



## CONTROL DE CAMBIOS Y MEJORAS

NIVEL DE REVISIÓN	SECCIÓN Y/O PÁGINA	DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN Y MEJORA	FECHA DE MODIFICACIÓN
<b>01</b>			
<b>02</b>			
<b>03</b>			
<b>04</b>			

**ELABORÓ:** María Cárdenas Marrufo, Víctor Suarez Solís, Juan J Arias León, Gaspar Peniche Lara, Eduardo Sulu (responsables de los diagnósticos) Bertha Jiménez Delgadillo Responsable de laboratorios de Enfermedades infecciosas y Parasitarias)

**VISÓ**

**Dr. Marco Antonio Palma Solís**  
Coordinador de la UIICE

**APROBÓ**

**Dr. Guillermo Storey Montalvo**  
Director Facultad de Medicina UADY

# MANUAL DE LABORATORIO DE TECNICAS DE DIAGNOSTICO ESPECIALIZADO



## CONTENIDO

Diagnostico de LEPTOSPIROSIS.....	4
Diagnostico molecular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
Diagnostico de RICKETTSIA .....	25
Diagnostico molecular de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	29

## DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS

M en C. María F. Cárdenas Marrufo, QFB Juan José Arias

### OBJETIVO:

Identificar la presencia de *Leptospira interrogans* a partir de muestras biológicas (Expectoración, Sangre, Orina, Jugo Gástrico, LCR, Biopsia) empleando ELISA, MAT y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

### INTRODUCCIÓN

Leptospirosis es una enfermedad infecciosa generalizada aguda, en la actualidad es considerada como re emergente. Es transmitida por *Leptospira interrogans*, una bacteria del orden *Spirochaetales*, de la familia *Leptospiraceae*. Es una zoonosis de distribución mundial que afecta a mamíferos salvajes y domésticos. El hombre se infecta por contacto directo o indirecto con animales infectados. Afecta adultos jóvenes y la incidencia pico es en verano y comienzo del otoño. El contacto indirecto con animales infectados, a través del agua o el suelo contaminados con orina infectada, es la causa más común de infección humana que el contacto animal directo. La exposición ocupacional (granjeros, veterinarios, trabajadores de mataderos) y la exposición recreativa (acampantes, nadadores) son frecuentes. En todo el mundo, las ratas constituyen la fuente más común de infección humana, seguidos por los perros, ganado, roedores, mamíferos salvajes y gatos.

El control epidemiológico es extremadamente difícil debido a que las leptospiras persisten por períodos prolongados en los túbulos renales (con excreción por la orina) sin producir enfermedad; y los animales salvajes representan un reservorio importante para reinfectar continuamente a los animales domésticos.

La existencia de leptospirosis en México fue demostrada en 1920 en el estado de Yucatán, y desde entonces diferentes estudios en humanos y reservorios confirman su condición endémica.

### LABORATORIO EN EL DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS

Se debe realizar la confirmación de la entidad basándose en el diagnóstico epidemiológico, clínico y de laboratorio. Las pruebas de laboratorio son necesarias para confirmar el diagnóstico ante la sospecha clínica de leptospirosis. Como las manifestaciones clínicas de no son específicas y con frecuencia dependen del serovar infectante, no es raro que se confunda con otros procesos infecciosos de tipo viral o bacteriano como bronquitis, dengue, hepatitis viral, influenza, meningitis aséptica, nefritis, rickettsiosis y síndrome viral, es por esto que, debería estar incluida en el diagnóstico diferencial de las enfermedades febriles que se presentan en regiones tropicales. La confirmación por el laboratorio debe realizarse a todo paciente con fiebre, mialgia, cefalea y náusea o vómito de origen desconocidos. El diagnóstico de laboratorio se establece mediante la demostración de los microorganismos mediante aislamiento o detección específica de ADN de la bacteria o por pruebas serológicas. La selección y uso de las pruebas apropiadas se debe tener en cuenta el tiempo de evolución de la enfermedad, con el fin de realizar una correcta interpretación de los resultados.



Desde 1915 en que Inada y cols aislaron el agente causal del síndrome de weil, se han descrito una amplia variedad de pruebas de laboratorio que van desde la observación, aislamiento de la *leptospira* hasta las nuevas pruebas serológicas y las basadas en técnicas moleculares.

## MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

---

### Área de diagnóstico

Laboratorio de bioseguridad tipo II, con campana de bioseguridad (flujo laminar, luz ultravioleta), microscopio con condensador de campo oscuro, baño de maría, nefelómetro, incubadora a 30°C, refrigerador, congelador a -20°C y a -70°C, lector de placas de ELISA y autoclave. Se recomienda el uso de un área libre de corrientes de aire y con piso, paredes y ventanas lisas y fáciles de lavar y desinfectar. Las mesas de trabajo deben tener material absorbente, se deben lavar con hipoclorito de sodio al 6%. Las placas de microtitulación donde se realiza la técnica de MAT deben ser colocadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante una hora, el material reutilizable se trata durante 24 horas con benzal, preparado según el fabricante.

### Personal de laboratorio

Debe usar bata, guantes, cubre boca y lentes de seguridad, estar previamente capacitado, conocer el manejo de los residuos peligrosos biológico infeccioso (RPBI) según la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, y conocer el riesgo que implica el manejo de la bacteria. Durante el trabajo evitar la formación de aerosoles y de corrientes de aire por movimientos bruscos.

### Manejo de muestras biológicas

Las muestras deben ser manejadas con sumo cuidado, identificadas con nombre del paciente, para cada tipo de muestra y determinación a realizar se seleccionan y efectúan, si fuese necesario, las operaciones previas para el análisis (centrifugación, homogenización, dilución u otras). Las muestras deben ser almacenadas adecuadamente hasta su proceso, los sueros se almacenan en congelación a -20°C y la sangre con anticoagulante se almacenan en refrigeración a 4°C, al terminar el trabajo el químico responsable, se encarga de que en su área, todo quede dispuesto, en orden y limpio para una próxima utilización.

### Envío de muestras biológicas al laboratorio

El paciente que acude al laboratorio deberá contar con la orden de solicitud del médico tratante, haber presentado base fiebre, mialgia y/o cefalea, acudir en condiciones de 8 horas de ayuno. Previa información sobre la enfermedad y resultados del análisis se solicita el consentimiento del paciente para obtener la muestra sanguínea, ésta es obtenida a través de punción venosa en la vena cefálica, la punción debe realizarse con destreza y capacitación técnica, jeringa desechable estéril o sistema *vacutainer BD*, tubos colectores desechables según sea la muestra que se requiera, obtener tapón rojo (suero) o tapón azul (plasma).

Las muestras biológicas (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) que sean enviadas por el sector salud (IMSS, ISSSTE, SSA), deben contar solicitud del médico tratante, resumen de la historia clínica.



**Orina.-** Colocar en un recipiente de plástico estéril 20 ml. De la primera micción del día, agregar HCL o NaOH al 1 N para neutralizar el pH (7.0 a 7.5), rotular adecuadamente con el nombre del paciente y entregar la muestra a la brevedad posible, para ser observada al microscopio o intentar el aislamiento.

**Suero.-** Se envían de 3 a 5 ml. Contenidos en un tubo estéril de 13 X 100, con tapón de hule o plástico, rotulados con el nombre del paciente, en refrigeración. No se deben enviar sueros hemolizados, lipémicos o en cantidad insuficiente. Se requieren muestras pareadas las cuales se deben tomar la primera durante el cuadro agudo y la segunda en la convalecencia después de una semana de estar libre de antibiótico.

**Sangre.-** Previo ayuno del paciente se envían de 5 a 7 ml. Contenidos en tubo estéril de 13 X 100, tapón rojo o sin anticoagulante, rotulado con el nombre del paciente y en refrigeración.

**Líquido cefalorraquídeo.-** Personal médico especializado, debe relizar la toma por punción lumbar al menos 1 ml. En condiciones de alta higiene y seguridad, durante los primeros diez días de la infección y se envía a temperatura ambiente, sin refrigerar en tubo de 13 X 100 estéril con tapón de hule y debidamente rotulado. Es importante que la muestra se envíe lo más pronto posible.

**Muestras de agua.-** Se envían muestras de agua de cualquier fuente, en contenedores estériles de boca ancha y se colecta introduciéndolo varias veces a diferente profundidad (hasta un máximo de 15 cm) hasta obtener de 250 a 500 ml. Se envían a temperatura ambiente.

**Biopsia (hígado, riñón, pulmón).-** Las muestras se envían en recipientes estériles de plástico, sin refrigerar, rotuladas y en solución salina estéril.

