

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
Alberto Cazorla Talleri



Detección de mutaciones en *rpoB*
relacionadas a rifampicina-resistencia en
aislamientos clínicos de *Mycobacterium*
***tuberculosis* a través de un ensayo simple y**
de bajo costo basado en *High Resolution*
Melting Analysis

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Daniela Alvarez Calderón

LIMA-PERÚ
2019

JURADO CALIFICADOR

PhD. JORGE ARÉVALO – Presidente

MSc. TERESA BARRETO - Vocal

PhD. DANIEL GUERRA – Secretario

ASESOR DE TESIS

PhD. PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

Jefe de Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular

Facultad de Ciencias y Filosofía

Universidad Peruana Cayetano Heredia

A mis tres personas favoritas...

A mi adorada mamá, Dany, porque gracias a ti estoy aquí. Gracias por tu amor infinito. Gracias por estar conmigo en mis aciertos y desaciertos. Gracias por siempre brindarme la mejor educación que pudiste. Mamá, esta tesis, también fruto de tu esfuerzo, pone fin a mi etapa de pregrado. Lo que viene después va a mi cuenta, gracias mamá.

A mi hijita, Luciana, porque siendo aún un ser pequeño me das aliento y, a tu forma, entiendes mi esfuerzo y probables sacrificios. ¡Sigamos avanzando mi pequeño tesoro!

A mi compañero y cómplice de vida, Roberto, por compartir conmigo tu admirable sensatez, tu fuerza, empuje y paciencia durante todo este tiempo. Gracias por enseñarme que, si camino sola, tal vez vaya más rápido, pero si caminamos juntos, llegaremos más lejos.

AGRADECIMIENTOS

A mi mentora, la Dra Patricia Sheen, por su apoyo incesante durante todo este tiempo, por su guía y su sabio estímulo, por ser mi mejor recordatorio de que debía terminar, cuanto antes, lo que inicié.

Al Dr Mirko Zimic, por compartir conmigo sus sabios consejos, su preciado tiempo y su formidable experiencia.

A la Dra María Eguiluz, por su permanente asesoramiento y valioso apoyo durante la elaboración de este trabajo de tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, por las eternas amistades y los entrañables momentos intelectuales y de camaradería.

A mis compañeros del CITE San Fernando, Elisa, Liliana y Marco, por compartir conmigo su alegría, sus ánimos y su incondicional apoyo en la recta final de este larga, pero valedera, tarea.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado con los fondos otorgados al laboratorio por el *Wellcome Trust Intermediate Fellowship* (N° 099805/Z/12/Z)

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	6
III. OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo General.....	7
3.2 Objetivos Específicos.....	7
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1 Origen y procesamiento de las muestras clínicas de esputo.....	8
4.2 Selección de aislamientos clínicos para el estudio	9
4.3 Extracción de DNA de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
4.4 PCR en tiempo real usando primers <i>rpoB</i> y análisis por High Resolution Melting	11
4.4.1. Consideraciones para la estandarización inicial de la prueba HRM.....	11
4.4.2. Condiciones empleadas en el ensayo PCR real time y HRM.....	12
4.4.3. Optimización de software para análisis de curva de fusión HRM...	12
4.4.4. Análisis cuantitativo de las curvas de fusión para la discriminación de cepas mutantes.....	14
4.5 Análisis de secuencias.....	15

4.6	Análisis estadístico.....	15
4.6.1	Determinación de la sensibilidad, especificidad y concordancia del HRM con respecto a la presencia de mutaciones en rpoB determinado mediante análisis cualitativo y cuantitativo.....	15
4.6.2	Comparación de la sensibilidad y especificidad de los análisis cualitativo y cuantitativo del HRM.....	17
V.	RESULTADOS	18
VI.	DISCUSIÓN	27
VII.	CONCLUSIONES	33
VIII.	PERSPECTIVAS	34
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de la subunidad β de la RNA polimerasa (RpoB) de <i>Escherichia coli</i>	04
Figura 2.	Colorante fluorescente saturante, Resolight	05
Figura 3.	Gráficos HRM para la detección de mutaciones en rpoB de aislamientos de <i>M. tuberculosis</i>	21
Figura 4.	Curvas HRM de aislamientos procesados por el método CTAB-fenol-cloroformo	22
Figura 5.	Análisis de desempeño basado en curvas ROC.	24

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Primers diseñados para el estudio	15
Tabla 2.	Resumen de la caracterización genotípica y fenotípica de los aislamientos de <i>M. tuberculosis</i> incluidos en el estudio y su tipificación por HRM	19
Tabla 3.	Estimadores de precisión derivados del análisis cualitativo de las curvas de HRM	23
Tabla 4.	Estimadores de precisión derivados del análisis cuantitativo de las curvas de HRM	26

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
MODS	Ensayo de Susceptibilidad a Drogas mediante Observación Microscópica
LPA	Line Probe Assays/ Prueba de Sonda Lineal
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TB	Tuberculosis
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Adquirida
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
RIF	Rifampicina
RRDR	Rifampicin resistance determining region/ Región determinante de resistencia a rifampicina
HRM	High Resolution Melting
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
SNP	Single nucleotide polymorphisms/ Polimorfismos de nucleótido simple
pb	Pares de bases
Ct	Cycle threshold/ Ciclo umbral
Tm	Melting temperature/ Temperatura de fusión
ANB	Ácido nucleico bloqueado

RESUMEN

La tuberculosis es la primera causa de muerte por enfermedades infecciosas a nivel mundial. De manera particular, el Perú se encuentra en la lista de los 30 países con mayor índice de multidrogo resistencia en TB. El diagnóstico certero y oportuno de susceptibilidad a drogas es determinante para incrementar las tasas de éxito de tratamiento. La prueba fenotípica basado en cultivo es la prueba estándar, sin embargo, el tiempo de respuesta es prologando. Pruebas moleculares como el Genotype MTBDRplus y el GeneXpert MTB/RIF son opciones de diagnóstico rápido, pero no son de fácil acceso a la población. En este estudio, evaluamos la eficiencia de un ensayo versátil basado en High Resolution Melting (HRM) para la detección de mutaciones en el gen *rpoB* en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina, un marcador de multidrogo-resistencia. En el estudio se incluyó 123 muestras de DNA extraído a partir de aislamientos clínicos resultando en valores de sensibilidad y especificidad de 82.4% y 96.4%, respectivamente, tomando el secuenciamiento como prueba de referencia. Adicionalmente a la extracción de DNA empleando un kit comercial, también se utilizó el método de fenol-cloroformo, manteniendo los valores de sensibilidad, pero incrementando la dispersión de las curvas HRM. A su vez, este estudio plantea un análisis cuantitativo de las curvas de fusión empleando las unidades de fluorescencia relativa máxima para determinar un punto de corte. Considerando ambos tipos de análisis se concluye que el HRM es una prueba robusta, simple y de bajo costo para la detección de mutaciones en *rpoB* asociadas a RIF-resistencia.

Palabras claves: Tuberculosis, multidrogo-resistencia, rifampicina, high resolution melting

ABSTRACT

Tuberculosis is the leading cause of death from infectious disease. Particularly, Peru is in the top 30 for high MDR-TB burden countries. A proper and prompt drug susceptibility diagnosis is demanding to increase the chance for cure. Nowadays, phenotypic drug susceptibility test based on culture is still the reference test, though turnaround time is too prolonged. Molecular tests such as Genotype MTBDRplus and GeneXpert MTB/RIF are a quicker alternative for diagnosis but lack of easy-access for general population. In this study, we evaluated the efficiency of a versatile test based on high resolution-melting (HRM) assay for the detection of mutations in *rpoB* gene in rifampicin resistant *M. tuberculosis* clinical isolates, as a marker for multidrug-resistance. DNA samples extracted with High Pure PCR Template Preparation kit from 123 clinical isolates, were included in the HRM analysis resulting in an overall sensitivity and specificity of 82.4%, 96.4%, respectively, employing DNA sequencing the reference standard test. Additionally, in order to reduce costs, DNA was extracted by phenol-chloroform method from sputum samples, encountering similar sensitivity values but increasing the HRM curves scattering. Our study also suggests a quantitative analysis for melting curves, using maximum relative fluorescence unit (RFU_{max}) values to set up a cut-off. Considering both types of analysis, we concluded that HRM is a robust, simple, rapid and low-cost test for the detection of *rpoB* mutations associated to rifampicin resistance.

Keywords: Tuberculosis, multi-drug resistance, rifampicin, *rpoB*, High resolution melting

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), una enfermedad aerotransportada causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, es la principal causa de muerte provocada por un organismo infeccioso según la Organización Mundial de la Salud (OMS). En el 2017, hubo alrededor de 10.0 millones de personas infectadas, de las cuales fallecieron 1.3 millones considerando la población de pacientes HIV-negativos. La mayoría de casos ocurren en los países más pobres, destacando países de África (30%) y Asia (55%), donde el acceso a los servicios de salud es lejano, existe un alto índice de desnutrición, y las enfermedades como la diabetes mellitus y el SIDA son frecuentes y significan un factor de riesgo desencadenante de la enfermedad (1).

A pesar de ser una enfermedad para la cual hay tratamiento, aún fallece un gran número de pacientes (2), puesto que existe una amplia brecha entre el diagnóstico temprano, el suministro de tratamiento y la prevención. La detección oportuna se ve obstaculizada porque el paciente no tiene acceso a un servicio de salud o tarda en acudir, además el lapso para un diagnóstico definitivo puede tomar varias semanas; todos estos factores indirectamente contribuyen a la transmisión de la enfermedad. Según cifras globales, se estima que cerca de tres millones de personas no son diagnosticadas o no son notificadas y tratadas (3). Un paciente en ausencia de tratamiento, tiene un 50% de probabilidad de sucumbir a la TB (4). El régimen actual para esta enfermedad es de un mínimo de 6 meses de terapia e involucra el suministro de cuatro drogas en simultáneo: rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol. En muchos pacientes, estas pueden provocar efectos adversos tales como hepatitis, trombocitopenia, hemólisis, fallo renal y ototoxicidad (5), lo cual fomenta una menor adherencia al tratamiento.

Resulta aún más desafiante la aparición de cepas multidrogo-resistentes (MDR), entiéndase como MDR a aquellas cepas resistentes a isoniazida y rifampicina. El tratamiento para estos pacientes requiere el uso de drogas de segunda línea que son caras, tóxicas, con efectos secundarios más intensos aún y se deben suministrar por un largo periodo de dos años. Además, las tasas de curación no sobrepasan el 50 a 70% de éxito, y si el paciente tiene co-infección con VIH las tasas de mortalidad son mucho más altas y rápidas (6). Perú posee cerca de 2300 casos de MDR-TB por año, lo cual significa el 35% de casos de la región (7). Con el fin de mejorar la prognosis del paciente y evitar la expansión de la infección por este tipo de cepas, urge desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico de susceptibilidad que sean efectivas y rápidas (8, 9).

El método basado en cultivo comúnmente utilizado para evaluar la susceptibilidad de drogas de primera y segunda línea, suele demandar de 3 a 4 semanas (10), un periodo demasiado extenso considerando la gravedad de la enfermedad. Por lo que la OMS ha respaldado metodologías alternativas como el ensayo de susceptibilidad a drogas por observación microscópica (MODS, por sus siglas en inglés) o el ensayo de Agar de Capa Fina (TLA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, tienen la desventaja de demandar mucho tiempo al operador, además de requerir un entrenamiento especializado, condiciones que no siempre se reúnen en los escenarios de mayor pobreza. En contraste, existen ensayos moleculares que pueden brindar un diagnóstico rápido, un procedimiento estandarizado y mejor relación costo-efectividad (11). La OMS avala dos pruebas moleculares, los ensayos de sonda lineal (*Line Probe Assays* o LPA) o GenoType MTBDR*plus*, y el ensayo GeneXpert MTB/RIF, ambos con una sensibilidad reportada mayor al 97 y 98%, respectivamente (12, 13). El primero consiste en tiras comerciales de nitrocelulosa con diez sondas de oligonucleótidos

específicas para detectar mutaciones de genotipos rifampicina e isoniazida resistentes, así como genotipos wild-type y el complejo *M. tuberculosis*. Mientras que el GeneXpert MTB/RIF es un sistema de diagnóstico integrado capaz de procesar la muestra de esputo y realizar un análisis de PCR en tiempo real para el diagnóstico de tuberculosis y la detección de resistencia a rifampicina en muestras clínicas (14). Ambos métodos moleculares, aunque ofrecen resultados en apenas dos horas, suelen tener un precio elevado en insumos y/o en equipos como es el caso del GeneXpert MTB/RIF, condiciones que no facilitan su integración en la atención primaria.

