



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Diagnóstico molecular de la tuberculosis bovina

Tesis que presenta
Mariel Idalid Domínguez Zepahua

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis
Dr. Rubén López-Revilla

San Luis Potosí, S.L.P.

Julio de 2012



CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS

La tesis “**Diagnóstico Molecular de la tuberculosis bovina**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mariel Idalid Domínguez Zepahua** y aprobada en **junio de 2012** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén López-Revilla
Director

Dr. Lina Raquel Riego Ruiz
Asesora

Dr. J. Sergio Casas Flores
Asesor

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

El trabajo de esta tesis fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria, División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (375885).



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 098 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de julio del año 2012, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Presidenta	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Mariel Idalid Domínguez Zepahua

sobre la Tesis intitulada:

Diagnóstico Molecular de la Tuberculosis Bovina

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

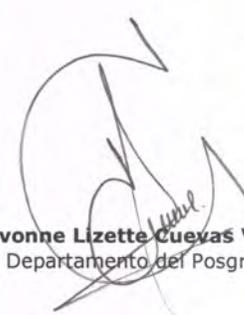
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México a los 5 días del mes de julio de 2012.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico
INSTITUTO POTOSINO
DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
IPICYT
SECRETARIA ACADEMICA


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

DEDICATORIAS

A mi familia y a Cristóbal que siempre me han apoyado en todas mis decisiones y me han empujado a conseguir cada meta.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén López Revilla por todas sus enseñanzas, su amistad, apoyo, consejos y motivaciones.

A la Biól. Mireya Sánchez por su apoyo en el laboratorio.

A todos mis compañeros: Claudia, Estela, Julio, Coco, Raúl, Cinthya, Oscar, Angélica, Chío y Guadalupe por su amistad.

ÍNDICE

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS.....	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES.....	III
COPIA DEL ACTA DEL EXAMEN.....	IV
DEDICATORIAS.....	V
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
Tuberculosis humana y bovina.....	1
<i>Tuberculosis humana</i>	1
<i>Tuberculosis bovina</i>	1
Diagnóstico microbiológico y molecular.....	2
<i>TB humana</i>	2
<i>TB bovina</i>	3
El proyecto.....	3
<i>Problema central</i>	3
<i>PRC en tiempo real para identificar las especies del CMTB</i>	4
<i>Propósito</i>	4
<i>Etapas</i>	4
MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
Diseño y análisis <i>in silico</i> de los iniciadores y amplicones adicionales.....	5
<i>PCR multiplex directa (PCRM-D)</i>	5
<i>PCR multiplex anidada (PCRM-A)</i>	5
Condiciones de las mezclas PCRM-D y preamplificación.....	6
Condiciones de la PCRM-A con o sin preamplificación.....	6
Sensibilidad de la PCRM-A con muestras preamplificadas.....	6
Electroforesis y caracterización de los productos de las mezclas de PCR.....	7
RESULTADOS.....	8
Amplicones largos en la PCRM-D1.....	8
Amplicón RD1- corto e iniciadores de la PCR A1.....	8
Amplicones largos e iniciadores de la PCRM-D2.....	8
Evaluación <i>in silico</i> de los amplicones e iniciadores candidatos.....	8
<i>Con los iniciadores de la mezcla PCRM-D1 (Tabla 3):</i>	9
<i>Con los iniciadores de la mezcla PCRM-D2 (Tabla 3):</i>	9
<i>Con los iniciadores de la mezcla PCRM-A1 (Tabla 4):</i>	9
<i>Con los iniciadores de la mezcla A2 (Tabla 4):</i>	9
Montaje y validación de las mezclas PCRM-D1.....	10
Montaje y sensibilidad de la PCRM-A preamplificada.....	10
DISCUSIÓN.....	12
REFERENCIAS.....	13

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores de la PCR multiplex de Pinsky y Banaei (2008).....	15
Tabla 2. Iniciadores adicionales diseñados en este trabajo para la PCR multiplex directa (PCRM-D) y anidada (PCRM-A).....	16
Tabla 3. Iniciadores “directos” (para PCRM-D1 y -D2).....	17
Tabla 4. Iniciadores “anidados” (para PCRM-A1 y -A2).....	18

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Algoritmo del ensayo de la PCR multiplex de Pinsky y Banaei (2008).....	19
Figura. 2. Posición de los iniciadores directos y anidados en el genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	20
Figura. 3. Algoritmo del ensayo de PCR multiplex anidada desarrollado en este trabajo	21
Figura. 4. Productos de amplificación de las cepas de referencia en la PCR-M-D1	22
Figura. 5. Amplificación en las mezclas de PCR-M-D1 con DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y concentraciones decrecientes de oligonucleótidos	23
Figura. 6. Productos de amplificación de las mezclas de PCR-M-D1 y -A1 con DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	24
Figura. 7. Productos de amplificación de las mezclas de PCR-M-D2 y -A2 con DNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	25
Figura. 8. Productos de amplificación de las mezclas de PCR-M-A1 directas (A1d) con DNA de <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> H37Rv.....	26
Figura. 9. Productos de amplificación de las mezclas de PCR-M-A1 anidadas (A1a) con DNA de <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> H37Rv.....	27

RESUMEN

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

CONTEXTO. El diagnóstico de la tuberculosis (TB) humana habitualmente no incluye la diferenciación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), aunque la enfermedad causada por *Mycobacterium bovis* es una enfermedad del ganado bovino con prevalencia variable en humanos. En México la TB bovina causa pérdidas por alrededor de 450 millones de dólares anuales y es una fuente significativa de infección para los humanos. En San Luis Potosí nuestro grupo encontró recientemente que al menos 2.1% de los casos de TB pulmonar humana se deben a *M. bovis*. El propósito de este trabajo fue desarrollar un método de PCR multiplex anidada rápido y ultrasensible —consistente en dos mezclas multiplex directas (PCRM-D1 y PCRM-D2) y las mezclas de reacción multiplex anidadas correspondientes (PCRM-A1 y PCRM-A2— para identificar *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG, basado en el método de Pinsky y Banaei (J Clin Microbiol 46:2241-6, 2008), que consta de dos mezclas de reacción sucesivas, denominadas respectivamente Rx1 y Rx2, equivalentes a las mezclas “directas” del nuevo método que nos propusimos desarrollar. **MÉTODOS.** Diseñamos siete oligonucleótidos adicionales a los del método original para generar dos amplicones directos, dos semianidados “largos” y un amplicón semianidado corto, los cuales fueron probados en mezclas de PCR multiplex con DNA de tres cepas de referencia: *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 o *M. bovis* BCG. Luego “preamplificamos” las mezclas PCRM-D1 y -D2 por 15 ciclos y usamos 1/25 de volumen como molde en las mezclas PCRM-A1 y -A2 que también amplificamos por 30 ciclos. Comparamos la sensibilidad de las mezclas PCRM-A1 “directa” (A1d) y anidada (A1a) empleando cantidades decrecientes de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv en: 1) mezclas A1d que fueron amplificadas por 30 ciclos y 2) mezclas PCRM-D1 preamplificadas por 15 ciclos de las cuales aplicamos 1/25 de volumen a mezclas A1a que fueron amplificadas a su vez por 30 ciclos. **RESULTADOS.** En las mezclas PCRM-D1 obtuvimos las bandas esperadas para *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG y *M. bovis* AN5. Observamos las dos bandas esperadas para *M. tuberculosis* con todas las diluciones de oligonucleótidos probadas. En las mezclas PCRM-A1 y -A2 preamplificadas obtuvimos todos los productos esperados e identificamos los amplicones específicos de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG. En la mezcla PCRM-A1d obtuvimos las bandas esperadas con un mínimo de 353 fg de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv (equivalentes a 74 copias del genoma) y 7 fg en la mezcla PCRM-A1a (equivalentes a 1 copia del genoma). **CONCLUSIONES.** Los oligonucleótidos adicionales diseñados por nosotros junto con los originales de Pinsky y Banaei (2008) generan los amplicones cortos anidados esperados que permiten identificar *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG. La preamplificación por 15 ciclos aumenta la sensibilidad 50 veces. El nuevo método utiliza 15 veces menos oligonucleótidos que el original y puede detectar una sola copia del genoma de *M. tuberculosis*. Este trabajo sienta las bases para el diagnóstico molecular rápido y confiable de las especies del CMTB que causan la tuberculosis humana y bovina y para el desarrollo subsiguiente de su modalidad de PCR en tiempo real.