## TÉCNICAS DE LABORATORIO

---

### *DetECCIÓN DIRECTA POR MICROSCOPIA*

Las leptospiras se pueden visualizarse en material biológico por microscopía de campo obscuro, inmunofluorescencia o microscopía de luz visible después de una tinción apropiada. Aproximadamente  $10^4$  leptospiras/ml son necesarias para ser visible por microscopía. La observación de la sangre por microscopía solo tiene valor durante los primeros días en la fase aguda de la enfermedad, mientras se produce leptospiremia. La microscopía de campo obscuro de los fluidos corporales como sangre, orina, líquido cefalorraquídeo y líquido dializado se ha utilizado, pero es poco sensible y carece de especificidad. Inicialmente las leptospiras fueron visualizadas con tinción argéntica y la tinción Warthin-Starry ambas fueron ampliamente utilizadas para el examen histológico. La inmunofluorescencia aumenta la sensibilidad del examen microscópico directo, esta ha sido utilizada en orina, agua y suelo; la inmunoperoxidasa en sangre y orina. La inmuno histoquímica se ha aplicado para la detección de leptospiras en los tejidos.

## *Aislamiento De Leptospiras (Cultivo)*

El aislamiento es considerado el "estándar de oro" en el diagnóstico de leptospirosis. Para realizarlo se deben tomar las muestras de sangre al inicio de la sintomatología, una o dos gotas de sangre son inoculados en 10 ml de medio semisólido como el Fletcher, EMJH y Tween 80-albúmina con 5-fluorouracilo para evitar la contaminación bacteriana, incubados a 28-30°C en la oscuridad durante 5 a 6 semana. Las muestras de orina deben neutralizarse inmediatamente después de la toma, antes de inocularse al medio. El aislamiento es complicado, caro, técnicamente exigente, requiere tiempo de incubación prolongado (mínimo 1 mes antes de declarar una muestra negativa) y puede no ser exitosa (baja sensibilidad), requiere instalaciones "Bioseguridad nivel II".

## *Serología*

**Detección del antígeno.** La detección de antígenos de *leptospira* en material biológico ofrece mayor sensibilidad y especificidad que la microscopia por campo oscuro. La producción de anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos de *leptospira* ha permitido la utilización de diferentes técnicas para el diagnóstico, entre las cuales se encuentran Radioinmunoanálisis (RIA), inmunoensayo (ELISA), inmunoensayo quimioluminiscencia (CLIA), estas se han utilizado en sangre.

**Detección de anticuerpos.** La detección de anticuerpos es el método serológico más utilizado en el diagnóstico de leptospirosis. Los anticuerpos pueden ser detectados desde el día 6 al 10 del inicio de la enfermedad y generalmente alcanzan niveles pico dentro de la 3ra a 4ta semana. Los niveles de anticuerpos gradualmente disminuyen pero pueden permanecer detectables por años. Los métodos serológicos pueden dividirse en dos grupos: aquellos que son específico de género y los que son serogrupo específico. La prueba serológica ampliamente utilizada en la investigación de leptospirosis a nivel mundial sigue siendo la prueba de aglutinación microscópica (MAT)

## *Prueba de aglutinación microscópica (MAT).*

El MAT es considerado el método de referencia; consiste en hacer reaccionar sueros de pacientes sospechosos o enfermos con suspensiones de antígeno vivo de *leptospira* (serovares) con 6 a 8 días de crecimiento en medio líquido, para aumentar la sensibilidad de la prueba se recomienda utilizar un panel de los serovares más representativos de la región. Después de incubar, la reacción antígeno-anticuerpo es visualizada a través de la aglutinación en un microscopio de campo oscuro. El título final de anticuerpos se considera como la dilución más alta de suero que produce el 50% de la aglutinación (50% de leptospiras aglutinadas y 50% de leptospiras libres, con respecto al control), MAT detecta anticuerpos de clase IgM e IgG. Los puntos de corte utilizados en los laboratorios varían de una región a otra, sin embargo se ha considerado en caso de obtener una sola muestra, que títulos serológicos  $\geq 1:800$  confirman el diagnóstico. Los títulos comprendidos entre 1:50 y 1:800 deben ser interpretados en el marco de la situación clínico-epidemiológico del paciente. Al igual que otras pruebas serológicas, se requiere estudiar dos muestras pareadas de 7 a 14 días de intervalo entre la primera y la segunda muestra, si se observa seroconversión o un cambio en el título de al menos, cuatro veces el título inicial es considerado confirmativo. Existen estudios que



reportan una sensibilidad y especificidad de MAT hasta 92 % y 95 %, respectivamente, con un valor predictivo positivo de 95 % y negativo 100 %. A pesar de ser la prueba más recomendada y extendida, presenta una serie de desventajas: resulta difícil su estandarización ya que su valoración es subjetiva y requiere de la experiencia del observador, requiere el mantenimiento de cultivos de leptospiras y esto representa un riesgo laboral.

## Descripción de la técnica

### a) Reacción cualitativa

1. Para el diagnóstico serológico por la técnica de MAT se utiliza como punto de corte una dilución del suero de 1:100, de acuerdo a las recomendaciones efectuadas por la OMS y la OIE. Esta dilución se realizó para cada uno de los sueros en estudio, en tubos limpios y estériles utilizando como diluyente buffer de fosfatos (PBS) con un pH de 7.2. (Anexo).
2. Para llevar a cabo la técnica se utilizan placas de microaglutinación de 96 pozos. El suero problema es diluido 1:100 y se descomplementa a 56°C en el baño de maría durante 30 min, posteriormente se deposita un volumen de 50 ml de la dilución 1:100 del suero problema en los pozos de la placa y se ponen en contacto con un volumen de 50 ml de serovar y esto se efectúa con cada uno de los serovares de *Leptospiras* vivas utilizadas como antígenos.
3. Como antígeno se utiliza la especie patógena *Leptospira interrogans* y los siguientes serovares: *L. australis*, *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. cynopteri*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. wolffi*, *L. tarassovi*, *L. hardjo*, *L. autumnalis*, *L. grippotyphosa*, *L. pyrogenes*, *L. borincana*, *L. panama* serovares prevalentes de la región.
4. Simultáneamente a las muestras se corren controles positivos y negativos para cada serovar. El control negativo se realiza depositando 50 ml de PBS más 50 ml de cada serovar correspondiente, mientras que el control positivo se realiza depositando 50 ml de suero positivo más 50 ml de serovar al cual el suero es reactivo.
5. Posteriormente las placas se llevan a incubación a una temperatura de 28 °C dejándolas reaccionar por un lapso de 2 horas. Después de este tiempo se procede a realizar la lectura de las muestras. Con micropipetas y puntas estériles se deposita en un portaobjeto limpio 10 ml de control negativo, al igual que de control positivo y 10 ml de cada suero problema, y posteriormente se observan en el microscopio de campo oscuro en objetivo de 10 X (DM 1000 Leica) con el propósito de estimar el porcentaje promedio de células aglutinadas en el caso de reacción positiva.
6. El grado de aglutinación se determina con base a los siguientes parámetros de Myers:  
Negativo: sin aglutinación e idéntico al antígeno de control negativo.
  - + Aglutinación con 75 % de células libres.
  - ++ Aglutinación con 50 % de células libres.
  - +++ Aglutinación con 25 % de células libres.
  - ++++ Aglutinación con 0-25 % de células libres.



7. Los sueros que presentan reacción positiva a una dilución 1:100 con dos cruces o más de aglutinación (aglutinación de un 50 % o más de leptospiras) fueron considerados como positivos.

#### **b) Reacción cuantitativa**

1. En tubos estériles se realizan diluciones dobles del suero positivo con PBS para realizar la titulación del suero.
2. Se inicia con la dilución 1:200 y fueron ensayados contra él o los serovares correspondiente al cual fueron positivos
3. La determinación del título de anticuerpos, se considera la dilución más alta, en la cual se presenta la aglutinación.
4. En el caso de reacciones cruzadas se considera que el serovar infectante es el que presentó el título más alto.

#### **Ensayo inmunoenzimático (ELISA)**

Las deficiencias en MAT han permitido emplear al ELISA como una técnica alternativa en la detección de anticuerpos. En ELISA se puede detectar la IgM durante la primera semana de la enfermedad, lo que permite iniciar el tratamiento; y la detección tardía de IgG permite diferenciar infecciones recientes de pasadas. La detección de anticuerpos IgM con una sola muestra es considerada confirmatoria de una infección reciente. La técnica se considera más sensible que MAT, es fácil de estandarizar, los antígenos se pueden almacenar durante meses, no tiene ningún riesgo para los técnicos. Con los nuevas técnicas moleculares se ha implementado un ELISA utilizando antígenos recombinantes como LipL32, OmpL1, LipL41, Hsp58 y LipL36, indicando que rLipL32 puede ser un antígeno útil en el diagnóstico serológico de leptospirosis.

La falta de instalaciones para el aislamiento, realización del MAT o PCR, en los países en desarrollo ha permitido adoptar métodos diagnósticos simples y rápidos como los kits comerciales de ELISA para la detección de IgM que utilizan antígeno de la cepa patoc 1 *L. biflexa* (el inconveniente de esta prueba es que no puede evaluarse el serovar infectante), micro prueba de aglutinación cápsula (MCAT), LEPTO Dipstick, prueba de aglutinación macroscópica (SAT), ensayo de hemaglutinación indirecta (HAI) y el LEPTO Dri Dot, entre otros.

