONTOTO M., SAEZ C.B., SMAYEVSKY J., BENTUCCI J.A. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 6-13, 2004.
6. YAM W.C., CHENG V.C., HUI W.T., WANG L.N., SETO W.H., YUEN K.Y. *Diagn Microbiol Infect Dis* 8: 271-275, 2004.
7. DROBNIOWSKI F.A., CAWS M., GIBSON A., YOUNG D. *Lancet Infect Dis* 3:141-149, 2003.
8. VAN SOOLINGEN D. *J Intern Med* 249: 1-26, 2001.
9. MINISTERIO DE SALUD Y DESARROLLO SOCIAL (MSDS). *Programa Nacional Integrado para el Control de la Tuberculosis*. Actualización de Técnicas de bacteriología de la tuberculosis, Caracas, 1998.

10. ISEMBERG H, editor. ***Clinical microbiology procedures handbook***, American Society for Microbiology, Washington (USA), pp. 3.0.1-3.16.4, 1992.
11. KONEMAN E., ALLEN S., JANDA W., SCHRECKENBERGER P., WINN W. ***Diagnóstico microbiológico***. Texto y atlas color, Editorial Médica Panamericana, 5ta ed. Madrid (España), pp. 868-920, 1999
12. KOLK A., SCHUITEMA A., KUIJPER J., VAN LEEUWEN J., HERMANS P., VAN EMBDEN J.L., HARTSKEERL A. ***J Clin Microbiol*** 30: 2567-2575, 1992.
13. GEBRE N., KARISSON U., JONSSON G., MACADEN R., WOLDE A., ASSEFA A., MIORNER H. ***Trans R Soc Trop Med Hyg*** 89: 191-193, 1995.
14. AUNG W., NYEIN M., TI T., MAUNG W. ***J Med Public Health*** 32: 390-393, 2001.
15. SPROTT D, KOVAL S, SCHMAITMAN C. ***Cell fractionation***. (Ed. Gerhardt P. Methods for general and molecular bacteriology), American Society for Microbiology, Washington (USA), pp.72-103, 1994.
16. FEDORKO P., NELSON N., CARTWRIGHT C. ***J Clin Microbiol*** 33: 1739-1741, 1995.
17. BOURKE M., SCHERCZINGER C., LADD C., LEE H. ***J Forensic Sci*** 44: 1046-1050, 1999.
18. KREADER C. ***Appl Environ Microbiol*** 62: 1102-1106. 1996.
19. WILSON I. ***Appl Environ Microbiol*** 63: 3741-3751, 1997.