De manera particular, la rifampicina (RIF) juega un rol fundamental en el manejo de pacientes con enfermedad activa puesto que esta droga actúa preferentemente sobre bacilos de metabolismo lento que permanecen después de los primeros 5 días de tratamiento (15). La resistencia a rifampicina es difícil de descartar a través de pruebas microbiológicas de susceptibilidad fenotípica (16). Sin embargo, considerando que más del 95% de todas las cepas resistentes a rifampicina contienen mutaciones en la región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR, por sus siglas en inglés), una región de 81 pares de bases (pb) que abarca del aminoácido 507 al 533 (cluster I) de la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*) (Fig. 1), la detección de resistencia a esta droga es bastante manejable a través de pruebas moleculares rápidas (17). Cabe resaltar que existe una asociación concomitante entre la resistencia a rifampicina y a la isoniazida (16), por lo que la detección de resistencia a RIF es considerada un marcador de tuberculosis-MDR (18).

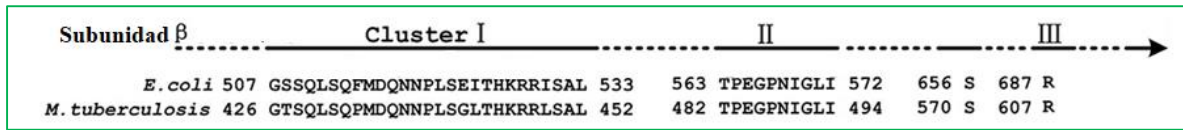


Fig. 1 Esquema de la subunidad β de la RNA polimerasa (RpoB) de *Escherichia coli*. En la parte superior, se muestra la localización de los cluster I, II y III, mientras que en la parte inferior se detalla el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de RpoB para *E. coli* y *M. tuberculosis*. (Adaptado de *Cai et al, 2017*) (19)

El HRM es una técnica post-PCR de alta precisión que consiste en el análisis cualitativo de la curva de fusión de un fragmento amplificado de ADN. Las modificaciones presentes en la secuencia se van a ver reflejadas en diferencias en el perfil de la curva respecto a un estándar *Wild type* (Wt). A diferencia de una curva de fusión tradicional, el HRM utiliza colorantes fluorescentes de unión a DNA-doble-hebra empleados en condiciones saturantes, de manera que su recolocación es impedida al momento de la denaturación (Fig. 2), además, el equipo es capaz de coleccionar más puntos de data permitiendo un análisis de mayor resolución y más preciso de la disociación de la doble hebra de DNA. Esta técnica no requiere el empleo de sondas (8), como las técnicas moleculares mencionadas anteriormente, lo cual la hace una prueba simple, rápida, económica, capaz de emplear un equipo de bajo costo al alcance de más laboratorios.

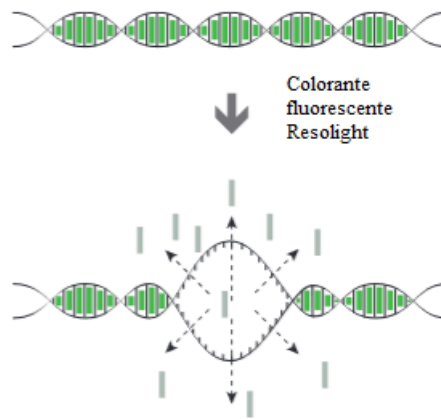


Fig. 2 Colorante fluorescente saturante, Resolight. Las moléculas colorantes que son expulsadas de la región de fusión no se pueden recolocar en la doble hebra del amplicón, resultando en un perfil de fusión que refleja de manera más precisa la secuencia de DNA.

Este trabajo de investigación propone implementar y evaluar el desempeño de la prueba de High Resolution Melting (HRM) orientada hacia la detección de mutaciones en la región RRDR del gen *rpoB* que confieren resistencia a rifampicina en cepas peruanas de *Mycobacterium tuberculosis*. El desempeño de la prueba de HRM se describirá en términos de sensibilidad, especificidad y nivel de concordancia, utilizando el secuenciamiento como una prueba de referencia en la detección de mutantes genotípicas.

II. HIPÓTESIS

El análisis por High Resolution Melting del perfil de las curvas de fusión de la región RRDR del gen *rpoB* de muestras provenientes de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* permite obtener una sensibilidad, especificidad y valor de concordancia mayor al 80% para la detección de mutaciones que confieren resistencia a rifampicina.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la sensibilidad, especificidad y concordancia de la prueba de High Resolution Melting para la detección de mutaciones que confieren resistencia a rifampicina en aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Optimizar el ensayo de High Resolution Melting para la detección de mutaciones que confieren resistencia a rifampicina en cepas de *M. tuberculosis*.
- Analizar el genotipo y el nivel de susceptibilidad fenotípica a rifampicina de la población de cepas incluidas en el estudio
- Determinar la sensibilidad y especificidad del HRM usando resultados cualitativos derivados del análisis visual del gráfico de diferencias, unidades de fluorescencia relativa vs temperatura.
- Determinación de la sensibilidad y especificidad del HRM usando resultados cuantitativos mediante el análisis de las unidades de fluorescencia relativa máxima (RFUmax) de las curvas de fusión de HRM.
- Comparar la sensibilidad y especificidad obtenidos de los análisis cualitativo y cuantitativo mediante la prueba de McNemar.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Origen y procesamiento de las muestras clínicas de esputo

Las cepas de *M. tuberculosis* empleadas en el estudio pertenecen a la base de datos de criobanco del grupo de trabajo en Tuberculosis de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (LID-UPCH). Dichas muestras de esputo fueron colectadas para ser empleadas en cuatro trabajos de investigación previos a la realización del presente proyecto. Los pacientes fueron reclutados de los hospitales María Auxiliadora y Hospital Nacional Dos de Mayo entre los años 2001 y 2004 (2, 20, 21).

Apenas se recepcionó las muestras, fueron descontaminadas empleando el método de hidróxido de sodio-N-acetil-L-cisteína (0.5% NALC en NaOH-Na citrato), para lo cual se mezcló 2 ml de esputo y un volumen equivalente de NaOH-NALC. Luego, se llevó al vortex y se dejó incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Al cabo de este tiempo se agregó 10 ml de buffer fosfato (pH 6.8) para neutralizar el alcalí y terminar el proceso de descontaminación. Se centrifugó a 3000 xg por 15 minutos y se desechó el sobrenadante. Finalmente, el pellet fue resuspendido en caldo 7H9 enriquecido con OADC (Oleica cid-albumin-dexrose-catalase, BD Difco™) y PANTA (Becton Dickinson®). Esta resuspensión de bacterias fue sembrada en medio Middlebrok 7H10 con polimixina B (20µg/ml), trimetoprima lactato (20µg/ml), y carbenicilina (50µg/ml) e incubadas a 37°C por 6 semanas. A estas cepas se les practicó ensayos de susceptibilidad a rifampicina mediante TEMA (tetrazolium microplate assay) para ser caracterizadas fenotípicamente. El rango crítico de concentración evaluado fue de 0.062 a 16 µg/ml de acuerdo a la metodología empleada por Caviedes et al. (18). Todo este procedimiento se realizó en el Lab Luz Caviedes, compatible con nivel 3 de bioseguridad de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID-UPCH).

4.2 Selección de aislamientos clínicos para el estudio

Éste fue un estudio exploratorio para conocer la sensibilidad y especificidad de detección de mutaciones de la prueba HRM, en este sentido se seleccionó al azar 134 cepas del criobanco, siendo la mitad de las muestras susceptibles y la otra mitad resistentes a rifampicina ($n=67$), por ensayo TEMA. Trabajos previos emplearon un número similar de muestras, 99 (11) y 167 (22) cepas. Acorde a lo detallado en estos ensayos, se esperaba obtener una sensibilidad de la prueba del 80%. Considerando un nivel de confianza del 95% y un error permitido del 10%, se calculó el “n” muestral empleando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{p \cdot q \cdot z^2}{d^2}$$

Siendo:

n = Tamaño muestral

p = proporción estimada de éxito

q = $1-p$ ó proporción estimada de fracasos

z = intervalo de confianza en unidades de error estándar

d = grado máximo de error permitido entre la proporción real y la proporción de la muestra

De aquí deriva que el tamaño de muestra que se sugiere en cada grupo, casos y controles, es de aproximadamente 61 pacientes.

4.3 Extracción de DNA de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Las cepas descriopreservadas fueron sembradas en placas de agar Middlebrok 7H10, y se incubaron a 37°C por 4 semanas aproximadamente. 11 de las 134 cepas cultivadas, no fueron viables y fueron excluidas del estudio. Las bacterias fueron transferidas a un vial de 2ml conteniendo beads de vidrio de 2mm de diámetro (Sigma-Aldrich®) y 500µl de buffer TE. Las suspensiones bacterianas fueron inactivadas a 80°C por 20 minutos, seguido de centrifugación a máxima velocidad por 5 minutos. Luego del procedimiento de inactivación, las cepas fueron retiradas del área de bioseguridad Nivel III, para ser trabajadas en Nivel II.

Las células fueron lisadas usando 50µl de lisozima (10 mg/ml TE pH 8) durante la noche a 37°C bajo agitación. A continuación, se añadió 200 µl de binding buffer y 40 µl de proteinasa K (20 mg/ml) para denaturar las proteínas y promover la liberación del DNA. Los tubos se incubaron al menos 3 horas a 70°C.

Para la purificación de las muestras de DNA se generó dos grupos asignados al azar, el primero (n=72) fue purificado empleando el *High Pure PCR template Preparation kit* (Roche Diagnostics; product No: 11796828001), siguiendo las recomendaciones del proveedor, mientras el segundo (n=51) fue procesado acorde al método convencional de fenol-cloroformo (23). De manera breve, se añadió 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de CTAB/NaCl (previamente temperado a 65°C) y se incubó por 10 minutos a 65°C. Luego se añadió 750 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se sometió a vortex, y se centrifugó a 13,000 g por 5 minutos. La solución acuosa superior fue removida y colocada en un tubo nuevo. Se agregó 750 µl de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se sometió a vórtex y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, y se

añadió 1 ml de etanol absoluto helado para la precipitación del DNA. Se dejó incubando a -70°C por 15 minutos y se volvió a centrifugar por 8 minutos. Se repitió los mismos pasos, pero empleando alcohol a 70%. Se dejó secar el precipitado para luego resuspender a 50 µl de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA).

4.4 PCR en tiempo real usando primers *rpoB* y análisis por High Resolution Melting

Para detectar las mutaciones asociadas con resistencia a rifampicina, se amplificó por PCR en tiempo-real un fragmento de 169-pb que flanqueaba la región de 81-pb llamada región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR). Los primers fueron diseñados utilizando la herramienta de diseño de primers del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), dirigido a la región desde la posición 1200 a 1400 del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* H37Rv (NC 000962.3). De los tres sets de primers (*rpoB*-F, R → Set-1, *rpoB*516-F, R → Set-2, *rpoB*1-F, R → Set-3), se escogió el Set-3 (*rpoB*-1F y *rpoB*-1R) puesto que cubría por completo la región determinante de resistencia a rifampicina (Ver Anexo 1) o RRDR, además estos ya habían sido utilizados con éxito en publicaciones previas (11).

4.4.1 Consideraciones para la estandarización inicial de la prueba HRM

Se empleó 11 muestras extraídas con *High Pure PCR template Preparation kit* a una concentración de 10 ng/µl de DNA. Se generó curvas estándar, entre 10 ng/µl y 1 pg/µl, para evaluar el desempeño del ensayo y buscar las condiciones que maximizaban la eficiencia de la amplificación. Dos fases:

Fase 1: Optimización de la mezcla de reacción (Lightcycler® 480 HRM Master). Se tituló concentraciones de MgCl₂ de 2.0 mM, 2.5 mM y 3.0 mM, así como la concentración de

primers a utilizar en un rango de 0.3 y 10 μM .

Fase 2: Optimización del programa de PCR y fusión. Se evaluaron temperaturas de annealing de 58, 60 y 62°C. Y se ajustó una ventana de fusión de 85 a 95°C.

4.4.2 Condiciones empleadas en el ensayo PCR real time y HRM

Los parámetros de ciclaje de PCR fueron de 10 min a 95°C, 45 ciclos de 10 seg a 95°C, 15 seg a 58°C, y 10 seg a 72°C.

La reacción de PCR en tiempo real fue desarrollada en una reacción de 20 μl conteniendo 20 ng de DNA, 1X High Resolution Melting Master Mix (Roche), 2.5mM MgCl_2 , 0.5 μM de cada primer, utilizando un termociclador modelo LightCycler® Nano Instrument (Roche). Se empleó el colorante fluorescente LightCycler® 480 ResoLight Dye para detectar la reacción de amplificación del DNA. El protocolo de HRM inició con un paso de retención a 85°C por 1 seg, seguido de un incremento lento de temperatura una tasa de 0.05°C por Segundo hasta los 95°C con una detección de fluorescencia continua (25 adquisiciones/°C).