#### **Descripción de la técnica**

**1. Preparación del antígeno.-** Se utiliza la metodología de cultivo de Adler con modificaciones de Silva. Se utiliza la especie patógena *Leptospira interrogans* y los siguientes serovares: *L. australis*, *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. cynopteri*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. wolffi*, *L. tarassovi*, *L. hardjo*, *L. autumnalis*, *L. grippotyphosa*, *L. pyrogenes*, *L. borincana*, *L. ballum*, *L. panama* serovares prevalentes de la región. Para la producción de un cultivo en masa, cada serovar se cultiva en frascos (Wheaton de 500 ml) con medio Ellinghausen Mc Culloug Johnson and Harris (EMJH) (medio DIFCO™ *leptospira* Médium Base EMJH de BD) suplementado con medio de enriquecimiento ( Difco™ *leptospire* Enrichment EMJH) (Anexo), incubados en la estufa bacteriológica a 28°C por 7 días.

**2.- Lisis Celular.-** Se utiliza la metodología de Silva.<sup>23,24</sup> Después de los 7 días de incubación, los cultivos son centrifugados a 10, 000 g por 30 minutos a 4°C en centrifuga refrigerada



(GS-15R centrifuge de BECKMAN), el sedimento se resuspende en buffer fosfato salino PBS 0,02 M, pH 7,2 (Anexo) y se centrifuga como en el paso anterior, repitiendo el lavado dos veces más; el sedimento final se resuspende en 5 ml de PBS 0,02 M, pH 7,2. La lisis celular se realiza con sonicator (Ultrasonic Processa de Cole Parmer Instruments) a 0,8 mA y una frecuencia de 20 KHz durante tres minutos por tres ciclos manteniendo las muestras en hielo. Los antígenos sonicados de cada serovar se les determinan la concentración de proteínas por el método de Bradford (Anexo). Finalmente se realiza una mezcla de los antígenos sonicados de cada serovar con la misma concentración proteica, que se conserva en crioviales de 1,5 ml hasta su uso a  $-70^{\circ}\text{C}$ . (Ultracongelador Revco).

### 3.- Realización del ensayo.

A cada pozo de la placa de poliestireno fondo plano (F8 Maxisorp Nunc-Inmuno Module):

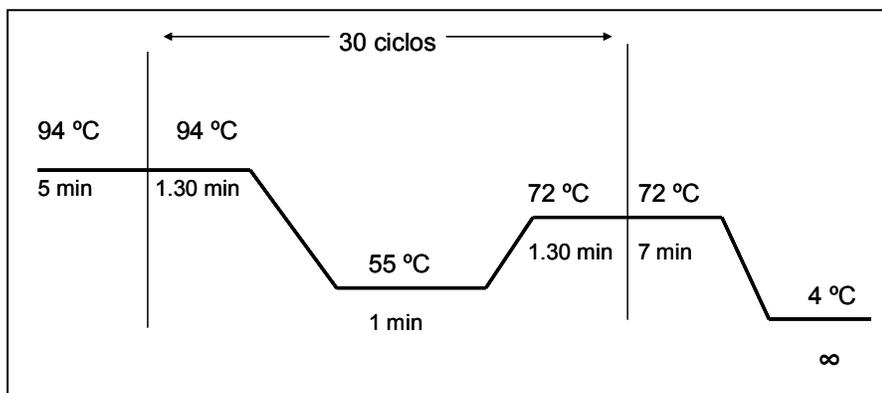
- a.- Se le agrega 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla del antígeno sonicado (10mg/ml) diluido en buffer de carbonatos pH 9.6. (Anexo)
- b.- La placa se incuba a  $4^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en cámara húmeda.
- c.- Posteriormente el antígeno en exceso se remueve cuidadosamente, para no alterar la capa adherida; la placa se lava tres veces durante 3 min. con solución de lavado PBS-Tween-20 (PBS-T). (Anexo)
- d.- Se agrega 200  $\mu\text{L}$  de la solución de bloqueo (PBS-T-BSA 2%) con el fin de recubrir con proteína no relevante las partes de los pozos que no hubiesen sido cubiertas con el antígeno y evitar la adherencia de moléculas inespecíficas de proteínas del suero.
- e.- Se vuelve a incubar por una hora a  $37^{\circ}\text{C}$  y nuevamente se lava 3 veces x 3min con PBST.
- f.- Los sueros humanos son diluidos 1:400 en PBS-T. Se agrega 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución a los pozos, incubándolo por 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda; al término de este tiempo se decanta, por sacudida vigorosa de la placa y se lava de nuevo 3 veces como en el paso 3, para remover los componentes del suero que no reaccionaron.
- g.- Posteriormente, se agrega 100  $\mu\text{l}$  de conjugado antihumano IgM-peroxidasa (u- chain specific peroxidase conjugate sigma) diluido 1:10,000 adecuadamente en PBS-T, se incuba por 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , se lava nuevamente.
- h.- Se agrega 100  $\mu\text{l}$  de la solución cromógena para peroxidasa o-fenilenediamina (OPD) (SIGMA) y nuevamente se incuba por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda y en oscuridad.
- i.- Para detener la reacción enzimática se agrega 50  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 2.5M.
- J.- Finalmente la lectura se realiza en un lector de microplacas (ELISA Lx 800 BIOTEC) a una densidad óptica de 490 nm.

4.- **Punto de corte.**- Se determina con la media aritmética de la densidad óptica (D.O) de 40 sueros humanos sin sintomatología presuntiva a leptospirosis 3 meses atrás (donadores sanos) y con la técnica MAT negativa, y 10 sueros confirmados como dengue positivos (Dengue Elisa IgM), a la media aritmética de estos 50 sueros se les suma  $\pm 3$  desviaciones estándar (D.E)



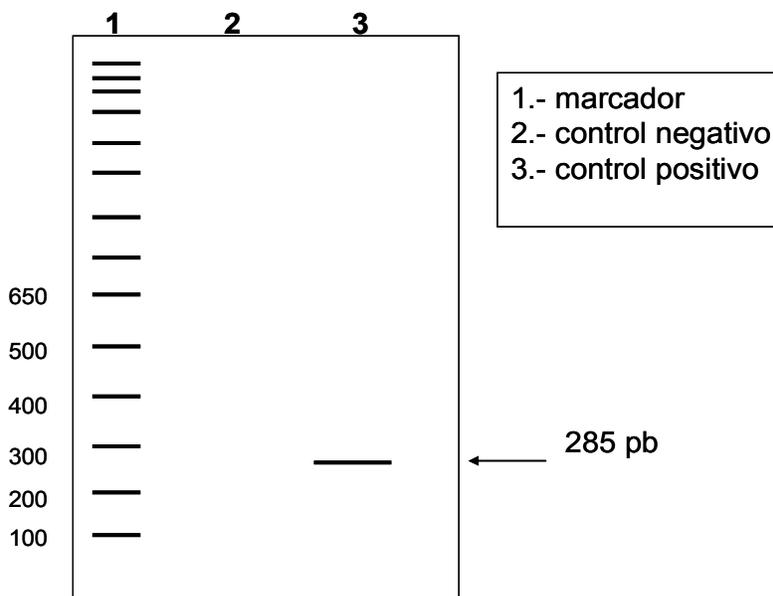
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	5 µl (2.5mM)
dNTPs (10mM)	1 µl (200 µM)
G1 20 µM	1 µl (0.4 µM)
G2 20 µM	1 µl (0.4 µM)
Taq Master	5 µl (0.05 UI)
ADN Templado	100 ng
cbp 50 µl de agua estéril.	

Las condiciones de ciclado del PCR son las siguientes:



Al termino del ciclado de las muestras se procede a la corrida de los productos de PCR empleando un gel de agarosa al 1.5% y se tiñe con bromuro de etidium.

Posteriormente se observa el gel en un transiluminador con luz UV para que el bromuro de etidium que ya se incorporó entras las bases nitrogenadas del ADN obtenido se excite y emita una fluorescencia y se debe de observar un amplificado 285 pb.