PALABRAS CLAVE: Tuberculosis bovina, PCR multiplex anidada, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

MOLECULAR DIAGNOSIS OF BOVINE TUBERCULOSIS

BACKGROUND. The diagnosis of human tuberculosis (TB) usually does not differentiate the *Mycobacterium tuberculosis* complex species (MTC) although human TB caused by *Mycobacterium bovis* is a disease of cattle with varying prevalence in humans. In Mexico bovine TB is a significant source of infection for humans and causes losses of 450 million dollars annually. Our group recently found that in San Luis Potosí at least 2.1% of the human pulmonary TB cases are caused by *M. bovis*. The purpose of this work was to develop a fast and ultrasensitive nested multiplex PCR method—consisting of two direct multiplex reactions mixtures (PCRM-D1 and PCRM-D2) and the corresponding nested multiplex reaction mixtures (PCRM-A1 and PCRM-A2)—to identify *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. bovis* BCG, based on the method Pinsky and Banaei (J Clin Microbiol 46:2241-6, 2008) comprising two successive reaction mixtures called Rx1 and Rx2, equivalent to the “direct” mixtures of the new method. **METHODS.** Seven oligonucleotides additional to those of the original method were designed to generate two direct, two seminested “long” amplicons and one seminested “short” amplicon which were tested in multiplex PCR mixtures with DNA from three reference strains: *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 or *M. bovis* BCG. PCRM-D1 and -D2 mixtures were then “preamplified” for 15 cycles and 1/25 volume was used as template in PCRM-A1 and -A2 mixtures that were also amplified for 30 cycles. The sensitivity of “direct” PCRM-A1 (A1d) and nested (A1a) was compared using decreasing amounts of *M. tuberculosis* H37Rv in DNA as templates in: 1) A1d mixtures amplified for 30 cycles, 2) PCRM-D1 mixes “preamplified” for 15 cycles from which 1/25 volume was applied to A1a mixtures that were in turn amplified for 30 cycles. **RESULTS.** PCRM-D1 mixtures generated all bands expected for *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG and *M. bovis* AN5. The two bands expected for *M. tuberculosis* were generated with all the oligonucleotide dilutions tested. In “preamplified” PCRM-A1 and -A2 mixtures all the products expected were obtained and the *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. bovis* BCG specific amplicons were identified. In PCRM-A1d mixtures the expected bands were obtained with 353 fg of *M. tuberculosis* H37Rv DNA (equivalent to 74 genome copies) and in PCRM-A1a with 7 fg (equivalent to 1 genome copy). **CONCLUSIONS.** The additional oligonucleotides designed by us together with the original ones of Pinsky y Banaei (2008) generate the expected short nested amplicons that identify *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. bovis* BCG. Preamplification for 15 cycles increases the sensitivity 50-fold. The new method uses 15 times less oligonucleotides than the original one and can detect a single copy of the *M. tuberculosis* genome. This work lays the foundation for the rapid and reliable molecular diagnosis of the species of the MTBC complex causing human and bovine tuberculosis and for the subsequent development of its real time PCR modality.

KEY WORDS: Bovine tuberculosis, nested multiplex PCR, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

Tuberculosis humana y bovina

Tuberculosis humana

El género *Mycobacterium* está integrado por 50 especies patógenas primarias, oportunistas y saprófitas de bacilos largos o curvos no esporulados de 3-5 µm de longitud y abundantes gránulos citoplasmáticos. Su alto contenido de lípidos en la membrana los hace resistentes a la decoloración por alcohol ácido, a la desecación y a agentes desinfectantes, aunque son sensibles a la pasteurización.

La tuberculosis (TB) es la infección pulmonar o extrapulmonar, activa o latente, en humanos causada por bacilos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), constituido por las especies *M. tuberculosis* (principal agente causal), *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* (Parsons y col. 2002), *M. canettii* (van Soolingen y col. 1997) y *M. mungi* (Alexander y col. 2010). Cada especie del CMTB tiene hospederos, virulencia y patrones de farmacorresistencia e interés epidemiológico diferentes (Parsons y col. 2002, Pounder y col. 2010).

La forma más frecuente de TB humana es la pulmonar (TBP). Las formas extrapulmonares afectan principalmente la laringe, los nódulos linfáticos, el cerebro, el riñón y los huesos. La forma miliar, debida a diseminación hematogena, se presenta en niños y pacientes inmunocomprometidos (Esteve y col. 2010).

La TB es transmitida principalmente por inhalación de los aerosoles generados por enfermos de TBP activa que expulsan bacilos al toser o estornudar (“bacilíferos”), o por ingestión de productos cárnicos o lácteos no pasteurizados provenientes de ganado o vacas con TB causada por *M. bovis* (Ahmad 2011, Cosivi y col. 1998).

La forma más severa de TB extrapulmonar es la meníngea, con una tasa de mortalidad muy alta (Sengoz y col. 2008, Torok y col. 2008).

La transmisión y progresión de la enfermedad dependen en gran medida del estado del sistema inmunológico, la nutrición y las condiciones de vivienda del hospedero (Cegielski y McMurray 2004).

Tuberculosis bovina

La TB bovina, causada por *M. bovis*, tiene como reservorio principal a los bovinos —fuente principal de infección y causa de TB pulmonar y extrapulmonar de humanos y otros animales—, especialmente en países en desarrollo donde la pasteurización de la leche y sus derivados y los programas de control animal no se aplican o sólo se aplican esporádicamente (Cosivi y col. 1998).

En México se considera una zoonosis con notables implicaciones económicas (Secretaría de Agricultura 1995).

El contagio por *M. bovis* a través de aerosoles es más común en hombres que están en contacto con ganado bovino enfermo y en mujeres durante la preparación o consumo de

alimentos contaminados (Majoor y col. 2011); los animales silvestres constituyen una fuente de infección para los bovinos y animales domésticos. La TB pulmonar humana por *M. bovis* es más frecuente en hombres mientras que en mujeres predomina la presentación clínica en los nódulos linfáticos cervicales y otras formas extrapulmonares (Majoor y col. 2011)

Los casos de TB humana causada por *M. bovis* y *M. tuberculosis* son clínicamente indistinguibles (Cosivi y col. 1998, de la Rúa-Domenech 2006). El diagnóstico de TB humana por *M. bovis* requiere la confirmación del agente causal por cultivo y en México su prevalencia probablemente es subestimada debido a que el medio de cultivo empleado rutinariamente para el aislamiento del CMTB (medio de Löwenstein-Jensen) es menos eficiente que el mismo medio suplementado con piruvato o que el medio de Stonebrink (Grange y col. 1996).

Un análisis molecular reciente en una zona endémica de TB bovina en México identificó *M. bovis* en muestras del 6% de enfermos y trabajadores agrícolas asintomáticos y patrones genéticos idénticos en tres muestras de humanos y ocho muestras de animales (Milian-Suazo y col. 2010).

En nuestro laboratorio recientemente fueron caracterizadas por espoligotipificación 256 cepas del CMTB aisladas de los casos de TBP activa confirmados por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de San Luis Potosí entre 2006 y 2010. Cinco aislados (i.e., 2.1% del total) correspondieron a *M. bovis* y provenían de diferentes localidades rurales del sur del estado; los diferentes genotipos de dichos aislados implican que cada caso proviene de una cadena de transmisión distinta. Estos datos sugieren que en el estado la prevalencia de TB humana por *M. bovis* podría ser mucho mayor, especialmente entre los trabajadores que están en contacto directo con el ganado bovino.

Diagnóstico microbiológico y molecular

TB humana

El diagnóstico de la TB humana se basa en la historia clínica y las pruebas de gabinete, microbiológicas y moleculares (Secretaría de Salud 2005).

Las pruebas microbiológicas tradicionales incluyen la baciloscopía —basada en la tinción para bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) —, el cultivo y la susceptibilidad a los fármacos antituberculosos (“antifímicos”) en medios sólidos y líquidos (Secretaría de Salud 2005).

Aunque los medios líquidos requieren un tiempo de incubación 1-2 semanas más corto que los medios sólidos (los cuales requieren 2-8 semanas), su uso está restringido en laboratorios con recursos limitados (Organización Mundial de la Salud 2011, Parsons y col. 2011).

Las pruebas moleculares se basan en la amplificación e identificación de secuencias específicas del genoma micobacteriano tales como el transposón *IS6110*, el DNA ribosomal 16S, las regiones de repetidos directos (DR, *direct repeats* en inglés) (Kamerbeek y col.

1997) y las regiones de diferencia (RD, *regions of difference* en inglés) que permiten identificar especies, linajes y familias del CMTB (Pinsky y Banaei 2008).

Sin embargo, los métodos moleculares manuales tales como RFLP, espoligotipos y MIRU-VNTR requieren mucho tiempo de elaboración, personal capacitado, material y la interpretación de sus resultados es difícil (Parsons y col. 2011).

A pesar de las ventajas de los métodos moleculares —que permiten diferenciar especies, linajes, familias e incluso las cepas del CMTB implicadas en cadenas de transmisión y llevar a cabo estudios relevantes de epidemiología y epizootiología— en los países en desarrollo son escasos los laboratorios públicos y prácticamente inexistentes los laboratorios privados que los ofrecen. Estas limitaciones se deben en parte a los numerosos requisitos para la instalación de este tipo de laboratorios que incluyen una infraestructura adecuada con salas de preparación, descontaminación y análisis de muestras, materiales y métodos para la eliminación correcta de desechos biológicos, personal capacitado y programas de control interno y externo (Cosivi y col. 1998, Organización Mundial de la Salud 2011).

En México los casos de TBP activa confirmados son enfermos cuyo diagnóstico ha sido comprobado por baciloscopía, cultivo o histopatología (Secretaría de Salud 2005). En San Luis Potosí el Laboratorio Estatal de Salud Pública —encargado de realizar las pruebas microbiológicas para la vigilancia epidemiológica de la TB en el estado— identifica los aislados del CMTB por cultivo en medio de Lowenstein-Jensen y los confirma con el método de PCR COBAS (Amplicor, Roche) que identifica a los miembros del género *Mycobacterium* pero no diferencia las especies del CMTB.

TB bovina

El diagnóstico de la tuberculosis bovina está enfocado a la búsqueda de *M. bovis* en animales, principalmente bovinos, mediante la prueba de tuberculina en el pliegue caudal, cervical simple o cervical comparativa, con dos tipos de derivados proteínicos purificados: 1) PPD bovino, elaborado a partir de cultivos de la cepa *M. bovis* AN5 o 2) PPD aviar, elaborado a partir de cultivos de la cepa *M. aviar* D4.

El diagnóstico es complementado con los hallazgos histopatológicos de animales vivos o muertos, el cultivo de *M. bovis*, la tipificación molecular y cualquier otra prueba que convenga para este fin (Secretaría de Agricultura 1995).