4.4.3 Optimización de software para análisis de curvas de fusión HRM

El análisis HRM se hizo en base a las curvas de fusión utilizando el programa LightCycler Nano Software 1.1 (Roche Diagnostics).

De manera obligatoria, previo al análisis HRM se corroboró la óptima amplificación de todas las muestras, teniendo en cuenta que los valores de C_p (Crossing point) sean similares, con una variación menor a 5 unidades, y una altura del plateau también semejante. Aquella muestra que no cumplió con estos requisitos fue repetida en un siguiente análisis.

Para la normalización de las curvas de fusión en bruto se siguió los siguientes pasos:

Paso 1: Se ajustó el nivel de intensidad de fluorescencia inicial y final para eliminar el background y disminuir la variación de brillo (Temperatura Inicial = [89.6-89.9°C], temperatura final = [92.9-93.3]).

Paso 2: Se aplicó el modo de normalización por defecto, el software extrae el valor promedio de intensidad inicial y el promedio de intensidad final. Luego, cada intensidad es escalada de manera que la intensidad inicial es mapeada a 1, y la intensidad final a 0, aplicando la siguiente fórmula

$y = \text{raw intensity}$

$i = \text{intensidad inicial promedio}$

$f = \text{intensidad final promedio}$

$z = \text{intensidad normalizada}$

$$z = \frac{(y - f)}{(i - f)}$$

Paso 3: Se seleccionó el modo de visualización *Gráfico de diferencias* para enfatizar las diferencias entre los perfiles de las curvas. Se utilizó la cepa Wild Type de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv como línea base (“baseline”) o curva de referencia para la normalización en cada corrida. Por definición el gráfico de diferencias muestra las curvas analizadas como aparecerían cuando la curva base es sustraída de ellas, luego de la normalización.

Todas aquellas curvas que difieren notablemente de la curva base fueron clasificadas como cepas mutantes.

4.4.4. Análisis cuantitativo de las curvas de fusión para la discriminación de cepas mutantes

Con el objetivo de reducir la subjetividad del análisis cualitativo estándar de las curvas de fusión se propuso determinar un punto de corte basado en el valor máximo de RFU (RFU_{máx}, *Relative fluorescence units*) de cada curva, que definiera un valor límite para considerar una cepa del tipo Wild Type: y por encima de este, considerarla mutante.

Para definir el valor de punto de corte RFU_{máx} óptimo para la prueba se aplicó un análisis de curva ROC (*Receiver operating characteristic*). Esta curva diagrama la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) vs la tasa de falsos positivos (1 – especificidad) para todos los potenciales valores de punto de corte. A continuación, a partir de este listado de valores de sensibilidad/especificidad se escoge el valor de punto de corte que maximice la suma de estos (sensibilidad + especificidad), o lo que equivale al llamado “índice de Youden (índice *J*)”. El índice *J* pretende clasificar a la mayor cantidad posible de cepas según su verdadera condición de mutante o wild type (24).

Luego de conocer el punto de corte RFU_{máx} óptimo se procedió a dicotomizar las cepas (1=mutante, 0=wild type) y hallar los valores de desempeño estadístico (sensibilidad/especificidad) según esta perspectiva de análisis. Cabe destacar que el análisis se hizo en conjunto para todas las cepas (n=123), y por grupos independientes de cepas extraídas por kit y por el método de fenol cloroformo, con la intención de conocer si hay homogeneidad entre los puntos de corte y comprobar su efectividad de predicción de la condición experimental.

4.5 Análisis de secuencias

Se estableció el secuenciamiento de *rpoB* como prueba de referencia. Se utilizó los primers *rpoB_D_Fw* y *rpoB_D_Rv* (codones 427-604, sistema de numeración de *E. coli*), Tabla 1. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados por ambas hebras en MacroGen® (Seul, Korea). Para el análisis y la búsqueda de mutaciones se empleó el programa *CLC sequence viewer* (Qiagen®), tomando como referencia la secuencia del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* H37Rv depositada en la base de datos del GenBank (NC_000962.3).

TABLA 1. Primers diseñados para el estudio

Nombre Primer	Secuencia	Longitud	T _m (°C)	Tamaño Producto (pb)	Propósito
<i>rpoB</i> -1F	TCACACCGCAGACGTTGAT	19	56.9	169	High Resolution Melting
<i>rpoB</i> -1R	GCACGCTCACGTGACAGAC	19	58.9		
<i>rpoB_D_Fw</i>	GACCACGATGACCGTTCC	18	55.7	532	Secuenciamiento
<i>rpoB_D_Rv</i>	CACGATCTCGTCGCTAAC	18	52.8		

T_m; del inglés *Primer melting temperature*, pb: pares de bases

4.6 Análisis estadístico

4.6.1 Determinación de la sensibilidad, especificidad y concordancia del HRM con respecto a la presencia de mutaciones en *rpoB* determinado mediante análisis cualitativo y cuantitativo.

Para evaluar la capacidad de detección de mutaciones en *rpoB* del análisis por High Resolution melting tanto en su modalidad cualitativo y cuantitativo, se calcularon tres estadísticos: la sensibilidad, especificidad y el valor de concordancia, utilizando el secuenciamiento como prueba de referencia. La sensibilidad del HRM pretende explicar los

verdaderos positivos, es decir, las muestras identificadas como mutantes tanto por HRM como secuenciamiento de DNA, mientras que la especificidad representa los verdaderos negativos; aquellas muestras que no presentan mutaciones por ninguna de las pruebas. Se usó el coeficiente kappa de Cohen (κ) para medir la concordancia de ambas pruebas, el valor- κ toma en cuenta la posibilidad de la coincidencia ocurrida al azar. Por lo que se calcula de la siguiente manera (25):

$$z = \frac{\text{Concordancia observada} - \text{Concordancia al azar}}{\text{Concordancia máxima} - \text{Concordancia al azar}}$$

ó,

$$\kappa = \frac{p_0 - p_E}{1 - p_E}$$

Donde:

n = frecuencia total observada

O_D = Suma de las frecuencias observadas a lo largo de la diagonal

E_D = Suma de las frecuencias esperadas a lo largo de la diagonal

$p_0 = O_D/n$

$p_E = E_D/n$

Los cálculos de estas pruebas y de la curva ROC e índice de Youden para la descripción del valor de punto de corte RFU_{máx} se hicieron utilizando el programa STATA ver. 14.0 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.).

4.6.2 Comparación de la sensibilidad y especificidad del análisis cualitativo y cuantitativo del HRM

Con el objetivo de detectar diferencias estadísticamente significativas entre los valores de sensibilidad y especificidad proporcionados por las pruebas HRM cualitativo y cuantitativo se empleó el test de McNemar, tomando en consideración que la variable en cuestión es dicotómica y se pretende comparar una misma población. Esta prueba fue realizada empleando el programa STATA ver. 14.0 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP.).

V. RESULTADOS

El objetivo de este estudio fue la implementación y evaluación del desempeño de un ensayo de HRM orientado a la detección de mutaciones en el gen *rpoB* relacionadas con la resistencia a RIF en 123 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*; considerando el secuenciamiento como la prueba de referencia. Como dato adicional, cada muestra contaba con su caracterización fenotípica de susceptibilidad a rifampicina, por lo que se seleccionó 56 cepas RIF-susceptibles y 67 cepas RIF-resistentes, tal como se explica en la metodología. En el grupo de las cepas RIF-susceptibles, 5 (8.9%) presentaron mutación dentro de la secuencia RRDR en los siguientes codones L533P, D516F, D516Y, H526S (según Sistema de numeración *E. coli*). De la misma forma, de acuerdo a nuestros resultados de secuenciamiento, 4 cepas fenotípicamente resistentes no poseían mutaciones dentro de la secuencia determinante de resistencia RRDR. Adicionalmente, se solicitó el secuenciamiento de todo el gen *rpoB* para estas cepas discordantes, de esta manera se comprobó que 2 de 4 tenían mutación al inicio del gen en la posición 146Val>Phe (data no mostrada). Las mutaciones más frecuentes fueron 531Ser>Leu y 516Asp>Val con 39.8% y 6.5% del total de cepas mutantes, respectivamente. El genotipo con mutación en el codón 526 presentó la mayor variabilidad en la primera y la segunda posición (Ejm. H526S, H526D, H526Y, H526L), la mutación H526S no provocó resistencia fenotípica según nuestros resultados (Tabla 2).

TABLA 2. Resumen de la caracterización genotípica y fenotípica de los aislamientos de *M. tuberculosis* incluidos en el estudio y su tipificación por HRM

Fenotipo	N° de Cepas	Secuenciamiento ^a	Posición mutación <i>rpoB</i>	HRM CUALITATIVO	CUANTITATIVO ^c		
					Rango RFU _{max}	Mutante	Wild Type
Susceptible (56)	49	Wt	WT	WT	0.0009 - 0.1359	2	47
	2	Wt	WT	Mutante	0.1853-0.2545	2	0
	1	D516F (GAC → TTC)	1303, 1304	Mutante	0.2013	1	0
	1	D516Y (GAC → TAC)	1303	Mutante	0.1654	1	0
	1	H526S (CAC → AGC)	1333, 1334	WT	0.0711	0	1
	2	L533P (CTG → CCG)	1355	Mutante	0.1573 - 0.1683	2	0
Resistente (67)	1	Q513P (CAA → CCA)	1295	Mutante	0.1819	1	0
	1	D516F (GAC → TTC)	1303, 1304	Mutante	0.1981	1	0
	8	D516V (GAC → GTC)	1304	WT	0.0039 - 0.1226	2	0
	2	H526Y (CAC → TAC)	1333	Mutante	0.2215-0.3215	2	0
	1	H526L (CAC → CTC)	1334	WT	0.1406	1	0
	1	H526D (CAC → GAC)	1333	WT	0.0398	0	1
	48	S531L (TCG → TTG)	1349	Mutante	0.0954 - 0.4823	47	1
	1	S531L (TCG → TTG)	1349	WT	0.0204	0	1
	4	Wt ^b	WT	WT	0.0061 - 0.0559	0	4

^aCambio de aminoácido, sustitución sin sentido (ejm. D516F: denota que el aminoácido 516, Aspartato (D) ha sido cambiado por una

Fenilalanina (F)). ^bDos de las cuatro cepas mutantes albergaron una mutación en el codón 146 (Val>Phe) fuera del cluster I. ^cCut-off

0.1123

El análisis de HRM es altamente sensible a pequeños cambios en la secuencia de nucleótidos, convirtiéndolo en una prueba idónea para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). De acuerdo a la bibliografía, en cepas RIF-resistentes de *M. tuberculosis* más del 90% de los casos se debe a mutaciones SNP en los codones 516, 531 y 526 en una región de 81 -pb presente en la región determinante o RRDR (25). De manera cualitativa, las mutaciones causadas por un intercambio de bases A/T>C indujo desplazamientos de la curva de melting hacia la derecha respecto a la cepa Wt H37Rv, mientras que la mutación C/G>T facilita la fusión de la secuencia amplificada, requiriendo así menos temperatura para la fusión, evidenciando el desplazamiento de la curva hacia la izquierda respecto a la curva Wt. Esta separación de los perfiles de fusión nos permitió clasificar las cepas como susceptibles o resistentes (Fig. 1A) desde una aproximación cualitativa. Del mismo modo, para facilitar la discriminación, se señaló la cepa H37Rv como línea base Wild Type y se generó los gráficos de diferencia de temperatura, destacando el pico de RFU máximo como aquel punto en el que la cepa problema presenta la mayor diferencia de unidades de fluorescencia relativa respecto a la curva base (Fig. 1B).

La mutación S531L fue la más frecuente con una diferencia notable en su curva de fusión respecto a las de cepas Wild type (dif, $T_m \sim 0.25^\circ\text{C}$). Las cepas con mutaciones de transversión como 526C>G y 516A>T (SNP clase 4) no pudieron ser detectadas en nuestro estudio debido a su escasa diferenciación en relación a la de una cepa sin mutación ($T_m=0.04-0.07^\circ\text{C}$).