## CONCLUSIÓN

En el diagnóstico de leptospirosis existe la necesidad de contar con métodos validados que sean rápidos y sensibles para ser utilizados ampliamente, sobre todo en la fase aguda de la enfermedad con el fin de iniciar la terapia antibiótica. Los estudios de investigación epidemiológicos realizados en la Unidad Interinstitucional Investigación Clínica y Epidemiológica UIICE de la Facultad de Medicina estudiando de manera integral la enfermedad, se utiliza MAT tanto en humanos como animales considerando títulos  $\geq 1:100$  con valor epidemiológico, los títulos  $\geq 800$  en una sola muestra con cuadro clínico y datos epidemiológicos como caso confirmado. En estas investigaciones se han estandarizado ELISA IgM e IgG en humanos y animales utilizando antígenos sonicados de serovares prevalentes en la región. Se ha estandarizado la Aglutinación Macroscópica (SAT) para diagnóstico en perros. También se ha utilizado PCR con los primer G1 y G2 para muestras humanas y Lepat1-Lepat2 para la detección de *L. interrogans* en muestras de agua. Es importante recalcar que los médicos no consideran esta enfermedad en el diagnóstico diferencial de cuadros febriles, es por esto que, se debe considerar la homogenización de criterios en el diagnóstico clínico y de laboratorio con el fin de conocer la magnitud e impacto de la enfermedad en el estado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1 Acha, P.N.; Szyfres, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3ª ed.; Organización Panamericana de la Salud: Washington, **2001**; pp.175-186.
- 2 Adler, B.; Murphy, M. A.; Locarnini, S.A.; Faine, S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulin M and G in human serum by Solid Phase Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol*, **1980**, *11*, 452
- 3 Cumberland, P.; Everard, C.O.; Levett, P.N. Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *61*,5,731-734
- 4 De la Rosa JL. Zoonosis. Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 1ª ed. México DF:InDRE; 2000. p.63.
- 5 Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. 1999 2nd, ed. Melbourne, Australia: MedSci.
- 6 Farr, R.W. Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*. **2001**, *21*, 1-8.
- 7 Jimenez-Coello M, Vado-Solis I, Cárdenas-Marrufo MF, Rodríguez-Buenfil J, Ortega-Pacheco A. Serological survey of canine leptospirosis in the tropics of Yucatan Mexico using two different test. *Acta Tropica* **2008**, *106* (1):22-26.
- 8 Levett P.N. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* **2001**, *14*, 296-326.
- 9 Levett, P.N.; Branco, S. Evaluation of two enzymelinked immunosorbente assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med Hyg.* **2002**, *66*,6, 745-748.
- 10 Plank, R.; Dean, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and Pathogenesis of *Leptospira spp.* in humans. *Microbes and infection.* **2000**, *2*,1265-1276.
- 11 -Silva, M. D.; Camargo, E.D.; Souza, A. M.; Chieffi, P.P.; Sakata, E.E. Immunodiagnóstico da leptospirose humana a través do teste Elisa-IgM, empregando diferentes preparacoes antigénicas a partir de serotipos prevalentes de leptospira interrogans. *Rev. Med Trop.* Sao Paulo **1990**, *32*,233-239.



- 12 Silva, M. V.; Camargo, E. D.; Souza, A. M.; Ueda, M.; & Sakata, E.E. Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe IgM na leptospirose humana. *Rev. Ins. Med. Trop. Sao Paulo*. **1988**, *30*, 95-100.
- 13 Vado Solís I, Cárdenas Marrufo MF., Jiménez Delgadillo B., Alzina López A., Laviada Molina H., Suárez Solís V., Zavala Velázquez J. Clinical epidemiological study of Leptospirosis in human and reservoirs in Yucatán, México. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **2002**,*44*(6):335-340.
- 14 Vado, I.; Cárdenas, M.F.; Laviada, H.; Vargas, F.; Jiménez, B.; Zavala, J. Estudio de casos clínicos e incidencia de Leptospirosis humana en el Estado de Yucatán, México durante el período 1998 a 2000. *Rev. Biomed*. **2002**,*13*, 157-164.
- 15 Vanasco N, Lollersberguetr J, Schmeling M, Gardner T. Diagnóstico de leptospirosis: Evaluación de un enzimoimmunoensayo en fase sólida en diferentes etapas de la enfermedad. *Revista Panamericana de Salud Pública*. **2007**, *21*,6, 388-395
- 16 Vinetz J.M. Leptospirosis. *Curr Opin Infec Dis*. **2001**, *14*,527-538.
- 17 Zavala-Velazquez, J.; Cárdenas-Marrufo, M.; Vado-Solís, I., Cetina-Cámara, M.; Cano-Tur, J.; Laviada-Molina, H. Hemorrhagic pulmonary leptospirosis: Three cases from the Yucatan Península, México. *Rev Soc Bras Med Trop* **2008**, *41*(4):404-408.



## ANEXO I

### **Medio Base EMJH Leptospira**

#### **Reactivo**

Medio EMJH DIFCO™ *leptospira* Médium Base EMJH de BD

#### **Elaboración**

- Disolver 2.3 gr en 900 mL de agua destilada o desionizada
- Esterilizar a 15 lb por 20 minutos
- Asépticamente adherir 100mL Bacto leptospira enriquecido EMJH a temperatura ambiente.
- pH final 7.5 +/- 0.2 a 25 °C

### **Medio de Korthof**

#### **Reactivos**

- |   |         |
|---|---------|
| - Bactopeptona                                      | 0.8 gr  |
| - NaCl  | 1.4 gr  |
| - Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>                  | 0.02 gr |
| - KCl   | 0.04 gr |
| -CaCl <sub>2</sub> (hidratado)                      | 0.04 gr |
| -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 0.88 gr |

#### **Elaboración:**

- Disolver todos los reactivos en un litro de agua destilada.
- Calentar a ebullición durante 20 minutos.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Meter el medio en refrigeración durante un día.
- Filtrar con papel Whatman N° 1.
- Poner 9 ml del medio filtrado en tubos con tapa de rosca.
- Esterilizar en autoclave a 15 libras durante 15 minutos.
- Adicionar cada tubo con 1 ml de suero de conejo descomplementado a 56°C.
- Para prepara el medio semisólido se agrega al medio base 0.1 o 0.2 % de agar y se realiza todo lo anteriormente indicado.

### **Buffer de Fosfatos pH 7.2 (PBS)**

#### **Reactivos**

- |                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| - NaCl                             | 9gr.    |
| - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0.144gr |
| - Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.430gr |

#### **Elaboración**

Se disuelven los reactivos en un litro de agua destilada, procurando que la solución tenga un pH de 7.2



## DIAGNOSTICO MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis*

QFB Juan José Arias León, Dra. Bertha Jiménez Delgadillo

### OBJETIVO:

Identificación de la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras biológicas (Expectoración, Sangre, Orina, Jugo Gástrico, LCR, Biopsia) empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Identificación molecular de la drogorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a fármacos de primera línea mediante la identificación de mutaciones puntuales en genes asociados a resistencia

### INTRODUCCION

El diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis (TB) se realiza habitualmente mediante la visualización de los bacilos ácido-alcohol resistentes de las muestras sometidas a una tinción de Ziehl Neelsen y/o mediante el cultivo de las mismas en medios adecuados. El método del cultivo presenta una alta sensibilidad y especificidad, requiriéndose ocho semanas de incubación. Sin embargo la utilización de esta metodología presenta el inconveniente de ser muy tardadas para poder obtener un resultado definitivo.

Las técnicas de amplificación genómica presentan una alta sensibilidad y especificidad, así como rapidez en su realización, constituyendo una alternativa diagnóstica de las pruebas tradicionalmente utilizadas para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Para estas técnicas moleculares se realiza la amplificación de un gen conservado (*gyrB*) presente en todas las especies del género *Mycobacterium* y posteriormente se realiza una hibridación con una sonda específica para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Por otra parte, en toda población bacilar se encuentran normalmente mycobacterias mutantes, es decir, presentan resistencia a los diferentes antituberculosos. Esta situación es propiciada por el incumplimiento del paciente al tratamiento completo al mejorar su sintomatología, por pautas terapéuticas dictadas por el personal sanitario erróneas, o por la iniciación tardía de una terapia efectiva. Esto lleva a la aparición de mutaciones genómicas particulares en genes específicos del bacilo de la tuberculosis, ya sea por sustitución de nucleótidos, inserciones o deleciones en genes blanco, en regiones específicas o en sus promotores, que alteran las moléculas blanco de la droga o bien, la neutralizan por sobreproducción del blanco.

Las pruebas microbiológicas convencionales de susceptibilidad a antibióticos requieren periodos largos para completarse dado el lento crecimiento de *Mtb*. Con las actuales técnicas para determinar la resistencia a drogas a partir del cultivo de *Mtb*, los resultados de susceptibilidad a fármacos se obtienen en tres, cuatro o hasta más semanas. Se han desarrollado sistemas de cultivos automatizados modernos, que ha podido disminuir el tiempo de detección de crecimiento del bacilo y por tanto acortan el tiempo de la determinación de susceptibilidad a fármacos. Sin embargo, son sistemas sofisticados y de insumos caros que limitan su uso en muchos laboratorios. Es por ello que el desarrollo de métodos para la rápida identificación de la resistencia a fármacos, es un reto importante para asegurar una terapia



adecuada y rápida, y limitar la diseminación de cepas MDR, lo que generara un apoyo para el monitoreo y control de la tuberculosis.

El desarrollo de métodos moleculares enfocado en la detección de la frecuencia de polimorfismos de un solo nucleótido, SNP (del inglés, Single Nucleotide Polymorphisms) en los genes específicos blanco involucrados en resistencia a fármacos (6) y el desarrollo del conocimiento de las bases moleculares de resistencia en *Mbt*, ha hecho posible proponer la aplicación de métodos moleculares alternativos para la determinación de la drogo resistencia.