El proyecto

Problema central

En el estado de San Luis Potosí al menos 2.1% de los casos de TB pulmonar en humanos se deben a *M. bovis* y se localizan en comunidades rurales de la cuenca lechera. La prevalencia de la TB humana por *M. bovis* en el estado podría ser mucho mayor, especialmente entre los jornaleros de la cuenca lechera y sus familiares.

Para evaluar el impacto de la TB bovina sobre la salud pública en el estado de San Luis Potosí es necesario determinar la prevalencia de *M. bovis* en el ganado bovino y entre

los trabajadores de la cuenca lechera y sus familiares e identificar las posibles cadenas de transmisión bovino-humano. Este objetivo podría abordarse con un método de diagnóstico molecular rápido, confiable y accesible que permita distinguir las especies del CMTB, especialmente en la población de alto riesgo.

PRC en tiempo real para identificar las especies del CMTB

Pinsky y Banaei (2008) publicaron un método de PCR en tiempo real que consta de dos mezclas de reacción multiplex sucesivas llamadas respectivamente Rx1 y Rx2 (Fig. 1). La primera tiene por objeto generar 1) un amplicón de 78 pb (rDNA 16S) común en los genomas de las micobacterias, 2) un amplicón de 51 pb (RD9+) característico de *M. tuberculosis* y *M. canettii* y 3) un amplicón de 222 pb (RD1-) característico de *M. bovis* BCG. La segunda reacción genera dos amplicones: 1) uno de 55 pb que indica presencia de la región RD4 en los genomas de *M. tuberculosis*, *M. canettii* y *M. africanum* y 2) otro de 94 pb que indica ausencia de la región RD4 en los genomas de *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

Propósito

Desarrollar un método de PCR multiplex anidada rápido y ultrasensible que permita identificar *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG basado el método de Pinsky y Banaei (2008), con dos mezclas de PCR sucesivas:

1. **Mezclas de PCR multiplex directa (PCRM-D1 y -D2)** que generen los “**amplicones largos**” (i.e., de mayor longitud que los originales).
2. **Mezclas de PCR multiplex anidada (PCRM-A1 y -A2)** que generen los “**amplicones cortos**”.

Etapas

El proyecto fue realizado en cuatro etapas:

1. Diseño y evaluación de los iniciadores adicionales para las mezclas de PCR multiplex directa (PCRM-D1 y -MD2) y anidada (PCRM-A1 y -A2)
2. Montaje y validación de las mezclas de PCRM-D.
3. Montaje y validación de las mezclas de PCRM-A.
4. Comparación de la sensibilidad de las PCRM-D y -A.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño y análisis *in silico* de los iniciadores y amplicones adicionales

Con la ayuda de Julio Juárez, en la base de datos disponible en <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Lgmb>, empleando el programa Geneious obtuvimos las secuencias blanco de las regiones rDNA 16S, RD9 y RD4 del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, las secuencias de los flancos de la delección de RD4 de *M. bovis* BCG y la secuencia del amplicón RD1- generado del genoma de *M. bovis* BCG con los oligos de Pinsky y Banaei (2008). Con ayuda de Claudia Magaña diseñamos los iniciadores correspondientes con el programa Primer Premier 5.

PCR multiplex directa (PCRM-D)

PCRM-D1

Con las secuencias blanco de las regiones rDNA 16S y RD9 diseñamos los iniciadores adicionales correspondientes, a los cuales impusimos los siguientes límites: 1) amplicones de 200-500 pb, 2) contenido de GC de 50-60% para cada iniciador, 3) Tm ~60°C, similar para los iniciadores de cada pareja, 4) longitud de 19-22 pb para cada iniciador, 5) ausencia de formación de horquillas y dímeros y 6) ausencia de falsa hibridación (Tabla 2).

Evaluamos los iniciadores candidato *in silico* para PCR multiplex con el programa FastPCR en los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

PCRM-D2

Para planear esta mezcla usamos la secuencia RD4 del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y las de los flancos de la delección de RD4 del genoma de *M. bovis* BCG.

Con Primer Premier 5 diseñamos, con los límites descritos (Tabla 2) —excepto por la longitud de los amplicones, de 200-400 pb—, dos iniciadores reversos que indicarían la presencia y ausencia de RD4. Ambos fueron analizados *in silico* para PCR multiplex junto con el iniciador complementario de Pinsky y Banaei (2008) usando el programa FastPCR en los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

PCR multiplex anidada (PCRM-A)

PCRM-A1

Para la secuencia de RD1- (222 pb) en *M. bovis* BCG diseñamos un iniciador forward. El límite impuesto para el amplicón semianidado fue de 150-200 pb; las otras características del iniciador se muestran en la Tabla 2. Posteriormente lo evaluamos *in silico* junto con los iniciadores candidatos para las regiones de rDNA 16S y RD9 y con el iniciador reverso RD1 de Pinsky y Banaei (2008) en PCR multiplex con el programa FastPCR en los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

Condiciones de las mezclas PCR-M-D y preamplificación

Las mezclas PCR-M-D1, de 25 μ L, contenían iniciadores (2.5 μ M c/u), 90 ng de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv (o 1.5 μ L de un lisado de *M. bovis* BCG o AN5), mezcla de dNTPs (0.2 mM c/u), MgCl₂ 2 mM y 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen).

La concentración de oligonucleótidos en las mezclas PCR-M-D1 que contenían 90 ng de DNA de H37Rv, mezcla de dNTPs (0.2 mM c/u) y MgCl₂ 2 mM fue optimizada probando diluciones seriadas al doble para obtener concentraciones decrecientes de los oligonucleótidos desde 2.5 μ M hasta 0.16 μ M.

Amplificamos las mezclas en un termociclador Applied Biosystems modelo 2720 con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95° C por 5 min; 30 ciclos de amplificación con desnaturalización a 95° C por 15 seg, annealing a 60°C por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg y extensión final a 72°C por 5 min.

Condiciones de la PCR-M-A con o sin preamplificación

Las mezclas PCR-M-D1 y -D2, de 25 μ L, contenían iniciadores (0.16 μ M c/u), 90 ng DNA H37Rv (o 1.5 μ L de lisado de *M. bovis* BCG o AN5), mezcla de dNTPs (0.2 mM c/u) y MgCl₂ 2 mM y fueron incubadas para preamplificarlas por 15 ciclos en las condiciones mencionadas antes en un termociclador Applied Biosystems modelo 2720. Luego aplicamos 1 μ L de cada mezcla preamplificada a las mezclas PCR-M-A1 y -A2 de 25 μ L que contenían mezcla de dNTPs (0.2 mM c/u), MgCl₂ 2 mM e iniciadores (0.16 μ M c/u) que amplificamos por incubación por 30 ciclos bajo las condiciones de amplificación mencionadas.

Sensibilidad de la PCR-M-A con muestras preamplificadas

Para determinar la sensibilidad de la PCR-M-A directa (i.e., la masa mínima de DNA problema que permite generar amplicones visibles) hicimos diluciones dobles seriadas (1:2 a 1:1024) del DNA de *M. tuberculosis* H37Rv en Tris 10 mM EDTA 1 mM pH 8 (TE) a partir de la concentración inicial de la solución madre (12 ng/ μ L).

A las mezclas de PCR-M-A1 directas (A1d) añadimos iniciadores (0.16 μ M c/u) y 7.5 μ L de cada dilución de DNA y las amplificamos por 30 ciclos bajo las condiciones de amplificación mencionadas.

Luego preparamos mezclas de PCR-M-D1 con el mismo volumen de cada dilución de DNA e iniciadores (0.16 μ M c/u), las cuales preamplificamos por 15 ciclos. Aplicamos 1 μ L de cada mezcla preamplificada como molde en las mezclas de PCR-M-A1 anidadas (A1a) que también amplificamos por 30 ciclos.

Calculamos la masa mínima de DNA y el número de copias del genoma de *M. tuberculosis* que permite generar productos de amplificación visibles para cada reacción con el tamaño del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv que contiene a 4,411,532 pb equivalente a 4.7609×10^{-15} g.

Electroforesis y caracterización de los productos de las mezclas de PCR

Analizamos los productos de amplificación en geles de SB-agarosa al 2% calibrados con una escalera de 50 pb (Invitrogen) y una escalera de 100 pb (Seegene), teñidos con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), transiluminados con UV para excitar la fluorescencia y registrados en el fotodocumentador ChemiDoc EQ. Determinamos los tamaños de las bandas con el software QuantityOne (BioRad, Hercules, CA).

RESULTADOS

Amplicones largos en la PCRM-D1

Para generar los amplicones largos que permitieran determinar la presencia de las secuencias de rDNA 16S características del género *Mycobacterium* y las secuencias RD9 características de *M.tuberculosis* y *M.canettii* en las mezclas de PCRM-D1, a partir de dichas secuencias blanco diseñamos los iniciadores correspondientes con el programa Primer Premier 5.

Encontramos dos parejas de iniciadores candidatos (Tabla 2) que generarían amplicones largos de 445 y 361 pb de las regiones rDNA 16S y RD9 respectivamente, en las mezclas PCRM-D1 (Tabla 3 y Fig. 2).

Antes de probar los cuatro iniciadores candidato en mezclas reales, con FastPCR evaluamos *in silico* mezclas de PCR multiplex virtuales para los iniciadores candidato y los del método original de Pinsky y Banaei (2008) en los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

Amplicón RD1- corto e iniciadores de la PCR A1

Con la secuencia del amplicón de la región RD1 que generan los iniciadores originales de Pinsky y Banaei (2008) diseñamos un iniciador forward adicional que junto con el reverso de los originales genere en la mezcla A1 un amplicón corto de 203 pb que permita determinar la ausencia de la región RD1 característica de *M. bovis* BCG (Tabla 2).