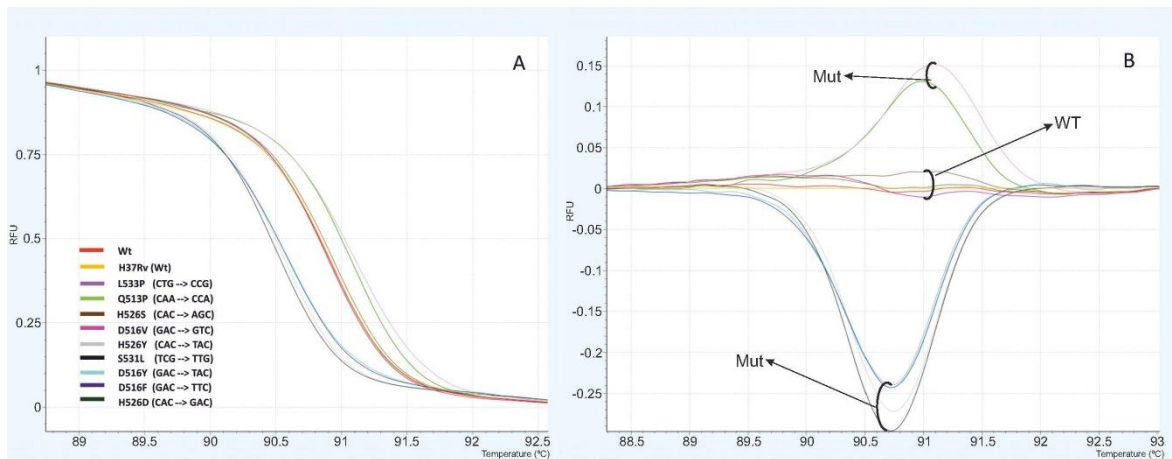


Fig. 3. Gráficos HRM para la detección de mutaciones en *rpoB* de aislamientos de *M. tuberculosis*. (A) Curva de fusión normalizada y (B) Gráfico de diferencias de temperatura para cada tipo de mutación. Se señala un ejemplo de clasificación de cepas mutantes y wild type. RFU, unidades de fluorescencia relativa.

Con el objetivo de evaluar la factibilidad de reducir los costos totales del ensayo de HRM, un grupo de muestras de DNA fueron purificadas usando el método estándar CTAB-fenol-cloroformo (n=51). En este caso, la vista de curvas de fusión normalizadas mostró una población de curvas con mayor dispersión. Para favorecer la clasificación de grupos se hizo la visualización como gráfico de diferencias de temperatura (Fig.2).

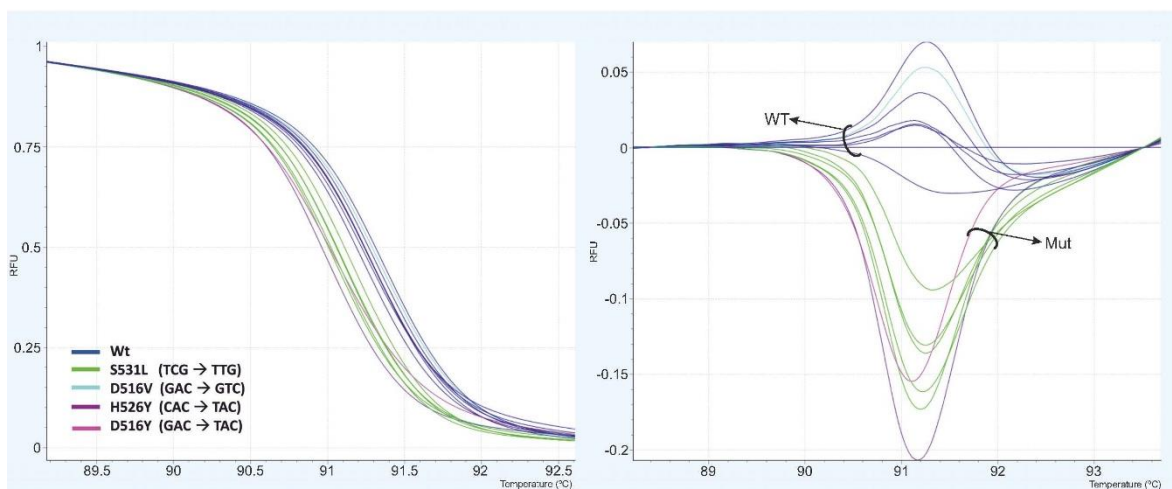


Fig. 4. Curvas HRM de aislamientos procesados por el método CTAB-fenol-cloroformo.

Izq. Vista de curvas de fusión normalizadas, Der. Gráfico de diferencias de temperatura

La tabla 3 detalla los estimadores de precisión de la prueba HRM, tanto de manera conjunta para todas las cepas como disgregado según el método de extracción. En líneas generales, mediante el análisis cualitativo de la prueba de HRM se pudo tipificar correctamente 56 de 68 cepas resistentes, lo cual corresponde a una sensibilidad de ensayo del 82.4% (95% IC: 71, 91) y una especificidad de 96.4% (95% IC: 87, 99) ya que 4 cepas fueron reportadas como falsos resistentes. Además, se encontró un grado de concordancia de 77% ($\kappa=0.77$) entre el ensayo de HRM y el secuenciamiento (25) (Tabla 3). Es importante mencionar que 12/68 cepas con genotipo mutante no fueron detectadas por HRM, 10 de estas presentaron mutaciones de transversión (posición 1304, 1333) y 1 una mutación compensatoria (posición 1333, 1334). La restante creemos pudo estar sujeta a un error administrativo en la etapa de procesamiento.

TABLA 3. Estimadores de precisión derivados del análisis cualitativo de las curvas de HRM

Parámetros	Kit		Fenol-cloroformo		Total	
	Estimador	95%	Estimador	95%	Estimador	95%
	Puntual	IC	Puntual	IC	Puntual	IC
Sensibilidad	82.9	66-93	81.8	65-93	82.4	71-91
Especificidad	100	91-100	88.9	65-99	96.4	87-99
Concordancia/	92%		84%		89%	
valor- κ	$\kappa=0.83$		$\kappa=0.67$		$\kappa=0.77$	

κ : Coeficiente kappa de Cohen

De manera alternativa, para la discriminación de cepas mutantes, se realizó un análisis cuantitativo de las curvas de fusión en base a sus valores de RFU máximo (Tabla 2). Para ello, se obtuvo la data cruda de las curvas (valores RFU vs Temperatura, modo *Gráfico de diferencias*) y se modificó a valores absolutos de RFU para así ubicar el valor más alto en cada una de las curvas, el valor de RFU máximo. Estos valores se llevaron a una tabla junto con el código de identificación de cada muestra y su respectivo resultado por la prueba de referencia expresada en valores dicotómicos (1= mutante, 0= wild type). Esta información fue introducida en el programa Stata para calcular la curva ROC y el índice *J* para la elección del punto más óptimo de corte (Ver anexo 3). Se hizo el análisis en tres escenarios, para descartar el sesgo por el método de extracción de DNA: a) Total de muestras analizadas, independiente de las condiciones de extracción b) Muestras de DNA extraídas con kit c) Muestras de DNA extraídas con el método de fenol cloroformo.

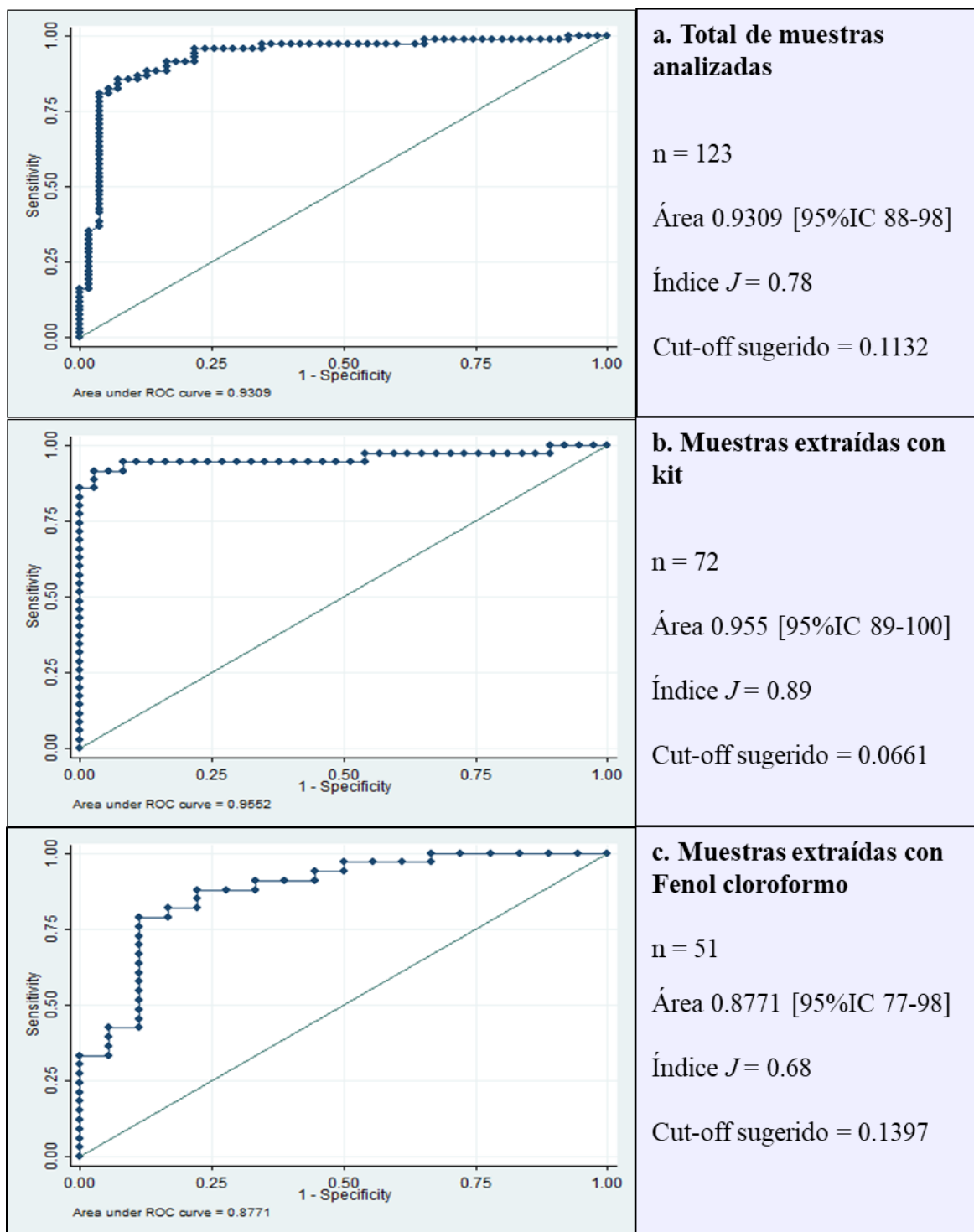


Fig. 5 Análisis de desempeño basado en curvas ROC.

A través del área bajo la curva se pudo apreciar que la capacidad de diferenciar entre cepas mutantes y wild type se incrementa si las muestras de DNA son extraídas con kit (AUC 95.5%, índice J 0.89). Por otro lado, el punto de corte o *cut off* para ser considerado mutante es más elevado si las cepas son extraídas por fenol cloroformo (cut-off 0.1397), algo que habría que evaluar si utilizar el mismo cut off para todas las muestras, independientemente de su procedencia de extracción.

Conocidos los puntos de corte de cada grupo analizado se procedió a “dicotomizar” los resultados de RFU_{máx}. Teniendo esta base de datos se calculó los valores de desempeño de la prueba, sensibilidad y especificidad, para cada escenario (Tabla 4).

El procesamiento de muestras por kit permite obtener valores más elevados de sensibilidad y especificidad (91.4 y 78.8%, respectivamente) en comparación al desempeño mostrado por las cepas extraídas por FC (sens. 78.8%/espec. 88.9%).

TABLA 4. Estimadores de precisión derivados del análisis cuantitativo de las curvas de HRM

Parámetros	Kit		Fenol-cloroformo		Total	
	Cut-off 0.0661		cut-off 0.1397		cut-off 0.1132	
	Estimador		Estimador	95%	Estimador	95%
	Puntual	95% IC	Puntual	IC	Puntual	IC
Sensibilidad	91.4	77-98	78.8	61-91	85.3	75-93
Especificidad	97.3	85.8-100	88.9	65-99	92.7	82-98
Concordancia/	94%		82%		89%	
valor- κ	$\kappa=0.88$		$\kappa=0.64$		$\kappa=0.77$	

κ : Coeficiente kappa de Cohen. $n_{\text{kit}} = 72$, $n_{\text{Fc}} = 51$, $n_{\text{Total}} = 123$

VI. DISCUSIÓN

Actualmente la rifampicina continúa siendo la droga más importante y potente dentro del grupo de fármacos de primera línea utilizados para combatir la tuberculosis. Se afirma que la resistencia a esta droga solo se desarrolla después de una resistencia previa a otra droga como la isoniazida (28). En el 2017, la OMS estimó que de los 558,000 nuevos casos de RIF-R, el 82% fueron TB multidrogoresistente, por tal se considera que la resistencia a esta droga es un buen marcador de MDR-TB (17). En este sentido, se considera de suma importancia implementar y validar una prueba como el HRM, sencilla, rápida, confiable y de bajo costo, capaz de detectar mutaciones en el gen *rpoB* que confieren resistencia a RIF.