## TÉCNICAS DE LABORATORIO

---

### ***Inactivación y Clarificado de Muestras Biológicas***

A partir de muestras de **expectoración, jugo Gástrico o líquido cefalorraquídeo (LCR)**, se toman 5 ml de la muestra biológica (expectoración, Jugo Gástrico, y LCR) y se le adiciona 2ml de solución salina, se mezcla en vortex por 30 seg, se incuba la muestra por 10 min a 90 °C, posteriormente se le adiciona 100 µl de NaOH al 4%, se mezcla por inversión y se deja a temperatura ambiente por 10 min. Seguidamente se centrifuga a 14,000 rpm por 15min, se decanta el sobrenadante y al pellet se le añade 200 µl de buffer de lisis (1M NaCl, 1M Tris- HCl, 0.25M EDTA pH 8, 10% SDS), 40 µl de NaOH al 4%, 10µl de proteinasa K (10mg/ml) y se incubó por 2 hr a 56°C.

Continuar en el paso 6 del protocolo de extracción ADN por Fenol/cloroformo.

### ***Extracción de ADN por Fenol- Cloroformo: Sangre, Orina y Biopsia***

---

1. Tomar 2 ml (ó 100 mg de biopsia macerada) de la muestra Biológica y adicionar 400 µl de buffer de lisis para glóbulos rojos (RCBL) e incubar por 5 min a temperatura ambiente.
2. centrifugar 1 min a 14,000 rpm, decantar el sobrenadante
3. Adicionar 400 µl de buffer de lisis para glóbulos blancos (WCLB) e incubar por 5 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar 1 min a 14,000 rpm, decantar el sobrenadante
5. Agregar al pellet 10 µl de Proteinasa K (20mg/ml), incubar a baño maría a 56 °C toda la noche o al menos 4 horas.
6. Añadir 400 µl de fenol/cloroformo /alcohol isoamilico (25:24:1).
7. Vortex y centrifugar a 14,000 rpm x 2 mint.
8. Tomar la capa de arriba y colocar en un tubo nuevo sin tomar la intermedia.
9. Repetir el paso anterior 2 veces.
10. Agregar 200 µl cloroformo al sobrenadante.
11. Vortex y centrifugar a 14,000 rpm x 2 mint.
12. Remover la capa de arriba y colocar en un tubo nuevo sin tomar la intermedia.
13. Añadir 40 µl de Cloruro de litio 8M y adicionar 2 volúmenes (800 µl) de etanol Absoluto
14. Colocar la muestra a – 80 °C x 15 mint o 20 °C toda la noche.
15. Centrifugar x 30 mint a 14,000 rpm a 4°C.
16. Descartar el sobrenadante y dejar secar la pastilla y resuspender con 100 µl de agua estéril.

### Amplificación mediante PCR específico para tuberculosis

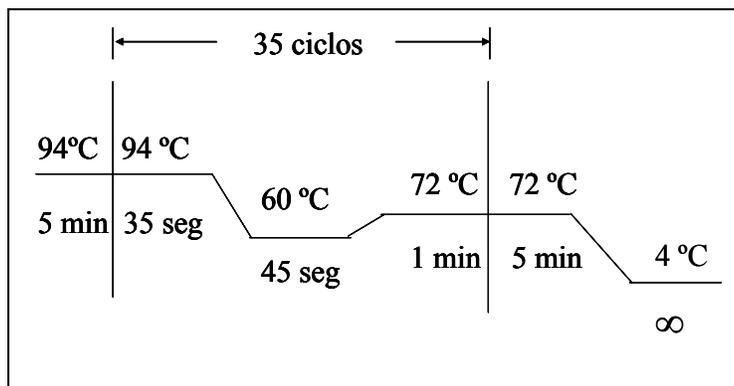
Para la identificación del género, una vez obtenido el ADN de nuestro paciente se procede a realizar un PCR dirigido a amplificar una región del gen *GyrB* presente en el Genoma de las bacterias del género *Mycobacterium* empleando los primers:

KY18 5'-CACATGCCAAGTCGAACGGAAAGG-3',  
KY75 5'-GCCCCGTATCGCCCGCACGCTCACA-3'.

#### Condiciones de PCR

Buffer 10X ..... 5 µl  
MgCl<sub>2</sub> (50mM) .....2.5 µl (2.5mM)  
dNTPs (10mM),.....1 µl (200 µM)  
KY18 20 µM .....1 µl (0.4 µM)  
KY75 20 µM .....1 µl (0.4 µM)  
Taq Master. ....5 µl (0.05 UI)  
ADN Templado.....100 ng  
Cbp 50 µl de agua estéril.

Las condiciones de ciclado del PCR son las siguientes:



Al término del ciclado de las muestras se procede a la corrida de los productos de PCR empleando un gel de agarosa al 1.5% y se tiñe con bromuro de etidium.

Posteriormente se observa el gel en un transiluminador con luz UV para que el bromuro de etidium, que ya se incorporó entre las bases nitrogenadas del ADN se excite y emita una fluorescencia con lo cual se debe de observar un amplificado 482 pb.

### Identificación molecular de genes asociados a la resistencias a antifímicos empleados en tuberculosis.

Para determinar las resistencias asociadas a los tres antifímicos (Rifampicina, isoniacida y etambutol) se emplearon técnicas derivadas de PCR.

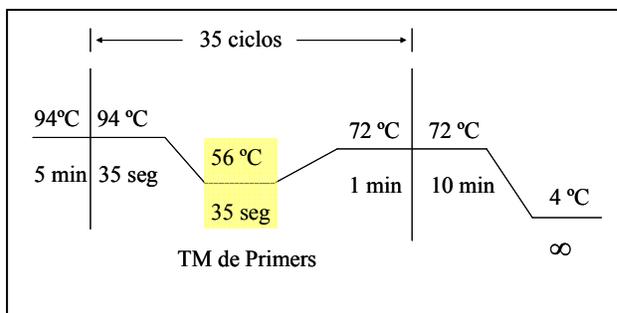
### **Detección molecular de resistencia a Rifampicina (RIF)**

**Descripción de la técnica.** Se emplea la Amplificación Refractaria de Sistema de Mutaciones (ARMS-PCR) para los alelos 516, 526 y 531 mismas que están reportadas por diversos autores, para lo cual se emplean los primers control que amplifican una región del gen *rpoB* CPF-kat 5'-CGAATATCTGGTCCGCTTGC-3' y CPR-kat 5'-TGCGACCACCTTGCGGTACG-3' así como también los primers dirigidos a encontrar la mutación ARMS-516 5'-CAGCTGAGCCAATTCACGGA-3', ARMS-526 5'-CGCTGTCTGGGGTTGTCCC-3' y ARMS 531 5'-ACCCACAAGCGCCGACAGTC-3'.

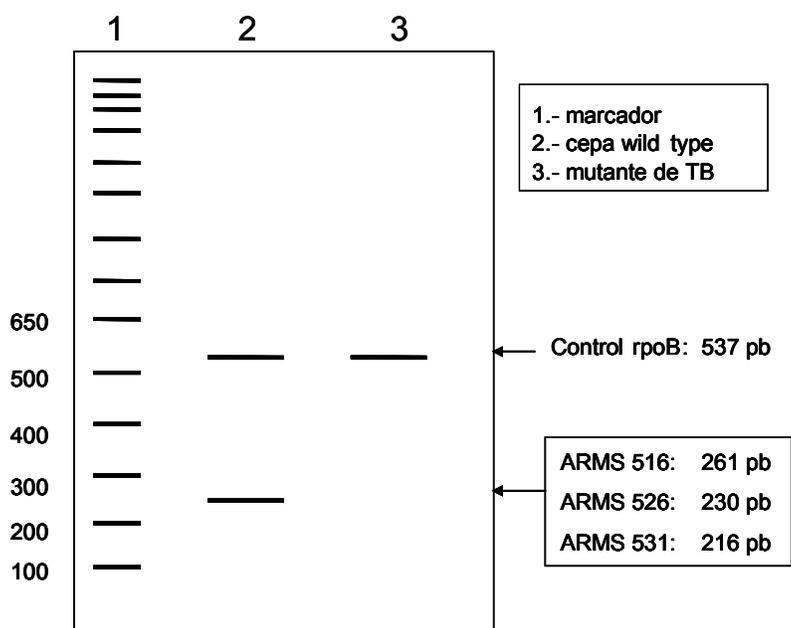
La reacción de PCR es la siguiente:

Buffer 10X ..... .5 µl  
MgCl<sub>2</sub> (50mM) .....2.5 µl (2.5mM)  
dNTPs (10mM),.....1 µl (200 µM)  
CPFkat 20 µM .....1 µl (0.4 µM)  
CPRkat 20 µM .....1 µl (0.4 µM)  
ARMS-(516, 526, 531) 20 µM .....1 µl (0.4 µM)  
Taq Master. ....5 µl (0.05 UI)  
ADN Templado.....100 ng  
Cbp 50 µl de agua estéril.

Las condiciones de ciclado del PCR son las siguientes:



La presencia de 2 productos de PCR (control de *rpoB* y cualquiera de los AMRS en su caso) denota la presencia de una cepa wild-type, cabe mencionar que solo la presencia del producto específico positivo para el control interno (*rpoB*) nos indica una cepa mutante de TB para rifampicina.