Evaluamos *in silico* con FastPCR las mezclas de PCR multiplex con el iniciador candidato corto para RD1, con los iniciadores de rDNA 16S y RD9 y con el reverso RD1 de Pinsky y Banaei (2008) en los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

Amplicones largos e iniciadores de la PCRM-D2

Para generar los amplicones largos que determinan la presencia de la región RD4 característica de *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum* y los amplicones largos que determinan la ausencia de la región RD4 característica de *M. bovis* y *M. bovis* BCG en la mezcla PCRM-D2, diseñamos dos iniciadores reversos con el programa Primer Premier 5, que generarían un amplicón largo (401 pb) que indicaría la presencia de la región RD4 y otro corto (172 pb) que indicaría la ausencia de la región RD4 (Tabla 2). Los iniciadores reversos seleccionados teóricamente tampoco formarían dímeros ni horquillas con el complementario de Pinsky y Banaei (2008) y podrían ser usados para la mezcla PCRM-D2 (Tabla 3).

Evaluación *in silico* de los amplicones e iniciadores candidatos

Para evaluar los nuevos iniciadores directos y el anidado junto con los de Pinsky y Banaei (2008) en las mezclas de PCRM-D1, -D2, -A1 y -A2, verificar la longitud de los

amplicones y determinar si podrían ser generados productos inesperados en estas reacciones, simulamos las mezclas de PCR multiplex *in silico* en FastPCR con los iniciadores para las mezclas de PCRM-D1, -D2, -A1 y -A2 con los genomas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG (Tablas 3 y 4, Fig. 2).

A continuación describimos las predicciones del análisis *in silico* con los iniciadores para dichas mezclas.

Con los iniciadores de la mezcla PCRM-D1 (Tabla 3):

La nueva pareja que indicaría presencia de la región rDNA 16S generaría un amplicón de 445 pb a partir de los genomas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

La nueva pareja que indicaría presencia de la región RD9 generaría un amplicón de 361 pb a partir del genoma de *M. tuberculosis*.

La pareja de Pinsky y Banaei (2008) que indicaría ausencia de la región RD1 generaría un amplicón de 222 pb a partir del genoma de *M. bovis* BCG.

Con los iniciadores de la mezcla PCRM-D2 (Tabla 3):

El nuevo iniciador reverso y el iniciador común de Pinsky y Banaei (2008) que indicarían presencia de la región RD4 generarían un amplicón de 401 pb a partir del genoma de *M. tuberculosis*.

El nuevo iniciador reverso y el iniciador común de Pinsky y Banaei (2008) que indicarían ausencia de la región RD4 generarían un amplicón de 172 pb a partir de los genomas de *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

Con los iniciadores de la mezcla PCRM-A1 (Tabla 4):

La pareja de Pinsky y Banaei (2008) que indicaría presencia de la región rDNA 16S generaría un amplicón de 78 pb a partir de los genomas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

La pareja de Pinsky y Banaei (2008) que indicaría presencia de la región RD9 generaría un amplicón de 51 pb a partir del genoma de *M. tuberculosis*.

El nuevo iniciador complementario y el iniciador reverso de Pinsky y Banaei (2008) que indicarían ausencia de la región RD1 generarían un amplicón de 203 pb a partir del genoma de *M. bovis* BCG.

Con los iniciadores de la mezcla A2 (Tabla 4):

La pareja de Pinsky y Banaei (2008) que indicaría presencia de la región RD4 generaría un amplicón de 55 pb a partir del genoma de *M. tuberculosis*.

La pareja de Pinsky y Banaei (2008) que indicaría ausencia de la región RD4 generaría un amplicón de 94 pb a partir de los genomas de *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

Con este análisis *in silico* concluimos que los nuevos iniciadores, combinados con los originales de Pinsky y Banaei (2008) generarían los amplicones esperados en las

mezclas de PCR-M-D1, -D2, -A1 y -A2 (Tablas 3 y 4) y decidimos adquirir los seis nuevos iniciadores candidatos para los amplicones largos y cortos adicionales a los originales.

Montaje y validación de las mezclas PCR-M-D1

Para probar si los iniciadores originales de Pinsky y Banaei (2008) y los nuevos realmente generan los productos de amplificación largos esperados en la mezcla PCR-M-D1 y optimizar su contenido: 1) preparamos mezclas PCR-M-D1 de 25 μ L con iniciadores 2.5 μ M, 90 ng DNA de *M. tuberculosis* H37Rv (o 1.5 μ L de lisado de *M. bovis* AN5 o BCG) y 2) mezclas PCR-M-D1 con concentraciones decrecientes de oligonucleótidos (2.5 μ M a 0.16 μ M) con 90 ng de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv.

En las mezclas PCR-M-D1 amplificadas observamos las bandas esperadas para las cepas de referencia (Fig. 5): 1) *M. tuberculosis* H37Rv, 445 pb (rDNA 16S) y 361 pb (presencia de RD9); 2) *M. bovis* BCG, 445 pb (rDNA 16S) y 222 pb (ausencia de RD1); 3) *M. bovis* AN5, 445 pb (rDNA 16S).

Al ensayar las concentraciones decrecientes de oligonucleótidos (2.5 μ M a 0.16 μ M) observamos las dos bandas esperadas para *M. tuberculosis* en todas las diluciones probadas (Fig. 5).

Concluimos que los nuevos iniciadores sólo generan los amplicones esperados en las mezclas PCR-M-D1 con DNA de las cepas de referencia de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG (Fig. 4), y que la concentración de iniciadores 0.16 μ M es suficiente para generar dichos amplicones (Fig. 5). Por eso decidimos usar esta concentración de iniciadores en adelante en todas las mezclas de PCR-M.

Montaje y sensibilidad de la PCR-M-A preamplificada

Preparamos mezclas de PCR-M-D1 y -D2 de 25 μ L con iniciadores 0.16 μ M, 90 ng de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv (o 1.5 μ L de lisado de *M. bovis* AN5 o BCG) que preamplificamos por 15 ciclos. Aplicamos luego 1 μ L de las mezclas preamplificadas respectivamente a mezclas PCR-M-A1 y -A2 que incubamos por 30 ciclos.

Con la combinación de los oligonucleótidos directos y anidados observamos todos los productos esperados y algunos productos secundarios menos intensos. Logramos identificar los amplicones de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG en las reacciones anidadas PCR-M-A1 y -A2 (Figs. 6 y 7). De aquí en adelante empleamos 15 ciclos de preamplificación para las mezclas de PCR-M-D1 y -D2.

Para determinar la cantidad mínima de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv detectable en las mezclas de PCR-M-A1 directas (i.e., con DNA genómico como molde) y preamplificadas (i.e., con mezclas preamplificadas como molde), preparamos diluciones dobles seriadas (1:2 a 1:1024) del DNA de *M. tuberculosis* H37Rv a partir de la concentración inicial de la solución madre (12 ng/ μ L) y las aplicamos a mezclas de reacción PCR-M-A1 directas (A1d) que amplificamos por 30 ciclos.

Por otra parte, preparamos mezclas de PCRM-D1 que contenían los mismos volúmenes de cada dilución de DNA y las preamplificamos por 15 ciclos. Luego aplicamos 1 μ L de las mezclas preamplificadas como molde a las mezclas de PCRM-A1 anidadas (A1a) que amplificamos por 30 ciclos.

En las mezclas A1d observamos productos amplificados hasta la mezcla que contenía la dilución 1:256 de DNA (353 fg, equivalente a 74 copias del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv) (Fig. 8). En las mezclas A1a observamos productos amplificados hasta la mezcla que contenía la dilución de DNA 1:512 (7 fg, equivalentes a una copia del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv) (Fig. 9). Como la sensibilidad de la mezcla anidada (A1a) fue 50.4 veces mayor que la directa (A1d), decidimos de aquí en adelante seguir usando la preamplificación por 15 ciclos.

DISCUSIÓN

Los nuevos iniciadores diseñados por nosotros, combinados con los originales de Pinsky y Banaei (2008), permiten obtener los productos de amplificación esperados en las mezclas de PCRM-D1, -D2, -A1 y -A2 a partir de los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG. En las mezclas preamplificadas los productos esperados son más intensos que los secundarios, lo cual permite identificar sin ambigüedad las tres cepas de referencia.

La optimización de la concentración de los iniciadores a 0.16 μM en las mezclas de PCRM-D1, -D2, -A1 y -A2 permite generar todos los productos esperados y representa una disminución de 15 veces de la concentración original (2.5 μM).

El aumento de sensibilidad en el método desarrollado por nosotros es tal que permite detectar una sola copia del genoma de *M. tuberculosis*. Esta característica sugiere que el método podrá aplicarse ventajosamente a muestras de tejido de origen humano y bovino con escasas micobacterias.

Considerando el tiempo que toma extraer el DNA de las muestras problema y aplicar nuestro método, la identificación de las especies del CMTB tomaría 2-3 días, en contraste con las 4-8 semanas que toma el cultivo. Esta considerable reducción mejoraría sensiblemente el diagnóstico y el tratamiento de los animales y humanos afectados.

Aunque el método de Pinsky y Banaei (2008) identifica *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG, falla para diferenciar *M. tuberculosis* y *M. canettii*, pues recientemente se encontró un flanco de RD12 ausente en *M. canettii* y presente en *M. tuberculosis* al que se ha llamado RD^{Canettii1} (Reddington y col. 2011), el cual podría usarse exitosamente en nuestro método.

La PCR en tiempo real ofrece ventajas sobre la PCR convencional tales como el análisis y diferenciación de los amplicones en el mismo aparato en el cual se lleva a cabo la amplificación sin necesidad de los pasos subsiguientes de electroforesis y fotodocumentación. Nuestro método podrá ahora ser probado para la amplificación y análisis mediante PCR en tiempo real a partir de las condiciones definidas en este trabajo y podría identificar los amplicones mediante los perfiles de desnaturalización característicos de cada uno de ellos.