De los 123 aislamientos incluidos en el estudio, 68 presentaron mutaciones en la región *RRDR*, destacando la presencia de diez polimorfismos en 5 posiciones diferentes del gen: Q513P, D516F, D516Y, D516V, H526S, H526D, H526Y, H526L, S531L, L533P. Todas estas mutaciones han sido previamente reportadas en la base de datos de mutaciones de resistencia a los medicamentos contra la tuberculosis (*Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database*, (29)). Cinco cepas con mutación en *rpoB* tuvieron un fenotipo susceptible según los análisis del laboratorio. Precisamente, éstas cepas presentaron mutaciones en D516Y, L533P y H526S, las cuales acorde a publicaciones previas (30), pueden conferir bajos niveles de rifampicina-resistencia por métodos de cultivo estándar (DST), haciéndolas propensas a ser catalogadas erróneamente como susceptibles. Otra posible explicación son las altas tasas de hetero-resistencia halladas en el gen *rpoB* (31). La hetero-resistencia hace referencia a las infecciones múltiples que pueden ocurrir de dos maneras: 1) la co-existencia de dos subpoblaciones (sensible y resistente) de la misma cepa de MTB ó 2) dos cepas que coexisten en la misma muestra (32). Se tienen frecuencias

reportadas del 19, 20 y 34% en Sudáfrica, Uzbekistan e India, respectivamente. Además, se ha visto que la adquisición de resistencia está acompañada por una reducción en la viabilidad en ausencia de la droga (33, 34), si la cepa resistente es una población minoritaria es más difícil de detectar por nuestro ensayo TEMA; aunque este fuera el caso, el análisis por HRM tiene la suficiente sensibilidad para detectar cepas resistentes inmersas en esta muestra clínica (Tabla 2); incluso respaldado por los resultados de secuenciamiento. Una prueba con la sensibilidad necesaria para detectar este tipo de cepas resistentes es importante puesto que alerta sobre el uso de rifampicina y permite su reemplazo por una droga alternativa.

Hubo 4 cepas con fenotipo resistente que no mostraron mutaciones dentro del RRDR analizado, siendo, a su vez, clasificadas erróneamente como susceptibles por HRM. Dos de las cuatro cepas albergaban una mutación localizada hacia el lado amino terminal del cluster I, en la posición 146 (Val>Phe). Esta mutación ha sido reportada previamente como causante de resistencia (34). Ya que la mutación se encuentra fuera de la región blanco del ensayo, se tendría que hacer una amplificación adicional para poder detectarla, pudiendo ser una limitante de este tipo de ensayo. Sin embargo, cabe destacar que nuestro ensayo ha sido diseñado para cubrir el clúster I (codón 507-533) donde ocurren las mutaciones que provocan la CIM más alta para RIF (36, 357). El codón con mayor frecuencia de mutación en *rpoB* es el 531, Ser>Leu (77.93% (35), 64.8% (39)), coincidentemente en nuestro estudio tuvo un 73% de frecuencia y fue correctamente identificado por el ensayo.

Los SNPs de clase III (C>G) y IV (A>T) o también llamadas mutaciones de transversión representan un desafío para nuestro ensayo de HRM. Diez de sesenta y ocho cepas con mutación presentaron este tipo de SNPs y no pudieron ser detectadas. Dado que este tipo de mutaciones implica un intercambio de bases que no altera el número de puentes de hidrógeno

entre ellas, provoca una muy ligera variación en el T_m ($<0.2^\circ\text{C}$) entre una cepa Wt y una mutante; variación que no es suficiente para el poder de resolución de nuestro ensayo ni para una discriminación visual de las curvas.

Algunas metodologías han sido implementadas para superar esta limitante, una de ellas es agregar a la muestra problema un control de DNA secundario, es decir, mezclar volúmenes equivalentes de la muestra y el amplicon de la cepa de referencia H37Rv, luego se somete a una segunda ronda de ciclaje, y si existen mutaciones, se generarán homo y heteroduplex de DNA, alterando así el perfil de la curva de HRM (40). Usando esta estrategia, Hoek *et al.* 2008 (41) logró una sensibilidad de 98% en la detección de resistencia a rifampicina al comparar sus resultados con la prueba de susceptibilidad basada en cultivo. Una segunda estrategia, implica utilizar sondas con nucleótidos ANB (Ácido nucleico bloqueado) dirigidas hacia las mutaciones de transversión más comunes, una amplificación positiva en los canales de fluorescencia seleccionados es un indicador de la presencia de tal mutación. Ésta metodología fue empleada para evaluar 252 aislamientos clínicos, mostrando una sensibilidad y especificidad de la prueba de 91 y 98%, respectivamente (47).

Consideramos que ambos procedimientos incrementan los costos de corrida y dejan atrás la atractiva practicidad del HRM. Además, el reabrir los tubos con productos de PCR, incrementa el riesgo de contaminación cruzada.

En un estudio independiente, analizamos 369 genomas con mutación en *rpoB* para hallar la frecuencia de las transversiones de clase III y IV, hallándose una frecuencia de 4% y 21%, respectivamente. Tomando en cuenta que la proporción de casos de TB-MDR en el Perú (2015) es del 5% (41) del total de casos de TB, estimamos que este tipo de mutaciones de transversión (25% clase III + IV) estará presente en el 1.3% de nuestra población.

Acerca del desempeño de nuestro ensayo de HRM, empleando como método de análisis la discriminación visual de las curvas resistentes, este posee una sensibilidad del 82.4% y una especificidad del 96.4%. El valor de concordancia entre los ensayos de HRM y la prueba de referencia fue de 89% y un valor $\kappa=0.7$, reflejando una buena correspondencia entre ambas pruebas. Sin embargo, al comparar los valores de sensibilidad obtenidos en publicaciones RIF-HRM previas, no se observa un consenso definitivo sobre la sensibilidad de esta prueba (ejm. sens. 89.3% por (42) y sens. 98.6% por (44)). Creemos que esta variación podría verse influenciada por 4 factores: 1) El instrumento y el colorante fluorescente empleado - El termociclador Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen®) parece ser más sensible que el Lightcycler Nano Instrument (Roche®) usado en este estudio, ello puede deberse a que el primero usa como colorante fluorescente EvaGreen® mientras que el LightCycler® 480 utiliza el colorante ResoLight® para el monitoreo de la amplificación y la fase de fusión. La conformación estructural de estos colorantes es diferente; el EvaGreen® está constituido por dos monómeros unidos por un espaciador flexible formando un bucle que cambia al azar al unirse a la doble hebra de DNA generando así fluorescencia, mientras el Resolight es un colorante monomérico simple. Creemos que el primero podría brindar datos más confiables y de mayor resolución, sin embargo, quedaría pendiente confirmar. 2) Procedencia de las cepas - Las características de mutación de las cepas involucradas en la validación del HRM puede variar entre estudios. Ya que la elección de muestras se hace de manera aleatoria considerando solo el perfil fenotípico de las cepas es probable que ésta no refleje la frecuencia real de las mutaciones (gen) en determinada población. Es decir, la frecuencia de mutaciones críticas para el HRM, entiéndase como mutaciones fuera del RRDR o mutaciones de transversión o mutaciones compensatorias, va a variar entre estudios. 3) Prueba de referencia

elegida - Algunos autores consideran la prueba de susceptibilidad fenotípica como la prueba de referencia (22, 44, 45) mientras que otros, como es el caso de este estudio, eligen el secuenciamiento (9, 14, 43). Nuestra elección se basó en que ambas pruebas – HRM y secuenciamiento – tienen una aproximación genotípica, además evitamos la gama de variaciones fenotípicas que expresa cada mutante en particular. A propósito de este tema, la OMS acaba de lanzar una guía técnica donde se detalla un listado de los distintos tipos de mutación encontrados en *rpoB* y el grado de confianza con que ésta mutación está asociada con la resistencia clínica a rifampicina (leve, moderado, alto) (46).

4) Modificaciones a la prueba estándar - Algunos autores han implementado modificaciones al protocolo del HRM convencional para mejorar su sensibilidad, ejm. analizando la fusión de un segmento extra del gen *rpoB* (8) o añadiendo a la muestra problema DNA genómico de la cepa control H37Rv (9) o sintetizando sondas (47) como se mencionó anteriormente.

La urgencia de una prueba sencilla y de bajo costo para el diagnóstico de mutaciones asociadas con resistencia a tuberculosis es bien conocida (48). En este estudio, los costos por corrida fueron de aproximadamente S/. 3.0 nuevos soles por muestra, en comparación a los S/. 142.52 y S/. 33.0 que podría llegar a costar la prueba de Genotype MTBDR*plus* (49) y GeneExpert MDR/TB, respectivamente. El costo de nuestra prueba HRM se redujo aún más al utilizar el método clásico de extracción de DNA por fenol-cloroformo en reemplazo al kit comercial. Sin embargo, por más que se cuidó el desempeño de la prueba supervisando que se tenga la misma concentración de DNA entre muestras, y utilizando una cepa WT extraída con el mismo protocolo para mantener los valores de CT homogéneos, las curvas extraídas con fenol presentaron una mayor dispersión, por ende, una mayor dificultad para la

discriminación visual de cepas mutantes. Probablemente esta sea la razón de la disminución en la sensibilidad/especificidad de la prueba cuando se emplea este método de extracción. No obstante, el estudio presenta la limitante de no haber tratado con la misma población de cepas entre grupos de extracción por lo que no se puede afirmar a cabalidad este enunciado y excluir la influencia intrínseca de las cepas.

Con el objetivo de reducir el efecto de la subjetividad del analista al momento de discriminar las curvas visualmente se optó por implementar un método de análisis cuantitativo, determinando un punto de corte $RFU_{máx}$ para la clasificación de una cepa como mutante. Tras consultar trabajos previos de HRM se verificó que este trabajo es el primero en intentar este tipo de abordaje en el análisis.

Los puntos de corte difirieron al dividir la población de cepas según el método de extracción, siendo para el grupo de fenol cloroformo casi el doble que para el grupo de Kit. Esto es de esperarse debido a la mayor dispersión de las curvas. Por esta razón se sugiere manejar un punto de corte propio de cada grupo. De esa forma se calculó el desempeño de la prueba de acuerdo a este análisis. Viendo un ligero incremento de la sensibilidad en el caso del kit al tratar las muestras por grupos que como un todo.

Al comparar el desempeño de ambos abordajes, cualitativo y cuantitativo, se pudo verificar que ninguna de las diferencias existentes entre los valores de sensibilidad/especificidad de cada grupo es significativa ($p > 0.05$, según McNemar test). Este resultado refuerza la robustez de la prueba de HRM y es un indicio más de la confiabilidad que ofrece la discriminación visual y sencilla para la interpretación de las curvas.

VII. CONCLUSIONES

- El ensayo de High Resolution Melting es una prueba sencilla, rápida, robusta, sensible y de bajo costo, capaz de identificar mutaciones en la región RRDR del gen *rpoB* de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.
- El análisis cualitativo del ensayo de High Resolution Melting mostró sensibilidad de 82.4%, especificidad de 96.4% y valor kappa 0.7 respecto a la prueba de referencia de secuenciamiento de la región RRDR del gen *rpoB*.
- El análisis cuantitativo de los valores máximos de RFU_{max} de las curvas de fusión de HRM mostró sensibilidad de 85.3%, especificidad de 92.7% y valor kappa 0.7 respecto a la prueba de referencia de secuenciamiento de la región RRDR del gen *rpoB*.
- El costo básico del HRM calculado en base a los insumos es 47 veces menor respecto a la prueba Genotype MTBDR_{plus} y 11 veces menor que el GeneXpert MTB/RIF, ambas pruebas con objetivos de diagnóstico similares en TB.

VIII. PERSPECTIVAS

Como primer paso se plantea lograr la detección de cepas con mutaciones de transversión clase III y IV (A>T, C>G) diseñando una sonda (*Locked Nucleic Acid*) de detección dirigida al sitio de mutación más frecuente, D516V. Este paso servirá para corroborar aquellas cepas *Wild Type* por el ensayo de HRM.

Ya que el diagnóstico de resistencia en TB involucra como primer paso el aislamiento de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de especímenes clínicos, nos proponemos como meta ensayar la prueba de HRM directamente a la muestra de esputo, acortando así el tiempo de diagnóstico de manera más efectiva.

Acorde a los resultados obtenidos, no se recomienda el uso de muestras cuyo DNA ha sido extraído con el método de fenol cloroformo ya que provoca la dispersión en las curvas de fusión, haciendo difícil su interpretación por HRM cualitativo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2:16076.
2. Moore DA, Mendoza D, Gilman RH, Evans CA, Hollm Delgado MG, Guerra J, et al. Microscopic observation drug susceptibility assay, a rapid, reliable diagnostic test for multidrug-resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4432-7.
3. Sulis G, Roggi A, Matteelli A, Raviglione MC. Tuberculosis: Epidemiology and Control. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2014;6(1):e2014070.
4. Tiemersma EW, van der Werf MJ, Borgdorff MW, Williams BG, Nagelkerke NJ. Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. *PLoS One*. 2011;6(4):e17601.
5. Arbex MA, Varella MdCL, Siqueira HRd, Mello FAFd. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 2: fármacos de segunda linha. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2010;36:641-56.