Esquema del Gel de agarosa al 1.5 % del ARMS-PCR para Rifampicina

### Detección molecular de resistència a Isoniasida (INH)

**Descripción de la técnica.** Para determinar la resistencia a Isoniacida en el gen *katG* se realizó por medio de Multiplex Alelo Especifico (MAS-PCR) en donde los primer estan diseñados para detectar el cambio AGC → ACC en el alelo *katG315* empleando los primers control que amplifican una región del gen *katG*, *katGOF* 5'-GCAGATGGGGCTGATCTACG-3' y *katg4R* 5'- AACGGGTCCGGGATGGTG-3' y un tercer primer dirigido a encontrar la mutación *kat5R* 5'-ATACGACCTCGATGCCGC-3' ver figura 1.

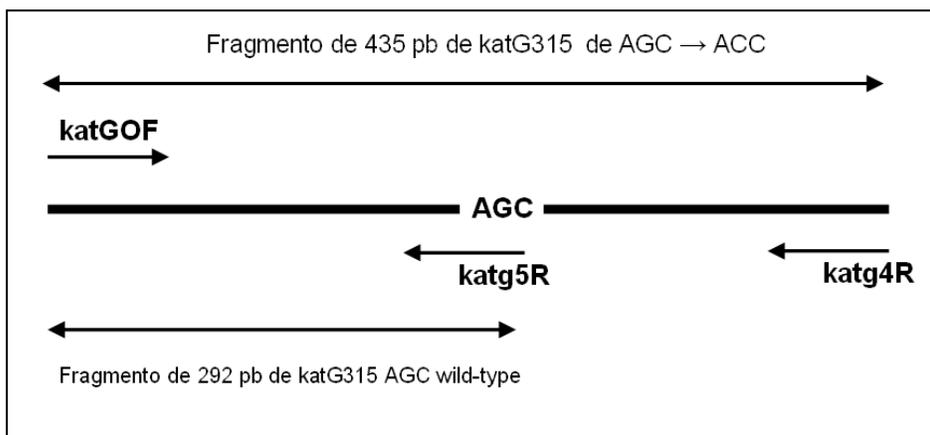


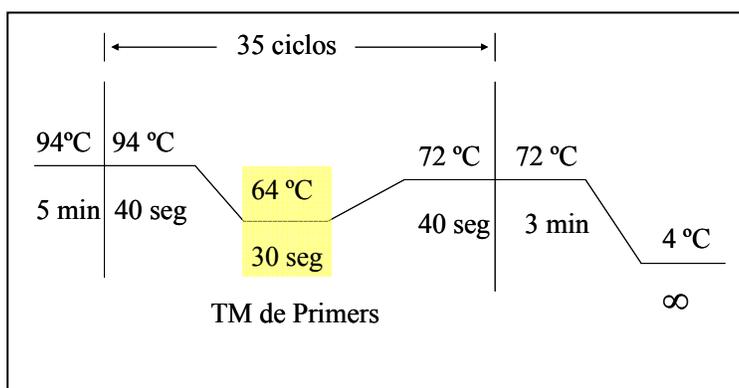
Fig 1. Esquema de los fragmentos esperados por MAS-PCR del gen *katG* empleando los primers *katGOF*, *katg4R*, *katg5R*.



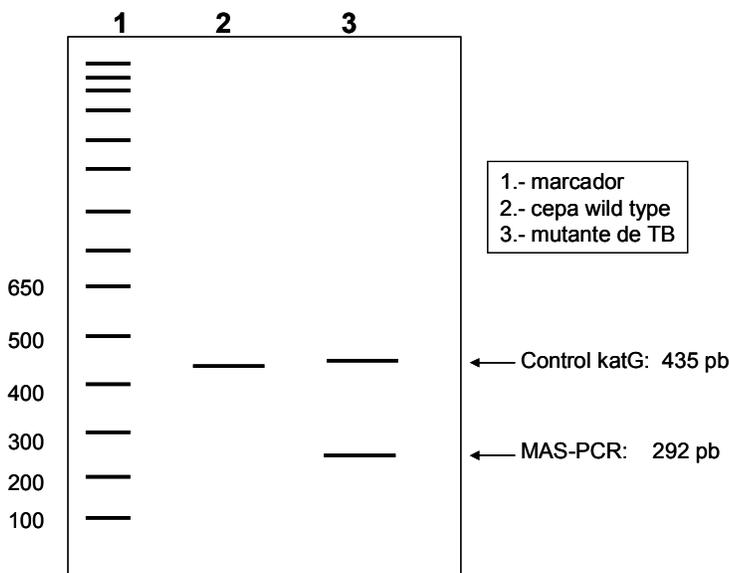
La reacción de PCR es la siguiente:

Buffer 10X ..... 5 µl  
 MgCl<sub>2</sub> (50mM) .....2.5 µl (2.5mM)  
 dNTPs (10mM),.....1 µl (200 µM)  
 katGOF 20 µM .....1 µl (0.4 µM)  
 katg4R 20 µM .....1 µl (0.4 µM)  
 katg5R 20 µM.....1 µl (0.4 µM)  
 Taq Master. ....5 µl (0.05 UI)  
 ADN Templado.....100 ng  
 Cbp 50 µl de agua estéril.

Las condiciones de ciclado del PCR son las siguientes:



La presencia del producto específico positivo para el control interno (*katG*) con un tamaño de 435 pb denota la presencia de una cepa wild- type, y por el contrario la presencia de dos productos de PCR de 435 pb y de 292 pb denota la presencia de una cepa mutante de TB.



Esquema del Gel de agarosa al 1.5 % del MAS-PCR para Isoniacida

### Detección molecular de resistencia a Etambutol (ETB)

Para determinar la resistencia a Etambutol se realiza por medio de Multiplex Alelo Específico (MAS-PCR) en donde los primers están diseñados para detectar cambios en la primera o en la tercera base ATG → ATH (A, C, T) y de ATG → BTG (G, C, T) en el alelo del gen *Emb306* empleando los primers control que amplifican una región del gen *Emb*, Emb1F 5'-GGGCGGGGCTCAATTGCC-3' y Emb2R 5'-GCGCATCCACAGACTGGCGTC-3' y dos primers dirigidos a encontrar los cambios en el alelo Emb306 Emb306A 5'-GACGACGGCTACATCCTGGGCA-3' y el Emb306B 5'-GGTCGGCGACTCGGGCC-3' ver figura 2. La presencia de tres productos de PCR de 324pb, de 210 pb y de 160 pb denota la presencia de una cepa wild-type y la obtención de dos productos amplificados ya sea la de 324 y de una de las otras dos restantes con ausencia de una de ellas que nos denota la presencia de una cepa mutante.

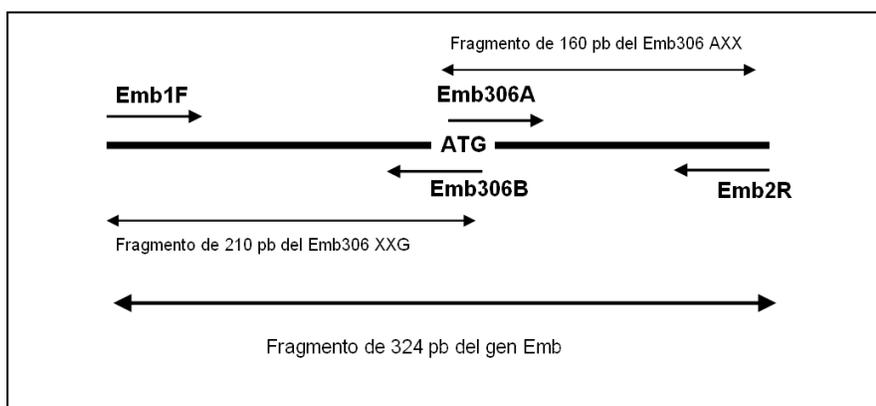
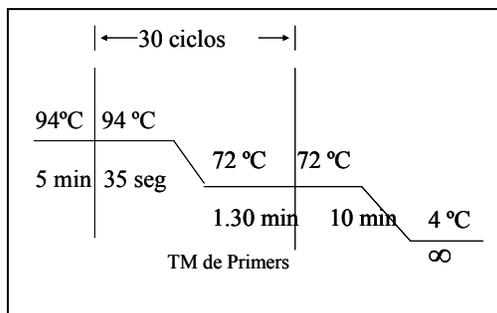