Este trabajo sienta las bases firmes para el diagnóstico rápido y confiable de la tuberculosis en humanos y bovinos por las especies más frecuentes del CMTB y para el desarrollo de la modalidad de PCR en tiempo real.

REFERENCIAS

- Ahmad S (2011) Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol* 2011 814943
- Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC (2010) Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 16 (8):1296-9
- Cegielski JP, McMurray DN (2004) The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *Int J Tuberc Lung Dis* 8 (3):286-98
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX (1998) Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4 (1):59-70
- de la Rúa-Domenech R (2006) Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 86 (2):77-109
- Esteve E, Supervia A, Pallas O, Martinez MT, Montero MM, Del Bano F (2010) Miliary tuberculosis coinfection with human immunodeficiency virus. *West J Emerg Med* 11 (5):405-7
- Grange JM, Yates MD, de Kantor IN (1996) Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. 2nd ed. World Health Organization, Geneva.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35 (4):907-14
- Majoer CJ, Magis-Escurra C, van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D (2011) Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. *Emerg Infect Dis* 17 (3):457-63
- Milian-Suazo F, Perez-Guerrero L, Arriaga-Diaz C, Escartin-Chavez M (2010) Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Prev Vet Med* 97 (1):37-44
- Organización Mundial de la Salud S (2011) Cuestiones prioritarias en materia de investigación sobre la tuberculosis y la infección por el VIH en entornos de recursos limitados donde la infección por el VIH es prevalente. 64
- Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, Van Soolingen D, Hale YM, Salfinger M (2002) Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol* 40 (7):2339-45
- Parsons LM, Somoskovi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, Spector S, Roscigno G, Nkengasong J (2011) Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev* 24 (2):314-50
- Pinsky BA, Banaei N (2008) Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *J Clin Microbiol* 46 (7):2241-6
- Pounder JI, Anderson CM, Voelkerding KV, Salfinger M, Dormandy J, Somoskovi A, Heifets L, Graham JJ, Storts DR, Petti CA (2010) *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation by genomic deletion patterns with multiplex polymerase chain reaction and melting analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67 (1):101-5
- Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Maher M, van Soolingen D, Barry T (2011) Novel multiplex real-time PCR diagnostic assay for identification and differentiation of *Mycobacterium*

- tuberculosis, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 49 (2):651-7
- Secretaría de Agricultura GyDR (1995) Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*).
- Secretaría de Salud (2005) Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.
- Sengoz G, Yasar KK, Yildirim F (2008) Evaluation of 121 adult cases of tuberculous meningitis. *Neurosciences (Riyadh)* 13 (4):402-7
- Torok ME, Chau TT, Mai PP, Phong ND, Dung NT, Chuong LV, Lee SJ, Caws M, de Jong MD, Hien TT, Farrar JJ (2008) Clinical and microbiological features of HIV-associated tuberculous meningitis in Vietnamese adults. *PLoS One* 3 (3):e1772
- van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JD (1997) A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 47 (4):1236-45

Tabla 1. Iniciadores de la PCR multiplex de Pinsky y Banaei (2008)

Secuencia blanco	Oligonucleótido				Amplicón (pb)
	Sentido	Nombre	Secuencia (5' → 3')	T _m (°C)	
Género (rDNA 16S)	F	PB 16S F	CAACGCGAAGAACCTTACCT	60.0	78
	R	PB 16S R	TGCACACAGGCCACAAGGGA	64.0	
Presencia de RD9 (RD9+)	F	PB RD9 F	TTTCGAGCCGTAAATTACTGTG	59	51
	R	PB RD9 R	GAGCATTCTCGCTCCGAAT	58.0	
Ausencia de RD1 (RD1-)	F	PB RD1 F	GGATTTGACGTCGTGCTTCT	60.0	222
	R	PB RD1 R	TTCAACGGGTTACTGCGAAT	58.0	
Presencia de RD4 (RD4+)	F	PB RD4 Fc	AGAAGCGCAACTCTTGGGA	60.0	55
	R	PB RD4+ R	CATGCGCCCTATTTGATCTC	60.0	
Ausencia de RD4 (RD4-)	F	PB RD4 Fc	AGAAGCGCAACTCTTGGGA	60.0	94
	R	PB RD4- R	TTGCTGAAAAATGGCTATTGA	55	

Tabla 2. Iniciadores adicionales diseñados en este trabajo para la PCR multiplex directa (PCRM-D) y anidada (PCRM-A)

Rx	Iniciadores ^a						Amplicón esperado (pb) ^b	
	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Longitud (bases)	Posición en el genoma		Tm °C		%GC
				De <i>Mt</i> H37Rv	De <i>Mb</i> BCG			
D1	F 16S D1	TGGGCAGTAACTGACGCTGAG	21	5' 1472576-1472596 3'	5' 1499090-1499110 3	61.2	57.9	445 pb
D1	R 16S D1	ACCTTCCTCCGAGTTGACC	19	3' 1473002-1473020 5'	3' 1499516- 1499534 5'	58.0	57.1	---
D1	F RD9 D1	ATCAGGGTGGAGCCGATACCA	21	5' 2329890-2329910 3'	---	63.8	57.1	361 pb (H37Rv)
D1	R RD9 D1	GCTTCCCCGGTTCGTCTGG	19	3' 2330232-2330250 5'	---	64.8	68.4	---
A1	F RD1 A1	TGGTCGACGATTGGCACATC	20	---	5' 4322296-4322715 3'	62.1	55.0	203 pb (BCG)
D2	R RD4- D2	ACCCAAAAGGAGCACCATC	20	---	3' 1721220-1721239 5'	61.1	55.0	172 pb (BCG; F de Pinsky)
D2	R RD4+ D2	TGTGGCTATGGGGCTCTACTG	21	---	3' 1696375-1696395 5'	60.2	57.1	401 pb (H37Rv; F de Pinsky)

^a Diseñados con Primer Premier 5.

^b Longitud predicha *in silico* con FastPCR.

Tabla 3. Iniciadores “directos” (para PCRM-D1 y -D2)

PCRM	Iniciadores ^a		Amplicones esperados (pb) ^b		
	Nombre	Secuencia(5' → 3')	<i>M. tuberculosis</i> (NC_00962.2)	<i>M. bovis</i> BCG (NC_008769.1)	<i>M. bovis</i> (NC_002945.3)
D1	F 16S D1	TGGGCAGTAACTGACGCTGAG	445	445	445
	R 16S D1	ACCTTCCTCCGAGTTGACC			
	F RD9 D1	ATCAGGGTGGAGCCGATACCA	361	---	---
	R RD9 D1	GCTTCCCGGTTTCGTCTGG			
	PB RD1 F	GGATTTGACGTCGTGCTTCT	---	222	---
	PB RD1 R	TTCAACGGGTTACTGCGAAT			
D2	PB RD4 Fc	AGAAGCGCAACACTCTTGGA	---	172	172
	R RD4- D2	ACCCCAAAGGAGCACCATC			
	PB RD4 Fc	AGAAGCGCAACACTCTTGGA	401	---	---
	R RD4+ D2	TGTGGCTATGGGGCTCTACTG			

^aDiseñados con Primer Premier 5.

^bLongitud predicha *in silico* con FastPCR.

Tabla 4. Iniciadores “anidados” (para PCRM-A1 y -A2)

PCRM	Iniciadores ^a		Amplicones esperados (pb) ^b		
	Nombre	Secuencia(5' → 3')	<i>M. tuberculosis</i> (NC_00962.2),	<i>M. bovis BCG</i> (NC_008769.1)	<i>M. bovis</i> (NC_002945.3)
A1	PB 16S F	CAACGCGAAGAACCTTACCT	78	78	78
	PB 16S R	TGCACACAGGCCACAAGGGA			
	PB RD9 F	TTTCGAGCCGTAAATTACTGTG	51	--	--
	PB RD9 R	GAGCATTCTCGCTCCGAAT			
	F RD1 A1	TGGTCGACGATTGGCACATC	--	203	--
	PB RD1 R	TTCAACGGGTTACTGCGAAT			
A2	PB RD4 Fc	AGAAGCGCAACACTCTTGGA	--	94	94
	PB RD4- R	TTGCTGAAAAATGGCTATTGA			
	PB RD4 Fc	AGAAGCGCAACACTCTTGGA	55	--	--
	PB RD4+ R	CATGCGCCCTATTTGATCTC			

^aDiseñados con Primer Premier 5.

^bLongitud predicha *in silico* con FastPCR.