6. Gandhi NR, Andrews JR, Brust JCM, Montreuil R, Weissman D, Heo M, et al. Risk Factors for Mortality among MDR- and XDR-TB Patients in a High HIV-Prevalence Setting. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2012;16(1):90-7.
7. World Health Organization. *Global Tuberculosis report*. World Health Organization, 2016.
8. Choi GE, Lee SM, Yi J, Hwang SH, Kim HH, Lee EY, et al. High-Resolution Melting Curve Analysis for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(11):3893-8.
9. Nurwidya F, Handayani D, Burhan E, Yunus F. Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *Chonnam medical journal*. 2018;54(1):1-9.
10. Richter E, Rusch-Gerdes S, Hillemann D. Drug-susceptibility testing in TB: current status and future prospects. *Expert review of respiratory medicine*. 2009;3(5):497-510.
11. Anthwal D, Gupta RK, Bhalla M, Bhatnagar S, Tyagi JS, Haldar S. Direct Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Sputum Samples from Tuberculosis Patients by High-Resolution Melt Curve Analysis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(6):1755-66.

12. World Health Organization, Molecular line probe assays for rapid screening of patient at risk of multidrug-resistant Tuberculosis (MDR-TB). 2018.
13. World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy update. 2013.
14. Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF Assay for Rapid Diagnosis of Tuberculosis and Detection of Rifampin Resistance in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(12):4138-41.
15. Mitchison DA. Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2000;4:796-806.
16. Kurbatova EV, Cavanaugh JS, Shah NS, Wright A, Kim H, Metchock B, et al. Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: susceptibility to isoniazid and other anti-tuberculosis drugs. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2012;16(3):355-7.

17. Lawn SD, Nicol MP. Xpert(R) MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future microbiology*. 2011;6(9):1067-82.
18. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*. 2005;5(1):62.
19. Cai X-C, Xi H, Liang L, Liu J-D, Liu C-H, Xue Y-R, et al. Rifampicin-Resistance Mutations in the rpoB Gene in *Bacillus velezensis* CC09 have Pleiotropic Effects. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:178-.
20. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *The New England journal of medicine*. 2006;355(15):1539-50.
21. Kawai V, Soto G, Gilman RH, Bautista CT, Caviedes L, Huaroto L, et al. Tuberculosis mortality, drug resistance, and infectiousness in patients with and without HIV infection in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(6):1027-33.
22. Galarza M, Fasabi M, Levano KS, Castillo E, Barreda N, Rodriguez M, et al. High-resolution melting analysis for molecular detection of multidrug resistance tuberculosis in Peruvian isolates. *BMC Infectious Diseases*. 2016;16:260.

23. Sambrook J, Russell DW. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. Cold Spring Harbor Protocols. 2006 (1):pdb.prot4455.
24. Unal I. Defining an Optimal Cut-Point Value in ROC Analysis: An Alternative Approach. Computational and mathematical methods in medicine. 2017;2017:3762651.
25. Watson PF, Petrie A. Method agreement analysis: A review of correct methodology. Theriogenology. 2010;73(9):1167-79
26. Arnold C, Westland L, Mowat G, Underwood A, Magee J, Gharbia S. Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis from isolates or directly from sputum. Clinical Microbiology and Infection. 2005;11(2):122-30.
27. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. Biochemia medica. 2012;22(3):276-82.
28. Somasundaram S, Ram A, Sankaranarayanan L. Isoniazid and Rifampicin as Therapeutic Regimen in the Current Era: A Review. Journal of Tuberculosis Research. 2014;Vol.02No.01:12.

29. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. PLOS Medicine. 2009;6(2):e1000002.
30. Van Deun A, Barrera L, Bastian I, Fattorini L, Hoffmann H, Kam KM, et al. Mycobacterium tuberculosis strains with highly discordant rifampin susceptibility test results. J Clin Microbiol. 2009;47(11):3501-6.
31. Kumar P, Balooni V, Sharma BK, Kapil V, Sachdeva KS, Singh S. High degree of multi-drug resistance and hetero-resistance in pulmonary TB patients from Punjab state of India. Tuberculosis. 2014;94(1):73-80.
32. Hofmann-Thiel S, van Ingen J, Feldmann K, Turaev L, Uzakova GT, Murmusaeva G, et al. Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of Mycobacterium tuberculosis in Tashkent, Uzbekistan. The European respiratory journal. 2009;33(2):368-74.
33. Van Deun A, Aung KJ, Bola V, Lebeke R, Hossain MA, de Rijk WB, et al. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard. J Clin Microbiol. 2013;51(8):2633-40.

34. Gillespie SH. Evolution of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(2):267-74.
35. Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutations in the beginning of the rpoB gene can induce resistance to rifamycins in both Helicobacter pylori and Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(4):1075-7.
36. Taniguchi H, Aramaki H, Nikaido Y, Mizuguchi Y, Nakamura M, Koga T, et al. Rifampicin resistance and mutation of the rpoB gene in Mycobacterium tuberculosis. *FEMS microbiology letters*. 1996;144(1):103-8.
37. Jamieson FB, Guthrie JL, Neemuchwala A, Lastovetska O, Melano RG, Mehaffy C. Profiling of rpoB Mutations and MICs for Rifampin and Rifabutin in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(6):2157-62.
38. Ergeshov A, Andreevskaya SN, Larionova EE, Smirnova TG, Chernousova LN. [The Spectrum of Mutations in Genes Associated with Resistance to Rifampicin, Isoniazid, and Fluoroquinolones in the Clinical Strains of M. tuberculosis Reflects the Transmissibility of Mutant Clones]. *Molekuliarnaia biologiiia*. 2017;51(4):595-602

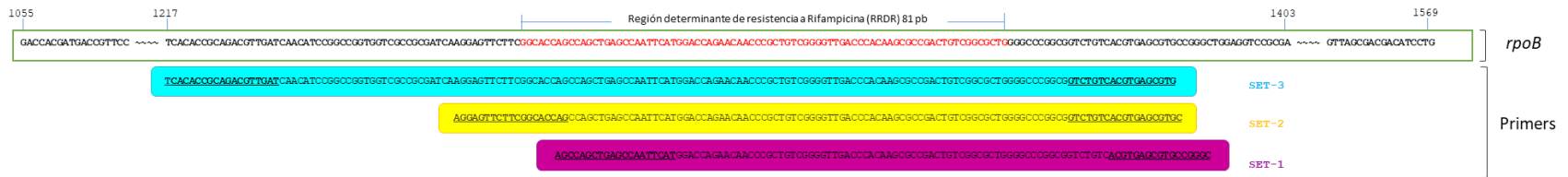
39. Isakova J, Sovkhozova N, Vinnikov D, Goncharova Z, Talaibekova E, Aldasheva N, et al. Mutations of *rpoB*, *katG*, *inhA* and *ahp* genes in rifampicin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyz Republic. *BMC Microbiology*. 2018;18(1):22.
40. Wu S-B, Wirthensohn MG, Hunt P, Gibson JP, Sedgley M. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 2008;118(1):1-14.
41. Hoek KGP, Gey van Pittius NC, Moolman-Smook H, Carelse-Tofa K, Jordaan A, van der Spuy GD, et al. Fluorometric Assay for Testing Rifampin Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(4):1369-73.
42. Alarcón V, Alarcón E, Figueroa C, Mendoza-Ticona A. Tuberculosis en el Perú: Situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. 2017. 2017:12.
43. Ong DCT, Yam W-C, Siu GKH, Lee ASG. Rapid Detection of Rifampicin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by High-Resolution Melting Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(4):1047-54.

44. Pietzka AT, Indra A, Stoger A, Zeinzinger J, Konrad M, Hasenberger P, et al. Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by *rpoB* gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(6):1121-7.
45. Nour MS, El-Shokry MH, Shehata IH, Abd-El Aziz AM. Evaluation of rezasurin microtiter assay and high resolution melting curve analysis for detection of rifampicin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Clinical laboratory*. 2013;59(7-8):763-71.
46. World Health Organization, FIND. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. 2018
47. Ramirez MV, Cowart KC, Campbell PJ, Morlock GP, Sikes D, Winchell JM, et al. Rapid Detection of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Use of Real-Time PCR and High-Resolution Melt Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(11):4003-9.
48. Zhang A, Jumbe E, Krysiak R, Sidiki S, Kelley HV, Chemey EK, et al. Low-cost diagnostic test for susceptible and drug-resistant tuberculosis in rural Malawi. *African Journal of Laboratory Medicine*. 2018;7(1):690.

49. Solari L, Gutiérrez-Aguado A, Jave O, Suárez C, Castillo E, Yale G, et al. Análisis de costos de los métodos rápidos para diagnóstico de Tuberculosis multidrogorresistente en diferentes grupos epidemiológicos del Perú. 2011. 2011.

ANEXO

UBICACIÓN DE PRIMERS SINTETIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *rpoB*



Nota: El par de primers empleados para la detección de mutaciones que confieren resistencia a rifampicina por HRM corresponden al Set-3 (resaltado en celeste).

PROTOCOLO PCR-HRM OPTIMIZADO

PREPARACIÓN DE MASTER MIX

Componente	Conc. Inicial	Conc. Final	1 Rx (μ l)
HRM MMix Roche	2X	1X	10
MgCl ₂	25Mm	2.5mM	2
Primers	10 μ M	0.5 μ M	1
H ₂ O	-	-	4
DNA	10 ng/ μ l	1 ng/ μ l	2
Total vol.			20

Programa PCR-HRM Light Cyclor Nano Software

1. HOLD

Temp (°C)	95
Rampa (°C/s)	4.4
Hold (s)	600

2. 3-Step Amplification (45 cycles)

Temp (°C)	Rampa (°C/s)	Hold (s)	Adquisición
95	4.4	10	Denaturación
58	2.2	15	Anillamiento
72	4.4	10	√ Elongación

3. HOLD

Temp (°C)	95
Rampa (°C/s)	4
Hold (s)	60

4. HOLD

Temp (°C)	40
Rampa (°C/s)	4
Hold (s)	60

5. High Resolution Melting

	Temp (°C)	85
Fase Inicial	Rampa (°C/s)	4
	Hold (s)	1

Temp (°C) 95

Fase Final Rampa (°C/s) 0.05

Hold (s) 1

6. HOLD

Temp (°C) 40

Rampa (°C/s) 2.2

Hold (s) 10

BASE DE DATOS DE CEPAS INCORPORADAS EN EL ESTUDIO

Met. Extrac ^a	ID_cepa	Mutación <i>rpoB</i>	Clasificación mut seq.	RFU _{máx}	HRM cualitativo	HRM Cuantitativo		
						Cut-off (0.1132)	Cut-off p/KIT (0.0661)	Cut-off p/FC (0.1397)
1	MDRMA2019	WT	0	0.0508	0	0	0	
1	MDRMA2260	WT	0	0.0271	0	0	0	
1	MDRMD1027	1349	1	0.1857	1	1	1	
1	MDRMD1098	1349	1	0.1853	1	1	1	
1	TBDM425	1349	1	0.1988	1	1	1	
1	TBDM2444	WT	0	0.0074	0	0	0	
1	TBDM2489	WT	0	0.0162	0	0	0	
1	CSV383	1349	1	0.1764	1	1	1	
1	CSV4519	WT	0	0.0407	0	0	0	
1	CSV4644	WT	0	0.0208	0	0	0	
1	CSV5769	1349	1	0.1847	1	1	1	
1	CSV10399	1349	1	0.1856	1	1	1	
1	TBV4766	WT	0	0.0025	0	0	0	
1	LN55	1349	1	0.1699	1	1	1	
1	LN180	1349	1	0.1912	1	1	1	
1	LN763	WT	0	0.0564	0	0	0	
1	LN2900	WT	0	0.0771	0	0	1	
1	LN3588	WT	0	0.0338	0	0	0	
1	LN3756	1349	1	0.1638	1	1	1	
1	LE13	1349	1	0.1861	1	1	1	
1	LE486	1349	1	0.1937	1	1	1	
1	SLM36	1349	1	0.1849	1	1	1	
1	SLM40	1349	1	0.1797	1	1	1	