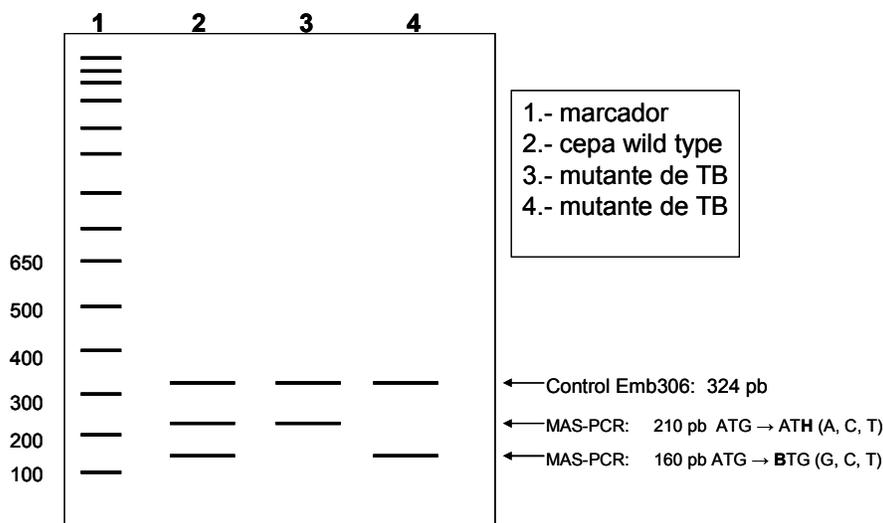
Fig 2. Esquema de los fragmentos esperados por MAS-PCR del gen *Emb* empleando los primers Emb1F, Emb2R, Emb306A y Emb306B, las flechas indican los productos de PCR específicos esperados y la ausencia de la mutación respectiva. La X representa cualquiera de las bases (A, T, C o G)

La reacción de PCR es la siguiente:

Buffer 10X ..... 5 µl  
MgCl<sub>2</sub> (50mM) .....2.5 µl (2.5mM)  
dNTPs (10mM),.....1 µl (200 µM)  
Emb1F 20 µM .....1 µl (50 pmol)  
Emb2R 20 µM .....1 µl (50 pmol)  
Emb306A 20 µM.....1 µl (50 pmol)  
Emb306B 20 µM.....1 µl (50 pmol)  
Taq Master. ....5 µl (0.05 UI)  
ADN Templado.....100 ng  
Cbp 50 µl de agua estéril.

Las condiciones de ciclado del PCR son las siguientes:





Esquema del Gel de agarosa al 1.5 % del MAS-PCR para Etambutol

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vincent J. Tevere, Meter L. Hewitt, Allen Dare, Meter Hocknell, Anne Keen, Joanne P. Spadoro and Karen K.Y. Young. Detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR Amplification with Pan-Mycobacterium Primers and Hybridization to an M. tuberculosis-Specific Probe. *Journal of Clinical Microbiology*. Apr 1996 p.918-923
2. Xiao-Yong Fan, Zhong-Yi Hu, Fan-Hong Xu, Zhi-Qiang Yan, Sheng-Qi Guo, and Zhong-Ming Li. Rapid Detection of rpoB Gene Mutations in Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in Shanghai by Using the Amplification Refractory Mutation System. *Journal of Clinical Microbiology*, Mar. 2003, p. 993–997
3. Igor Mokrousov, Tatiana Otten, Maxim Filipenko, Anna Vyazovaya, Augeny Chrapov, Elena Limeschenko, Lidia Steklova, Boris Vyshnevskiy and Olga Narvskaya. Detection of Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains by Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting katG Codon 315 Variation. *Journal of Clinical Microbiology* July 2002, p 2509-2512
4. Igor Mokrousov, Olga Narvskaya, Elena Limeschenko, Tatiana Otten, and Boris Vyshnevskiy. Detection of Ethambutol-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains by Multiplex Allele-Specific PCR Assay Targeting embB306 Mutations. *Journal of Clinical Microbiology* May 2002, p. 1617–1720

## DIAGNOSTICO DE RICKETTSIA

M en C Gaspar Peniche Lara y Eduardo Sulub Uicab

### OBJETIVO

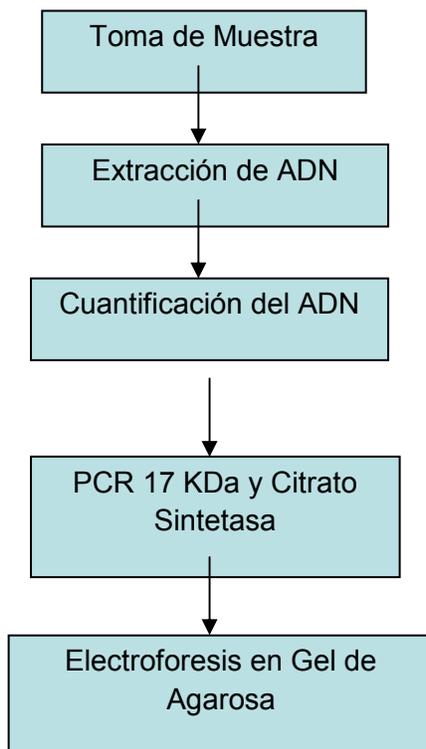
Identificar genoma rickettsial presente en paciente con sospecha de infección con Rickettsia.

### TECNICA DE LABORATORIO

**Descripción de la prueba.** La prueba consiste en la identificación de genoma rickettsial utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa así como electroforesis en gel de agarosa.

El protocolo comprende la purificación del Ácido Desoxiribonucleico (ADN) por medio de un kit comercial de extracción de ADN seguido de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, que amplifica de una región específica del genoma rickettsial de 17 kDa así como también una región del gen rickettsial de citrato sintetasa. Una vez terminada la PCR, los productos son visualizados por electroforesis en gel de agarosa, en un transluminador de luz ultravioleta.

#### DIAGRAMA DE FLUJO



## MATERIAL

- Micropipetas
- Tubo eppendorf de 1.5mL
- Microcentrífuga
- Baño maría

## REACTIVOS

- Sangre Humana
- Kit comercial de extracción de ADN: ADN tissue kit (Quiagen). Figura 1

### *Aislamiento Del ADN A Partir De Sangre*

---

1. Obtener 5 ml de sangre periférica en un tubo vacutainer con EDTA.
2. Centrifugar 10 minutos a 2500 rpm.
3. Transferir la capa de leucocitos a un tubo estéril de 1.5 ml.
4. Agregar a la muestra en el tubo 20µL de proteinasa K
5. Agregar al tubo de 1.5mL, 100 µL de PBS
6. Agregar al tubo de 1.5mL, 200 µL de buffer de lisis
7. Agitar vigorosamente
8. Incubar la muestra a 70°C por 10 minutos
9. Agregar 200 µL de Etanol absoluto
10. Colocar la muestra en la columna de purificación
11. Centrifugar por 1 minuto a 8,000rpm
12. Cambiar el tubo colector
13. Agregar 500 µL de buffer de lavado 1
14. Centrifugar por 1 minuto a 8,000rpm
15. Cambiar el tubo colector
16. Agregar 500 µL de buffer de lavado 2
17. Centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad
18. Colocar la columna en un tubo limpio de 1,5ml
19. Agregar 100 µL de buffer de elusión
20. Incubar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos
21. Centrifugar la muestra por 1 minuto a 8,000rpm
22. Desechar la columna de purificación
23. La muestra ya está lista para trabajar, marcar el tubo con la clave asignada al paciente y guardar en el refrigerador entre 2 y 4° C.
24. Cuantificar el ADN utilizando el espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Determinar la pureza calculando la relación  $DO_{260}/280$ . Si el valor calculado es de 1.7 o superior, indica una buena pureza, los valores inferiores indican una contaminación por sales o proteínas.

1 unidad de  $DO_{260}$  = 50 ng/ ml

Concentración ADN = ( $DO_{260}$ ) (Factor de dilución) (50 ng/ml)

Figura 1. Kit comercial de extracción ADN



## **Amplificación mediante PCR específico para rickettsias**

### **1. Amplificación del gene de la proteína de 17 KDa.**

Se realizara un PCR utilizando un par de oligonucleótidos (primers) que amplifican una región de aproximadamente 434 pb del gen rickettsial que codifica para la proteína de 17 KDa común para todas las especies de *Rickettsias*. (Fw 1: 5'-GCTCTTGCAACTTCTATGTT-3' y Rv 2: 5'-CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG-3')

Se tomaran aproximadamente 150 ng de ADN purificado y cuantificado y se adicionara un volumen de 0.3 µl de Platinum® Taq ADN Polimerasa (Invitrogen) los cuales contendrán 1.5 unidades de enzima; se adicionara 5 µl del reactivo incluido con la Taq llamado 10XPCR para obtener una concentración final de 1x, 1.5 µl de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, para obtener una concentración final de 1.5 mM, 1 µl de mezcla de Nucleótidos 10 mM y 0.5 µl de cada cebador (primer) cuyas concentraciones iniciales son de 10 µl y en la mezcla será de 0.2 µM; se adicionara agua estéril hasta llegar a un volumen final de 50 µl. la reacción se correrá con un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C durante 5 minutos seguidos de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos para desnaturalización, 58°C por 45 segundos para alineamiento y 72°C por 60 segundos para la extensión. Al término de estos 35 ciclos se realizó un ciclo de extensión final a a72°C durante 7 minutos. Las condiciones de ciclado de PCR fueron ejecutados en un Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400.