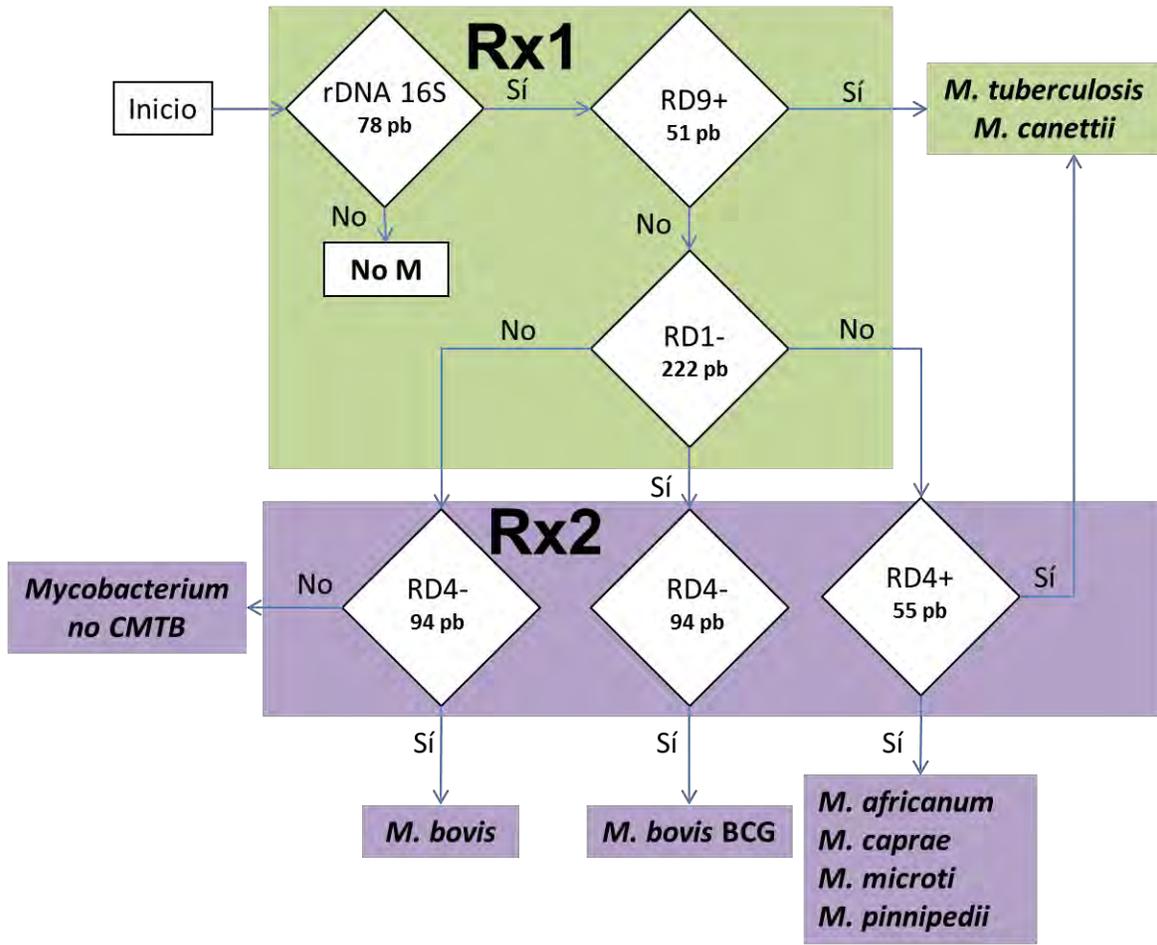


Figura. 1. Algoritmo del ensayo de la PCR multiplex de Pinsky y Banaei (2008)

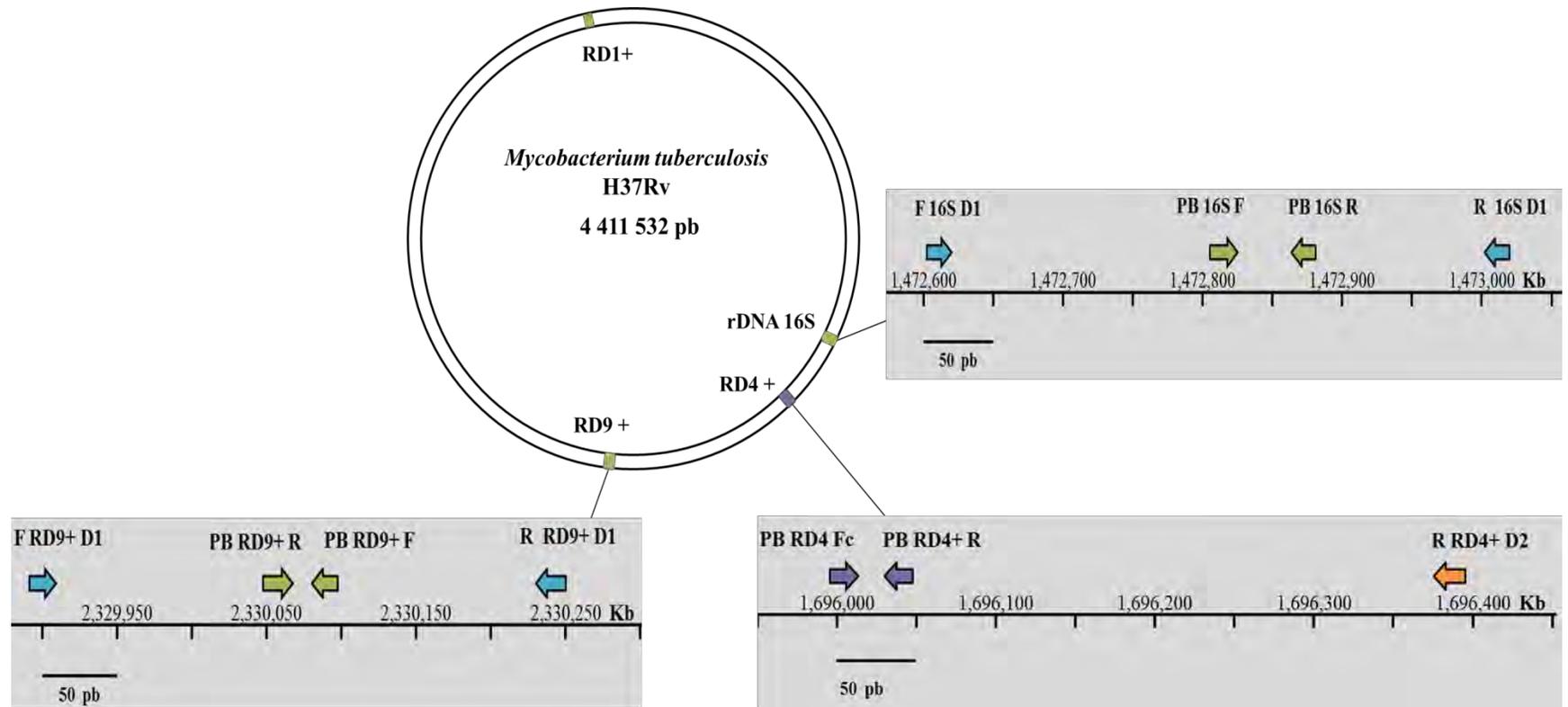


Figura. 2. Posición de los iniciadores directos y anidados en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv

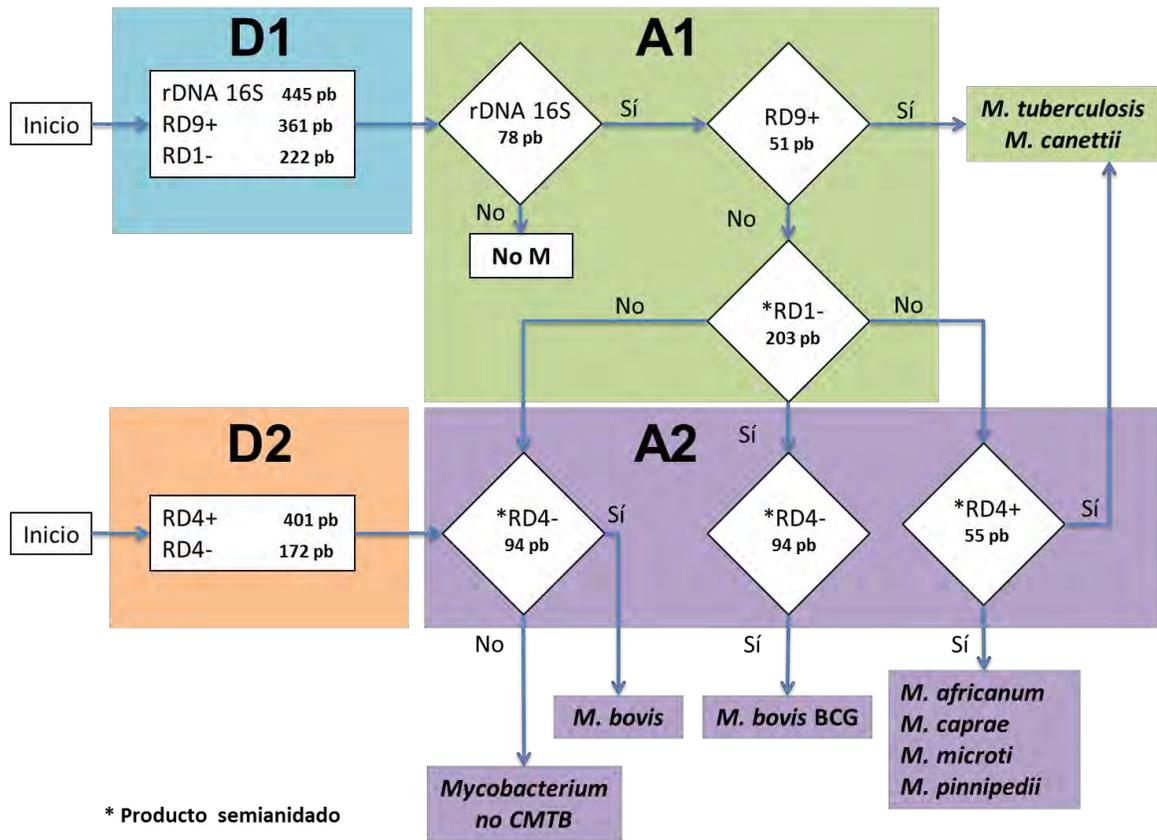


Figura. 3. Algoritmo del ensayo de PCR multiplex anidada desarrollado en este trabajo