1	SLM60	1303, 1304	1	0.1981	1	1	1	
1	SLM63	1304	1	0.0661	0	0	1	
1	SLM88	1304	1	0.0511	0	0	0	
1	SLM100	1349	1	0.1804	1	1	1	
1	ME1473	1349	1	0.1738	1	1	1	
1	MDRMA1565	1303, 1304	1	0.2013	1	1	1	
1	TBV4952	1333, 1334	1	0.0711	0	0	1	
1	MDRDM1081	1355	1	0.1573	1	1	1	
1	CSV11678	1349	1	0.0204	0	0	0	
1	MDRMA2491	1304	1	0.0781	0	0	1	
1	TBDM 2487	1285	1	0.1819	1	1	1	
1	MDRDM 827	1355	1	0.1683	1	1	1	
1	MDRDM 627	1349	1	0.1932	1	1	1	
1	CSV 3611	WT	0	0.0061	0	0	0	
1	LE 371	1349	1	0.2147	1	1	1	
1	TBDM 554	WT	0	0.0281	0	0	0	
1	TBDM 1506	WT	0	0.0191	0	0	0	
1	TBDM 2000	WT	0	0.0219	0	0	0	
1	MDRMA 295	WT	0	0.0053	0	0	0	
1	MDRMA 2441	WT	0	0.0343	0	0	0	
1	MDRMA 701	WT	0	0.0229	0	0	0	
1	TBDM 2189	WT	0	0.0282	0	0	0	
1	MDRMA 2082	WT	0	0.0079	0	0	0	
1	LE 63	WT	0	0.0557	0	0	0	
1	LE 79	WT	0	0.0068	0	0	0	
1	LE 410	WT	0	0.0034	0	0	0	
1	LN 3589	WT	0	0.0428	0	0	0	
1	LN 3668	WT	0	0.0129	0	0	0	
1	LN 3672	WT	0	0.0017	0	0	0	

1	LN 3695	WT	0	0.0188	0	0	0	
1	TBDM 2699	WT	0	0.0213	0	0	0	
1	TBDM 2717	WT	0	0.0155	0	0	0	
1	LE 76	WT	0	0.0073	0	0	0	
1	LN 2358	1349	1	0.1784	1	1	1	
1	LN 3584	WT	0	0.0283	0	0	0	
1	TBV 4768	WT	0	0.0432	0	0	0	
1	TBV 5000	1349	1	0.1395	1	1	1	
1	TBV 5362	1349	1	0.1608	1	1	1	
1	TBV 5365	1349	1	0.1728	1	1	1	
1	LE 492	1349	1	0.1681	1	1	1	
1	MDRDM 260	1349	1	0.1612	1	1	1	
1	MDRMA863	WT	0	0.0386	0	0	0	
1	SLM056	1349	1	0.1790	1	1	1	
1	LN1100	WT	0	0.0009	0	0	0	
1	LN1856	1304	1	0.0039	0	0	0	
1	CSV9577	WT	0	0.0107	0	0	0	
1	LE103	WT	0	0.0274	0	0	0	
1	LN317	WT	0	0.0248	0	0	0	
1	MDRMA203	WT	0	0.0104	0	0	0	
2	LN153	1349	1	0.1435	1	1		1
2	LN321	1349	1	0.0954	1	0		0
2	LN598	1334	1	0.0531	0	0		0
2	LN2357	1349	1	0.1849	1	1		1
2	LN36	WT	0	0.0182	0	0		0
2	LN68	WT	0	0.0430	0	0		0
2	LN206	WT	0	0.0214	0	0		0
2	LE9501	1349	1	0.1397	1	1		1
2	LE9504	1349	1	0.1543	1	1		1

2	LE9507	1349	1	0.1497	1	1		1
2	LE9508	1333	1	0.2215	1	1		1
2	LE9510	1349	1	0.1794	1	1		1
2	LE9566	1349	1	0.1712	1	1		1
2	MDRMA158	WT	0	0.1853	1	1		1
2	MDRMA1801	1333	1	0.0398	0	0		0
2	MDRMA10	WT	0	0.0794	0	0		0
2	MDRMA100	WT	0	0.0213	0	0		0
2	DMEP57	WT	0	0.0269	0	0		0
2	DMEP277	WT	0	0.0181	0	0		0
2	DMEP1015	1303	1	0.1654	1	1		1
2	MDRDM0003	1349	1	0.1851	1	1		1
2	MDRDM0075	1349	1	0.2444	1	1		1
2	MDRDM0081	1349	1	0.1679	1	1		1
2	MDRDM0086	1349	1	0.1354	1	1		0
2	MDRDM0137	1349	1	0.1477	1	1		1
2	MDRDM0005	WT	0	0.0456	0	0		0
2	MDRDM0009	WT	0	0.0503	0	0		0
2	MDRDM0061	WT	0	0.0335	0	0		0
2	LN467	1304	1	0.1226	0	1		0
2	LN2349	WT	0	0.0559	0	0		0
2	LN2413	1349	1	0.2764	1	1		1
2	LN84	WT	0	0.1096	0	0		0
2	LE9521	1333	1	0.3215	1	1		1
2	LE9536	WT	0	0.2545	1	1		1
2	LE9547	WT	0	0.0733	0	0		0
2	MDRMA356	1334	1	0.1406	0	1		1
2	MDRMA507	1304	1	0.0525	0	0		0
2	MDRMA1027	1349	1	0.2958	1	1		1

2	MDRMA1029	1349	1	0.4823	1	1		1
2	MDRMA57	WT	0	0.1111	0	0		0
2	MDRMA85	WT	0	0.1342	0	1		0
2	TBME1464	1349	1	0.2739	1	1		1
2	DMEP545	1349	1	0.2723	1	1		1
2	TBME1527	1349	1	0.3212	1	1		1
2	TBME150	1349	1	0.2119	1	1		1
2	TBME127	WT	0	0.1359	0	1		0
2	MDRDM0092	1349	1	0.2727	1	1		1
2	MDRDM0104	1349	1	0.2748	1	1		1
2	MDRDM0129	1349	1	0.2911	1	1		1
2	MDRDM0148	1349	1	0.3072	1	1		1
2	MDRDM0151	1304	1	0.1132	0	1		0

^aMétodo de extracción: (1) DNA de cepas extraídas con kit, (2) DNA de cepas extraídas con el método de fenol cloroformo.

DETALLE DE DATOS PARA LA ELABORACIÓN DE CURVAS ROC

*Se encuentra resaltado los valores de punto de corte empleados

PUNTOS DE CORTE CONSIDERANDO TODAS LAS CEPAS ESTUDIADAS

Punto de Corte	Sensibilidad	Especificidad	Clasificados Correctamente	LR+	LR-	Índice J
(>= .0009)	1.00	0.00	55.28%	1.00		0.00
(>= .0017)	1.00	0.02	56.10%	1.02	0.00	0.02
(>= .0025)	1.00	0.04	56.91%	1.04	0.00	0.04
(>= .0034)	1.00	0.05	57.72%	1.06	0.00	0.05
(>= .0039)	1.00	0.07	58.54%	1.08	0.00	0.07
(>= .0053)	0.99	0.07	57.72%	1.06	0.20	0.06
(>= .0061)	0.99	0.09	58.54%	1.08	0.16	0.08
(>= .0068)	0.99	0.11	59.35%	1.11	0.13	0.09
(>= .0073)	0.99	0.13	60.16%	1.13	0.12	0.11
(>= .0074)	0.99	0.15	60.98%	1.15	0.10	0.13
(>= .0079)	0.99	0.16	61.79%	1.18	0.09	0.15
(>= .0104)	0.99	0.18	62.60%	1.20	0.08	0.17
(>= .0107)	0.99	0.20	63.41%	1.23	0.07	0.19
(>= .0129)	0.99	0.22	64.23%	1.26	0.07	0.20
(>= .0155)	0.99	0.24	65.04%	1.29	0.06	0.22
(>= .0162)	0.99	0.25	65.85%	1.32	0.06	0.24
(>= .0181)	0.99	0.27	66.67%	1.35	0.05	0.26
(>= .0182)	0.99	0.29	67.48%	1.39	0.05	0.28
(>= .0188)	0.99	0.31	68.29%	1.43	0.05	0.29
(>= .0191)	0.99	0.33	69.11%	1.46	0.04	0.31
(>= .0204)	0.99	0.35	69.92%	1.51	0.04	0.33
(>= .0208)	0.97	0.35	69.11%	1.48	0.09	0.32
(>= .0213)	0.97	0.36	69.92%	1.53	0.08	0.33
(>= .0214)	0.97	0.40	71.54%	1.62	0.07	0.37
(>= .0219)	0.97	0.42	72.36%	1.67	0.07	0.39
(>= .0229)	0.97	0.44	73.17%	1.72	0.07	0.41
(>= .0248)	0.97	0.45	73.98%	1.78	0.06	0.43
(>= .0269)	0.97	0.47	74.80%	1.84	0.06	0.44
(>= .0271)	0.97	0.49	75.61%	1.91	0.06	0.46
(>= .0274)	0.97	0.51	76.42%	1.98	0.06	0.48
(>= .0281)	0.97	0.53	77.24%	2.05	0.06	0.50

(>= .0282)	0.97	0.55	78.05%	2.14	0.05	0.52
(>= .0283)	0.97	0.56	78.86%	2.22	0.05	0.53
(>= .0335)	0.97	0.58	79.67%	2.32	0.05	0.55
(>= .0338)	0.97	0.60	80.49%	2.43	0.05	0.57
(>= .0343)	0.97	0.62	81.30%	2.54	0.05	0.59
(>= .0386)	0.97	0.64	82.11%	2.67	0.05	0.61
(>= .0398)	0.97	0.65	82.93%	2.81	0.04	0.63
(>= .0407)	0.96	0.65	82.11%	2.77	0.07	0.61
(>= .0428)	0.96	0.67	82.93%	2.92	0.07	0.63
(>= .043)	0.96	0.69	83.74%	3.09	0.06	0.65
(>= .0432)	0.96	0.71	84.55%	3.29	0.06	0.67
(>= .0456)	0.96	0.73	85.37%	3.50	0.06	0.68
(>= .0503)	0.96	0.75	86.18%	3.76	0.06	0.70
(>= .0508)	0.96	0.76	86.99%	4.04	0.06	0.72
(>= .0511)	0.96	0.78	87.80%	4.38	0.06	0.74
(>= .0525)	0.94	0.78	86.99%	4.31	0.08	0.72
(>= .0557)	0.93	0.78	86.18%	4.25	0.09	0.71
(>= .0559)	0.93	0.80	86.99%	4.63	0.09	0.73
(>= .0564)	0.93	0.82	87.80%	5.10	0.09	0.74
(>= .0617)	0.93	0.84	88.62%	5.66	0.09	0.76
(>= .0661)	0.91	0.84	87.80%	5.57	0.11	0.75
(>= .0711)	0.90	0.84	86.99%	5.48	0.12	0.73
(>= .0733)	0.88	0.84	86.18%	5.39	0.14	0.72
(>= .0771)	0.88	0.85	86.99%	6.07	0.14	0.74
(>= .0781)	0.88	0.87	87.80%	6.93	0.13	0.76
(>= .0794)	0.87	0.87	86.99%	6.82	0.15	0.74
(>= .0954)	0.87	0.89	87.80%	7.95	0.15	0.76
(>= .1096)	0.85	0.89	86.99%	7.82	0.17	0.74
(>= .1111)	0.85	0.91	87.80%	9.38	0.16	0.76
(>= .1132)	0.85	0.93	88.62%	11.73	0.16	0.78
(>= .1226)	0.84	0.93	87.80%	11.53	0.17	0.77
(>= .1342)	0.82	0.93	86.99%	11.32	0.19	0.75
(>= .1354)	0.82	0.95	87.80%	15.10	0.19	0.77
(>= .1359)	0.81	0.95	86.99%	14.83	0.20	0.75
(>= .1395)	0.81	0.96	87.80%	22.24	0.20	0.77
(>= .1397)	0.79	0.96	86.99%	21.84	0.21	0.76
(>= .1406)	0.78	0.96	86.18%	21.43	0.23	0.74
(>= .1435)	0.76	0.96	85.37%	21.03	0.24	0.73
(>= .1477)	0.75	0.96	84.55%	20.63	0.26	0.71
(>= .1497)	0.74	0.96	83.74%	20.22	0.27	0.70
(>= .1543)	0.72	0.96	82.93%	19.82	0.29	0.68
(>= .1573)	0.71	0.96	82.11%	19.41	0.31	0.67