### **2. Amplificación del gene de la proteína CITRATO SINTETASA.**

A las muestras se les realizara una PCR para amplificar una región del gel de citrato sintetasa de aproximadamente 320 pb, el cual es común para todas las especies de *Rickettsias*. Para ello se utilizaran los cebadores: RpCs.877p 5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3' y RpCs.1258n 5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA-3'

Para la mezcla de la reacción se emplearan aproximadamente 150 ng de ADN purificado y cuantificado y se adicionara un volumen de 0.3 µl de Platinum® Taq ADN Polimerasa

(Invitrogen) los cuales contendrán 1.5 unidades de enzima; se adicionara 5  $\mu\text{l}$  del reactivo incluido con la Taq llamado 10xPCR buffer para obtener una concentración final de 1x, 1.5  $\mu\text{l}$  de 50 mM  $\text{MgCl}_2$  (también incluido) para obtener una concentración final de 1.5 mM, 1  $\mu\text{l}$  de mezcla de oligonucleótidos 10 mM y 0.5  $\mu\text{l}$  de cada cebador (primer) cuyas concentraciones iniciales son de 10 Mm y en la mezcla fue de 0.2  $\mu\text{M}$ ; se adiciono agua esteril hasta llegar a un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Las condiciones para la PCR fueron: Un ciclo de de desnaturalización inicial de 95°C por un minuto; 35 ciclos a 95°C por 20 segundos para desnaturalización, 48°C por 30 segundos para alineamiento y 60°C por 2 minutos para extensión; al termino de este, le siguió un ciclo de extensión final de 72°C por 3 minutos. Las condiciones de ciclado de PCR fueron ejecutados en un Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400.

### **CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS.**

A cada una de las pruebas se adicionaran un control negativo, el cual consistirá en hacer una reacción con las concentraciones mencionadas para cada prueba, con la excepción de que en lugar de ADN se adicionará agua; un control positivo, el cual consistirá en hacer una reacción adicionando en vez de la muestra de ADN, una muestra de ADN rickettsial conocido que se tiene en el laboratorio, en este caso *R. prowasekii*.

### **ELECTROFORESIS**

Se tomaran 10  $\mu\text{l}$  de producto amplificado y se resolverán por electroforesis en gel de agarosa al 1.5x en TAE (Tris-Acetato-EDTA) al 1%.

El gel se teñirá con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 mg/ml y se observara un trasuminador de luz ultravioleta. El marcador de peso molecular que se utilizara será el 100 pbs (Biolabs).



## MÉTODO DE DIAGNOSTICO DE *Toxoplasma gondii* POR PCR.

Dr. Víctor Suárez Solís

### INTRODUCCION

### TECNICAS DE LABORATORIO

#### ***Aislamiento del ADN de Toxoplasma gondii a partir de tejido placentario (fijado).***

En el caso de los tejidos, se adiciona un fragmento de 25 mg de tejido a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. El tejido se lava con etanol absoluto en dos ocasiones, durante 5 minutos, retirado por pipeteo y evaporación final a 37°C durante 15 minutos. Una vez terminados los lavados se agrega al tejido 500 µl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl; 400mM NaCl; 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.2). Posterior a este evento se le adiciona a cada tubo 20 µl de proteinasa K (20 mg/mL), y se incuba durante 16 horas, en agitación constante.

El ADN de cada muestra se extrae mediante el método tradicional de fenol cloroformo:

A la solución de la muestra se le adiciona un volumen de fenol: cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1). Las muestras se mezclan por agitación suave, posterior a este paso se centrifuga a 8000 rpm por 3 minutos. La fase acuosa resultante se coloca en un tubo nuevo de 1.5 ml, repitiendo el paso anterior. Nuevamente la segunda fase acuosa obtenida se adiciona a un tubo de 1.5 ml y el ADN presente en esta fase, se precipita en presencia de 40 µl de sal de acetato 100 mM y 500 µl L de etanol absoluto. La muestra se incuban a -70°C durante 2 horas; posterior a la incubación la solución se centrifuga a 9,000 rpm durante 10 minutos, con decantación del excedente. Finalmente la pastilla obtenida se lava por duplicado con etanol al 70%, y se somete a evaporación total del etanol a temperatura ambiente para evitar interferencias. Por último, el ADN precipitado, se resuspende en 75 µl l de agua inyectable estéril.

#### ***Aislamiento del ADN de Toxoplasma gondii en muestras de sangre.***

La muestra de sangre (5 ml con anticoagulante EDTA al 15%) de las pacientes, se procesan para la obtención del ADN del parásito, por pasos sucesivos de fenol, cloroformo previamente descrito.

De la misma manera, el ADN presente en la fase acuosa, se precipita en presencia de 40 µl de sal de acetato 100 mM y 500 µl de etanol absoluto. La pastilla obtenida se resuspendió en 75 µl de agua inyectable estéril para recuperar el ADN de la muestra, el cual se usó en la metodología de PCR.

#### ***Amplificación mediante PCR específico para Toxoplasma***

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa se realiza en dos etapas, un PCR inicial para amplificar un fragmento de 193 pb del gene B1 de *Toxoplasma gondii* y un segundo PCR anidado teniendo como molde de ADN, el primer amplificado.

1. **Amplificación de un fragmento de 193 pb del Gen B1 de *Toxoplasma gondii* mediante la reacción en cadena de la polimerasa.**

Se utilizan los siguientes oligonucleótidos para amplificar el primer fragmento

5' – GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG – 3'

5' – TCTTTAAAGCGTTTCGTGGTC – 3'

La reacción de PCR se lleva a cabo en un volumen total de 40  $\mu$ L, conteniendo 10 mM Tris HCl pH 8.3, 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 $\mu$ M de cada oligonucleótido, 0.1 mM de cada dNTPs y 1.25 U taq. polimerasa y el ADN obtenido de cada muestra.

La reacción se realiza mediante 40 ciclos; los tiempos y temperaturas utilizadas en el termociclador, se desnaturalizan a 93°C por 30 segundos, seguido de una temperatura de alineamiento de 57°C por 10 segundos y una extensión final a 72°C por 30 segundos.

## 2. Amplificación del fragmento de 96 pb del Gen B1 de *Toxoplasma gondii* mediante PCR anidado.

En la segunda etapa de la reacción, se utiliza 1  $\mu$ L del producto amplificado (193 pb) anterior y el siguiente par de oligonucleótidos.

5-TGCATAGGTTGCAGTCACTG-3

5-GGCGACCAATCTGCGAATACACC-3

La reacción se lleva a cabo en 40  $\mu$ L, conteniendo 10 mM Tris HCl. pH 8.3, 50 mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 $\mu$ M de cada oligonucleótido, 0.1 mM de cada dNTPs y 1 U taq. Polimerasa. El proceso de amplificación se realiza en 40 ciclos con una desnaturalización de 93°C por 10 segundos, seguido de una temperatura de alineamiento de 63°C por 10 segundos y una extensión final a 72°C por 15 segundos.

En ambas etapas de amplificación por PCR se utilizan los reactivos y controles especificados en el anexo 1.

Los productos amplificados en cada etapa son separados por electroforesis en una solución amortiguadora de TBE, en geles de agarosa ó acrilamida al 1.5 y al 12 % respectivamente.

### Anexo 1

#### Reactivos y controles utilizados en el proceso de amplificación por PCR

Reactivo	Componentes	Cantidades
PCR SuperMix	22mM Tris –HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl <sub>2</sub> , 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 dTTP, 220 μM dCTP, 22 U <i>Taq</i> ADN polimerasa/mL.	34 μL
Oligonucleótidos	Para las secuencias de 193 y 96 pb	1 μL
Muestras	ADN problema	5 μL
Control +	PCR SuperMix ADN de <i>Toxoplasma gondii</i> Oligonucleótidos	31 μL 3 μL 1 μL
Control -	PCR SuperMix Agua inyectable Oligonucleótidos	31 μL 3 μL 1 μL
Marcador de peso molecular	1Kb ADN ladder φX174 ADN/Hae III	0.5 μL 1 μL



## Anexo 2

### Soluciones amortiguadoras TBE (Tris borato EDTA) y TE (Tris-EDTA)

Sol. Amortiguadora	Solución Stock	Componentes	Para 1L	Conc. Final
TBE pH 8.0	10x	Tris Base Acido Bórico EDTA	108gr 55gr 8.8gr (40mL)	89mM 89mM 2mM
TE pH 7.5	1x	Tris HCl pH 7.4 EDTA pH 8.0	1.2gr 0.29gr	10mM 1mM

\* El TBE con el que se corren y preparan los geles es 1x. Para 1L: 900 mL agua destilada + 100 mL TBE 10x

Se mezclan los componentes en placa de calentamiento con agitación constante, una vez disueltos se coloca en un recipiente limpio y se procede a esterilizar la solución por autoclave.

### Anexo 3

#### Preparación de gel de acrilamida (12%)

Reactivos	1gel	2 geles
Agua	5mL	10mL
TBE 10x	1mL	2mL
Acrilamida BIS (30:0:8)	3.91mL	7.82mL
Persulfato de Amonio	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L