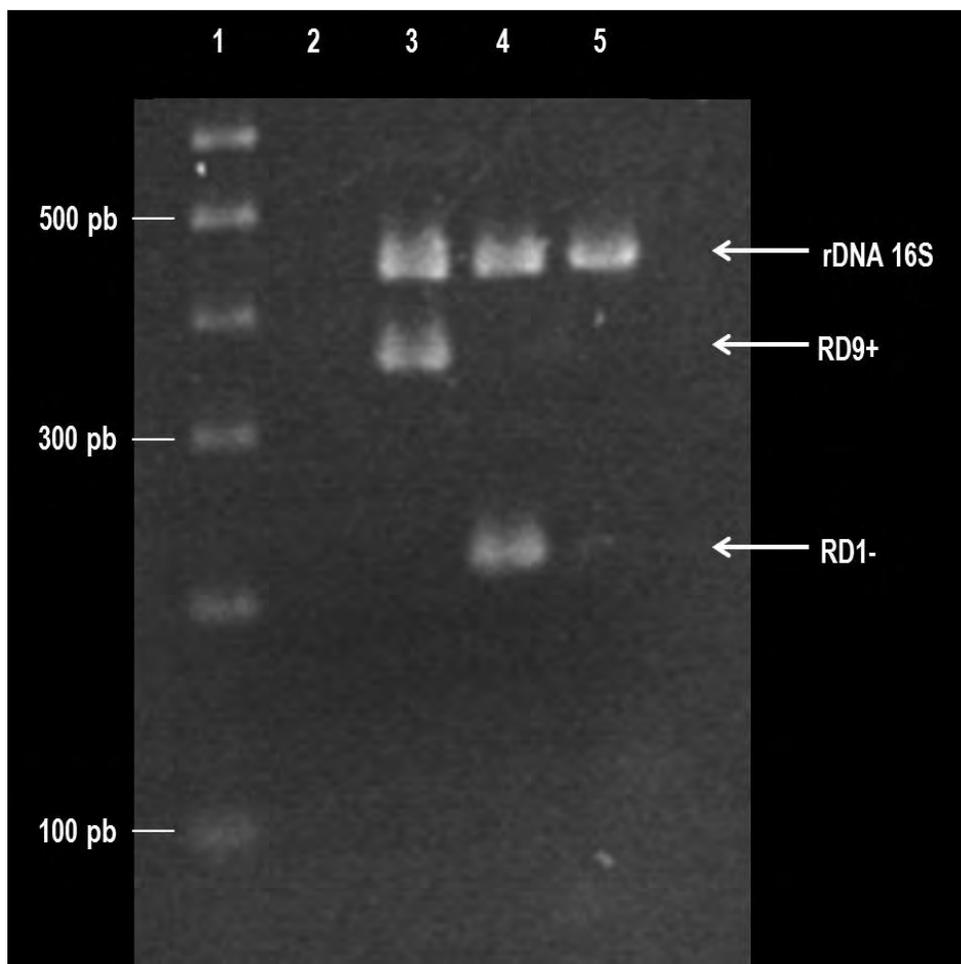


Figura. 4. Productos de amplificación de las cepas de referencia en la PCRM-D1

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Muestras de 6 μ L de mezclas de 25 μ L con 12 ng de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv (o 1.5 μ L de lisado de *M. bovis* BCG o AN5), amplificadas por 30 ciclos. Carril 1, escalera 100 pb. Carriles 2-5, mezclas D1. Carril 2, Blanco (sin DNA). Carril 3, *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 4, *M. bovis* BCG. Carril 5, *M. bovis* AN5.

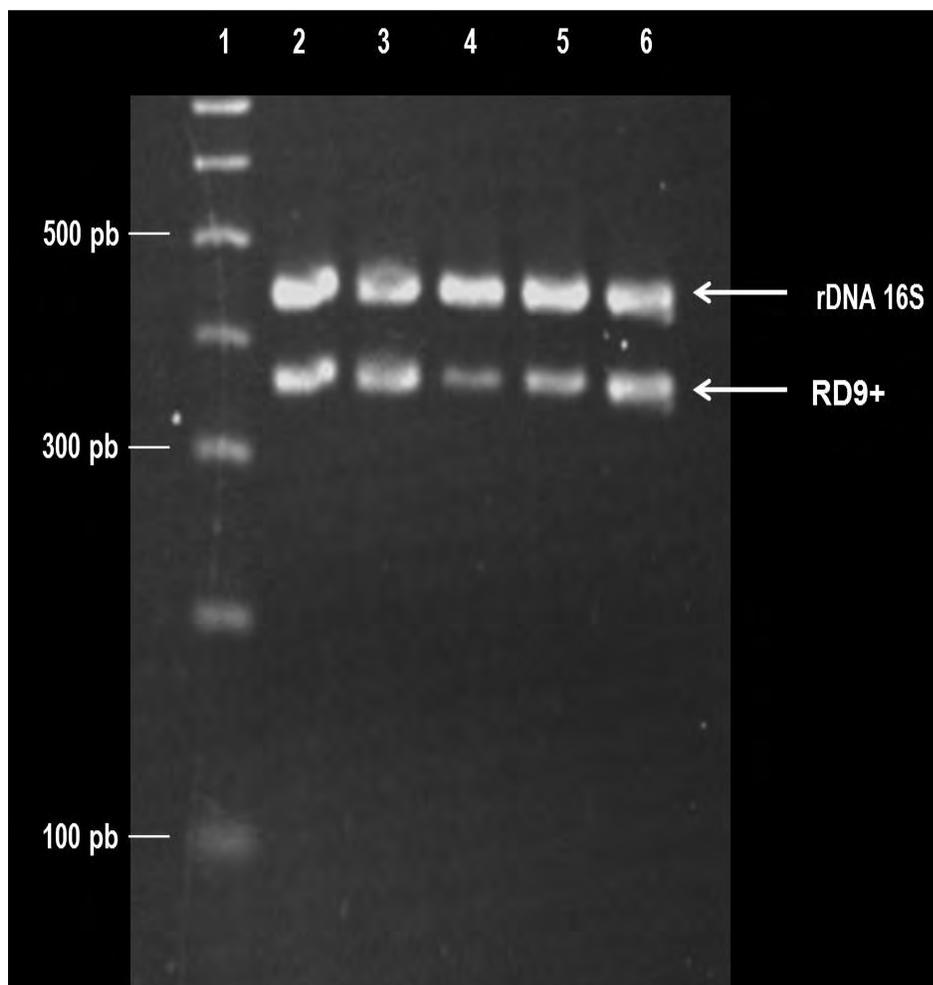


Figura. 5. Amplificación en las mezclas de PCRM-D1 con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv y concentraciones decrecientes de oligonucleótidos

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Muestras de 6 μ L de mezclas de 25 μ L con 12 ng de DNA *M. tuberculosis* H37Rv y diluciones seriadas al doble de oligonucleótidos, amplificadas 30 ciclos. Carril 1, escalera 100 pb. Carriles 2-5, mezclas PCRM-D1 con concentraciones decrecientes de oligonucleótidos: Carril 2, 2.5 μ M. Carril 3, 1.26 μ M. Carril 4, 0.63 μ M. Carril 5, 0.32 μ M. Carril 6, 0.16 μ M.

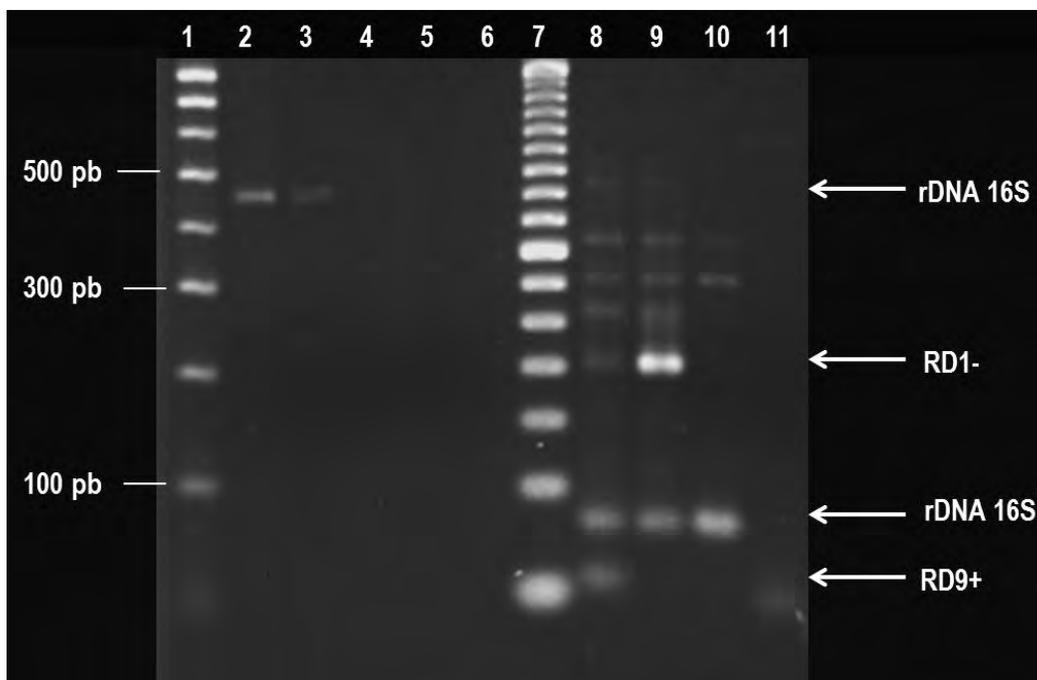


Figura. 6. Productos de amplificación de las mezclas de PCRM-D1 y -A1 con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Muestras de 6 μ L de mezclas de 25 μ L con 12 ng de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv (o 1.5 μ L de lisado de BCG o AN5) preamplificadas por 15 ciclos. Carril 1, escalera 100 pb. Carriles 2-5, mezclas D1. Carril 2, D1 H37Rv. Carril 3, D1 BCG. Carril 4, D1 AN5. Carril 5, D1 Bk. Carril 6, sin muestra. Mezclas de 25 μ L amplificadas por 30 ciclos. Carril 7, escalera 50 pb. Carriles 8-11, mezclas A1. Carril 8, A1 H37Rv. Carril 9, A1 BCG. Carril 10, A1 AN5. Carril 11, A1 Bk.