(>= .1608)	0.69	0.96	81.30%	19.01	0.32	0.65
(>= .1612)	0.68	0.96	80.49%	18.60	0.34	0.64
(>= .1638)	0.66	0.96	79.67%	18.20	0.35	0.63
(>= .1654)	0.65	0.96	78.86%	17.79	0.37	0.61
(>= .1679)	0.63	0.96	78.05%	17.39	0.38	0.60
(>= .1681)	0.62	0.96	77.24%	16.99	0.40	0.58
(>= .1683)	0.60	0.96	76.42%	16.58	0.41	0.57
(>= .1699)	0.59	0.96	75.61%	16.18	0.43	0.55
(>= .1712)	0.57	0.96	74.80%	15.77	0.44	0.54
(>= .1728)	0.56	0.96	73.98%	15.37	0.46	0.52
(>= .1738)	0.54	0.96	73.17%	14.96	0.47	0.51
(>= .1764)	0.53	0.96	72.36%	14.56	0.49	0.49
(>= .1784)	0.51	0.96	71.54%	14.15	0.50	0.48
(>= .179)	0.50	0.96	70.73%	13.75	0.52	0.46
(>= .1794)	0.49	0.96	69.92%	13.35	0.53	0.45
(>= .1797)	0.47	0.96	69.11%	12.94	0.55	0.43
(>= .1804)	0.46	0.96	68.29%	12.54	0.56	0.42
(>= .1819)	0.44	0.96	67.48%	12.13	0.58	0.40
(>= .1847)	0.43	0.96	66.67%	11.73	0.60	0.39
(>= .1849)	0.41	0.96	65.85%	11.32	0.61	0.38
(>= .1851)	0.38	0.96	64.23%	10.51	0.64	0.35
(>= .1853)	0.37	0.96	63.41%	10.11	0.66	0.33
(>= .1856)	0.35	0.98	63.41%	19.41	0.66	0.33
(>= .1857)	0.34	0.98	62.60%	18.60	0.67	0.32
(>= .1861)	0.32	0.98	61.79%	17.79	0.69	0.31
(>= .1912)	0.31	0.98	60.98%	16.99	0.70	0.29
(>= .1932)	0.29	0.98	60.16%	16.18	0.72	0.28
(>= .1937)	0.28	0.98	59.35%	15.37	0.73	0.26
(>= .1981)	0.26	0.98	58.54%	14.56	0.75	0.25
(>= .1988)	0.25	0.98	57.72%	13.75	0.76	0.23
(>= .2013)	0.24	0.98	56.91%	12.94	0.78	0.22
(>= .2119)	0.22	0.98	56.10%	12.13	0.79	0.20
(>= .2147)	0.21	0.98	55.28%	11.32	0.81	0.19
(>= .2215)	0.19	0.98	54.47%	10.51	0.82	0.17
(>= .2444)	0.18	0.98	53.66%	9.71	0.84	0.16
(>= .2545)	0.16	0.98	52.85%	8.90	0.85	0.14
(>= .2723)	0.16	1.00	53.66%		0.84	0.16
(>= .2727)	0.15	1.00	52.85%		0.85	0.15
(>= .2739)	0.13	1.00	52.03%		0.87	0.13
(>= .2748)	0.12	1.00	51.22%		0.88	0.12
(>= .2764)	0.10	1.00	50.41%		0.90	0.10
(>= .2911)	0.09	1.00	49.59%		0.91	0.09

(>= .2958)	0.07	1.00	48.78%		0.93	0.07
(>= .3072)	0.06	1.00	47.97%		0.94	0.06
(>= .3212)	0.04	1.00	47.15%		0.96	0.04
(>= .3215)	0.03	1.00	46.34%		0.97	0.03
(>= .4823)	0.01	1.00	45.53%		0.99	0.01
(> .4823)	0.00	1.00	44.72%		1.00	0.00

PUNTOS DE CORTE CONSIDERANDO CEPAS EXTRAÍDAS CON KIT

Punto de Corte	Sensibilidad	Especificidad	Clasificados Correctamente	LR+	LR-	Índice J
(>= .0009)	1.00	0.00	48.61%	1.00		0.00
(>= .0017)	1.00	0.03	50.00%	1.03	0.00	0.03
(>= .0025)	1.00	0.05	51.39%	1.06	0.00	0.05
(>= .0034)	1.00	0.08	52.78%	1.09	0.00	0.08
(>= .0039)	1.00	0.11	54.17%	1.12	0.00	0.11
(>= .0053)	0.97	0.11	52.78%	1.09	0.26	0.08
(>= .0061)	0.97	0.14	54.17%	1.12	0.21	0.11
(>= .0068)	0.97	0.16	55.56%	1.16	0.18	0.13
(>= .0073)	0.97	0.19	56.94%	1.20	0.15	0.16
(>= .0074)	0.97	0.22	58.33%	1.24	0.13	0.19
(>= .0079)	0.97	0.24	59.72%	1.28	0.12	0.21
(>= .0104)	0.97	0.27	61.11%	1.33	0.11	0.24
(>= .0107)	0.97	0.30	62.50%	1.38	0.10	0.27
(>= .0129)	0.97	0.32	63.89%	1.44	0.09	0.30
(>= .0155)	0.97	0.35	65.28%	1.50	0.08	0.32
(>= .0162)	0.97	0.38	66.67%	1.56	0.08	0.35
(>= .0188)	0.97	0.41	68.06%	1.63	0.07	0.38
(>= .0191)	0.97	0.43	69.44%	1.71	0.07	0.40
(>= .0204)	0.97	0.46	70.83%	1.80	0.06	0.43
(>= .0208)	0.94	0.46	69.44%	1.74	0.12	0.40
(>= .0213)	0.94	0.49	70.83%	1.84	0.12	0.43
(>= .0219)	0.94	0.51	72.22%	1.94	0.11	0.46
(>= .0229)	0.94	0.54	73.61%	2.05	0.11	0.48
(>= .0248)	0.94	0.57	75.00%	2.18	0.10	0.51
(>= .0271)	0.94	0.59	76.39%	2.33	0.10	0.54
(>= .0274)	0.94	0.62	77.78%	2.49	0.09	0.56
(>= .0281)	0.94	0.65	79.17%	2.68	0.09	0.59
(>= .0282)	0.94	0.68	80.56%	2.91	0.08	0.62
(>= .0283)	0.94	0.70	81.94%	3.17	0.08	0.65

(>= .0338)	0.94	0.73	83.33%	3.49	0.08	0.67
(>= .0343)	0.94	0.76	84.72%	3.88	0.08	0.70
(>= .0386)	0.94	0.78	86.11%	4.36	0.07	0.73
(>= .0407)	0.94	0.81	87.50%	4.98	0.07	0.75
(>= .0428)	0.94	0.84	88.89%	5.81	0.07	0.78
(>= .0432)	0.94	0.86	90.28%	6.98	0.07	0.81
(>= .0508)	0.94	0.89	91.67%	8.72	0.06	0.83
(>= .0511)	0.94	0.92	93.06%	11.63	0.06	0.86
(>= .0557)	0.91	0.92	91.67%	11.28	0.09	0.83
(>= .0564)	0.91	0.95	93.06%	16.91	0.09	0.86
(>= .0661)	0.91	0.97	94.44%	33.83	0.09	0.89
(>= .0711)	0.89	0.97	93.06%	32.77	0.12	0.86
(>= .0771)	0.86	0.97	91.67%	31.71	0.15	0.83
(>= .0781)	0.86	1.00	93.06%		0.14	0.86
(>= .1395)	0.83	1.00	91.67%		0.17	0.83
(>= .1573)	0.80	1.00	90.28%		0.20	0.80
(>= .1608)	0.77	1.00	88.89%		0.23	0.77
(>= .1612)	0.74	1.00	87.50%		0.26	0.74
(>= .1638)	0.71	1.00	86.11%		0.29	0.71
(>= .1681)	0.69	1.00	84.72%		0.31	0.69
(>= .1683)	0.66	1.00	83.33%		0.34	0.66
(>= .1699)	0.63	1.00	81.94%		0.37	0.63
(>= .1728)	0.60	1.00	80.56%		0.40	0.60
(>= .1738)	0.57	1.00	79.17%		0.43	0.57
(>= .1764)	0.54	1.00	77.78%		0.46	0.54
(>= .1784)	0.51	1.00	76.39%		0.49	0.51
(>= .179)	0.49	1.00	75.00%		0.51	0.49
(>= .1797)	0.46	1.00	73.61%		0.54	0.46
(>= .1804)	0.43	1.00	72.22%		0.57	0.43
(>= .1819)	0.40	1.00	70.83%		0.60	0.40
(>= .1847)	0.37	1.00	69.44%		0.63	0.37
(>= .1849)	0.34	1.00	68.06%		0.66	0.34
(>= .1853)	0.31	1.00	66.67%		0.69	0.31
(>= .1856)	0.29	1.00	65.28%		0.71	0.29
(>= .1857)	0.26	1.00	63.89%		0.74	0.26
(>= .1861)	0.23	1.00	62.50%		0.77	0.23
(>= .1912)	0.20	1.00	61.11%		0.80	0.20
(>= .1932)	0.17	1.00	59.72%		0.83	0.17
(>= .1937)	0.14	1.00	58.33%		0.86	0.14
(>= .1981)	0.11	1.00	56.94%		0.89	0.11
(>= .1988)	0.09	1.00	55.56%		0.91	0.09
(>= .2013)	0.06	1.00	54.17%		0.94	0.06

(>= .2147)	0.03	1.00	52.78%		0.97	0.03
(> .2147)	0.00	1.00	51.39%		1.00	0.00

PUNTOS DE CORTE CONSIDERANDO CEPAS EXTRAÍDAS POR EL MÉTODO DE FENOL CLOROFORMO

Punto de Corte	Sensibilidad	Especificidad	Clasificados Correctamente	LR+	LR-	Índice J
(>= .0181)	1.00	0.00	64.71%	1.00		0.00
(>= .0182)	1.00	0.06	66.67%	1.06	0.00	0.06
(>= .0213)	1.00	0.11	68.63%	1.13	0.00	0.11
(>= .0214)	1.00	0.17	70.59%	1.20	0.00	0.17
(>= .0269)	1.00	0.22	72.55%	1.29	0.00	0.22
(>= .0335)	1.00	0.28	74.51%	1.38	0.00	0.28
(>= .0398)	1.00	0.33	76.47%	1.50	0.00	0.33
(>= .043)	0.97	0.33	74.51%	1.45	0.09	0.30
(>= .0456)	0.97	0.39	76.47%	1.59	0.08	0.36
(>= .0503)	0.97	0.44	78.43%	1.75	0.07	0.41
(>= .0525)	0.97	0.50	80.39%	1.94	0.06	0.47
(>= .0559)	0.94	0.50	78.43%	1.88	0.12	0.44
(>= .0617)	0.94	0.56	80.39%	2.11	0.11	0.50
(>= .0733)	0.91	0.56	78.43%	2.05	0.16	0.46
(>= .0794)	0.91	0.61	80.39%	2.34	0.15	0.52
(>= .0954)	0.91	0.67	82.35%	2.73	0.14	0.58
(>= .1096)	0.88	0.67	80.39%	2.64	0.18	0.55
(>= .1111)	0.88	0.72	82.35%	3.16	0.17	0.60
(>= .1132)	0.88	0.78	84.31%	3.95	0.16	0.66
(>= .1226)	0.85	0.78	82.35%	3.82	0.19	0.63
(>= .1342)	0.82	0.78	80.39%	3.68	0.23	0.60
(>= .1354)	0.82	0.83	82.35%	4.91	0.22	0.65
(>= .1359)	0.79	0.83	80.39%	4.73	0.25	0.62
(>= .1397)	0.79	0.89	82.35%	7.09	0.24	0.68
(>= .1406)	0.76	0.89	80.39%	6.82	0.27	0.65
(>= .1435)	0.73	0.89	78.43%	6.55	0.31	0.62
(>= .1477)	0.70	0.89	76.47%	6.27	0.34	0.59
(>= .1497)	0.67	0.89	74.51%	6.00	0.38	0.56
(>= .1543)	0.64	0.89	72.55%	5.73	0.41	0.53
(>= .1654)	0.61	0.89	70.59%	5.45	0.44	0.50
(>= .1679)	0.58	0.89	68.63%	5.18	0.48	0.46

(>= .1712)	0.55	0.89	66.67%	4.91	0.51	0.43
(>= .1794)	0.52	0.89	64.71%	4.64	0.55	0.40
(>= .1849)	0.48	0.89	62.75%	4.36	0.58	0.37
(>= .1851)	0.45	0.89	60.78%	4.09	0.61	0.34
(>= .1853)	0.42	0.89	58.82%	3.82	0.65	0.31
(>= .2119)	0.42	0.94	60.78%	7.64	0.61	0.37
(>= .2215)	0.39	0.94	58.82%	7.09	0.64	0.34
(>= .2444)	0.36	0.94	56.86%	6.55	0.67	0.31
(>= .2545)	0.33	0.94	54.90%	6.00	0.71	0.28
(>= .2723)	0.33	1.00	56.86%		0.67	0.33
(>= .2727)	0.30	1.00	54.90%		0.70	0.30
(>= .2739)	0.27	1.00	52.94%		0.73	0.27
(>= .2748)	0.24	1.00	50.98%		0.76	0.24
(>= .2764)	0.21	1.00	49.02%		0.79	0.21
(>= .2911)	0.18	1.00	47.06%		0.82	0.18
(>= .2958)	0.15	1.00	45.10%		0.85	0.15
(>= .3072)	0.12	1.00	43.14%		0.88	0.12
(>= .3212)	0.09	1.00	41.18%		0.91	0.09
(>= .3215)	0.06	1.00	39.22%		0.94	0.06
(>= .4823)	0.03	1.00	37.25%		0.97	0.03
(> .4823)	0.00	1.00	35.29%		1.00	0.00