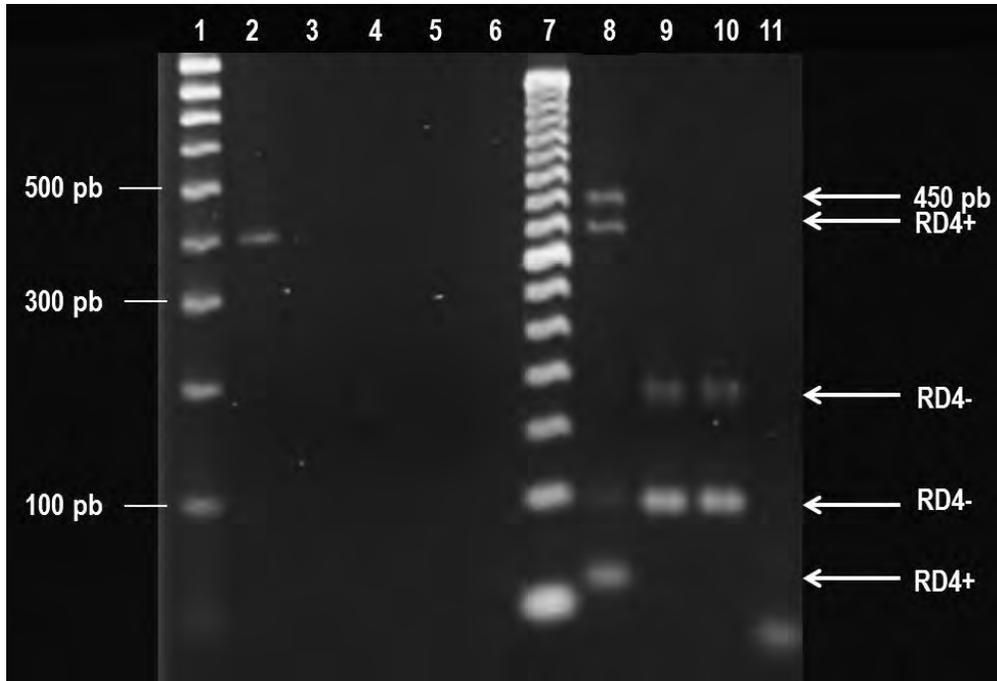


Figura. 7. Productos de amplificación de las mezclas de PCRM-D2 y -A2 con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Muestras de 6 μ L de mezclas de 25 μ L con 12 ng de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv (o 1.5 μ L de lisado de BCG o AN5) preamplificadas por 15 ciclos. Carril 1, escalera 100 pb. Carriles 2-5, mezclas D2. Carril 2, D2 H37Rv. Carril 3, D2 BCG. Carril 4, D2 AN5. Carril 5, D2 Bk. Carril 6, sin muestra. Mezclas de 25 μ L amplificadas por 30 ciclos. Carril 7, escalera 50 pb. Carriles 8-11, mezclas A2. Carril 8, A2 H37Rv. Carril 9, A2 BCG. Carril 10, A2 AN5. Carril 11, A2 Bk.

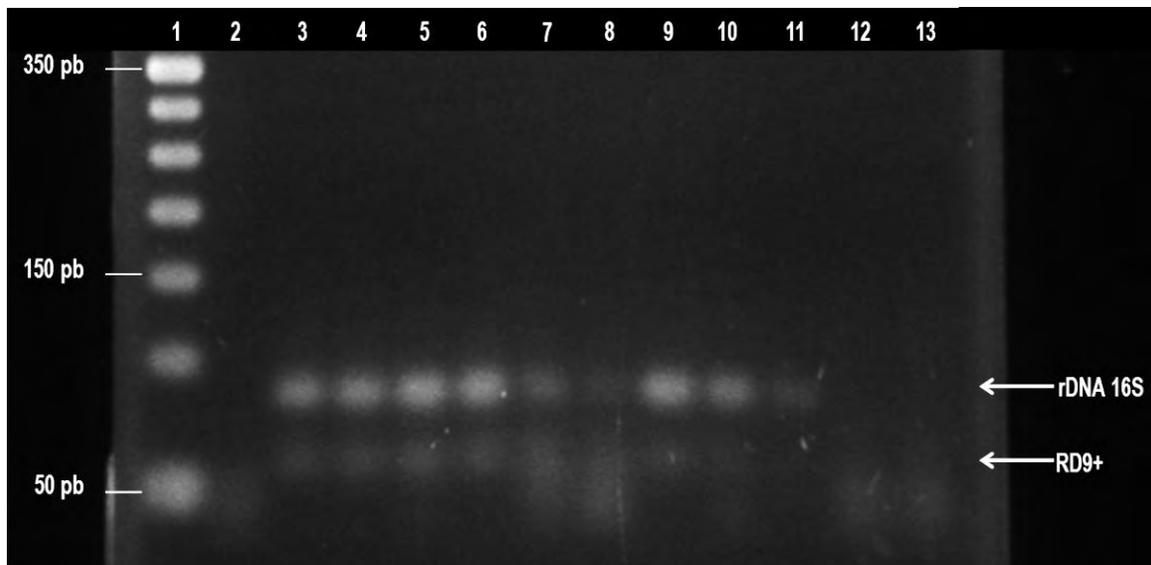


Figura. 8. Productos de amplificación de las mezclas de PCR-M-A1 directas (A1d) con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Muestras de 6 μ L de mezclas de 25 μ L con diluciones seriadas de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. Mezclas A1 amplificadas por 30 ciclos Carril 1, escalera 50 pb. Carriles 2-13, mezclas A1d. Carril 2, A1d Bk (sin DNA). Carril 3, A1d 12 ng/ μ L. Carril 4, A1d 6 ng/ μ L. Carril 5, A1d 3 ng/ μ L. Carril 6, A1d 1.5 ng/ μ L. Carril 7, A1d 0.75 ng/ μ L. Carril 8, A1d 0.375 ng/ μ L. Carril 9, A1d 0.188 ng/ μ L. Carril 10, A1d 0.094 ng/ μ L. Carril 11, A1d 0.047 ng/ μ L. Carril 12, A1d 0.023 ng/ μ L. Carril 13, A1d 0.012 ng/ μ L.

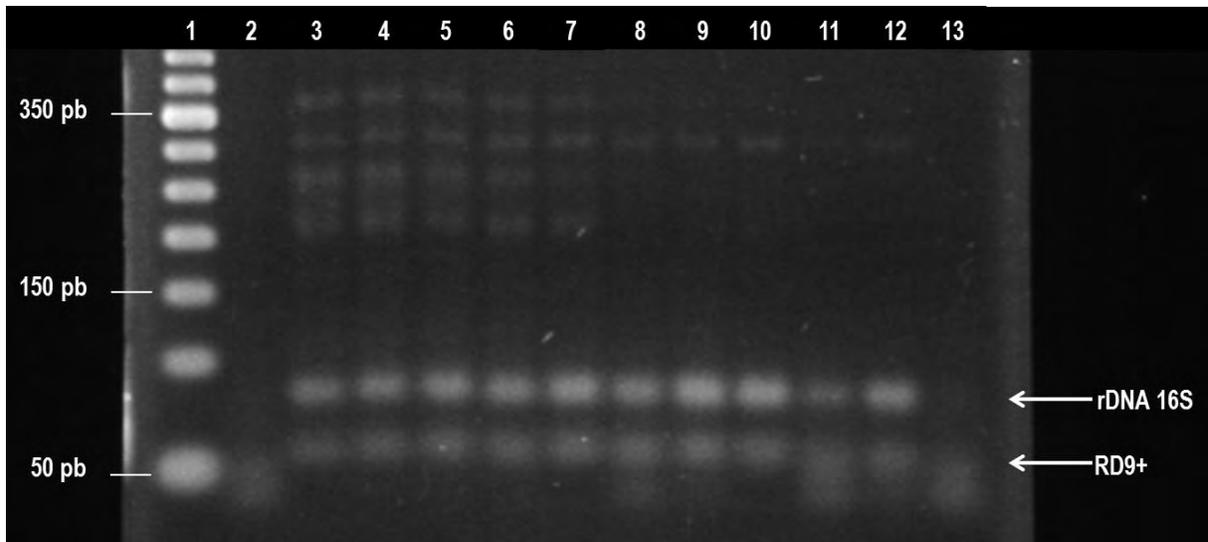


Figura. 9. Productos de amplificación de las mezclas de PCR-A1 anidadas (A1a) con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv

Gel SB-agarosa al 2% de 0.5 cm de espesor. Muestras de 6 μ L de mezclas de 25 μ L preamplificadas 15 ciclos con diluciones seriadas de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. Mezclas A1. Carril 1, escalera 50 pb. Carriles 2-13, mezclas A1a. Carril 2, A1a Bk (sin DNA). Carril 3, A1a 12 ng/ μ L. Carril 4, A1a 6 ng/ μ L. Carril 5, A1a 3 ng/ μ L. Carril 6, A1a 1.5 ng/ μ L. Carril 7, A1a 0.75 ng/ μ L. Carril 8, A1a 0.375 ng/ μ L. Carril 9, A1a 0.188 ng/ μ L. Carril 10, A1a 0.094 ng/ μ L. Carril 11, A1a 0.047 ng/ μ L. Carril 12, A1a 0.023 ng/ μ L. Carril 13, A1a 0.012 ng/ μ L.