



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**Comparación de 2 tratamientos de descontaminación y 3 kits  
comerciales de extracción de ADN de muestras de esputo de pacientes  
con *Mycobacterium tuberculosis* para aplicaciones futuras en  
secuenciación**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor

Jimena Belen Raez Pereyra

Asesor

Dra. Patricia Sheen Cortavarria

Lima, Perú

**2025**

**Jurado calificador**

**Presidente:** Dra. Melissa Marlene Mendez Aranda

**Vocal:** Dr. Wilfredo Evangelista Falcon

**Secretario:** Dra. Maritza Mercedes Calderon Sanchez de Jimenez

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	RAEZ PEREYRA JIMENA BELEN

Pertencientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**, autores del trabajo titulado: **Comparación de 2 tratamientos de descontaminación y 3 kits comerciales de extracción de ADN de muestras de esputo de pacientes con *Mycobacterium tuberculosis* para aplicaciones futuras en secuenciación**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	SHEEN CORTAVARRIA PATRICIA	FACI	ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **12%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3358300900**; fecha de entrega: **01/10/2025**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: Lima, 01 de octubre de 2025



Firma del asesor

Nº DNI: 09541127

ORCID: 0000-0002-7118-9301

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y mi familia por apoyarme en mis estudios. A los Dres. Patricia Sheen y Mirko Zimic, que me aceptaron en su laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular desde un inicio sin ninguna experiencia previa, en donde he podido formarme como científica. A los integrantes del laboratorio por ser esa segunda casa y por dar su apoyo cuando los experimentos no salen como uno espera. Especialmente quiero agradecer a Candy León quien fue mi guía del laboratorio y supo comprender las limitaciones que a veces uno tiene como un estudiante que va a clases y a la vez hace su tesis. A Kevin Obando quien, a pesar de nuestras diferencias en las formas de trabajar en el laboratorio, siempre me ha impulsado a buscar más allá de un simple experimento y a no rendirme cuando no sale como esperaba. Asimismo, agradecer a mis amigos que me apoyaron en los distintos grupos estudiantiles que he sido parte: Journal Club UPCH, Proyecto HeLa y Biofab. Finalmente, agradezco a todos mis amigos que me apoyaron a lo largo de mi tesis y carrera: Melissa, Diolu, Arturo, Rodolfo, Marco, Luis, Kiara, Brigitte, Mishell, Macarena, Piero y Lizardo.

## ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	3
1.1 La enfermedad de tuberculosis	3
1.2 Resistencia de <i>M. tuberculosis</i> a diferentes fármacos	4
1.3 Técnicas “gold standard” de detección de <i>M. tuberculosis</i>	4
1.4 Secuenciación del genoma completo (WGS) para el estudio de <i>M. tuberculosis</i> de muestras clínicas	5
1.5 Tratamiento y extracción de ADN de las muestras de esputo	5
1.5.1 Tratamiento con NaOH-NALC	6
1.5.2 Tratamiento con saponina	6
1.5.3 Extracción de ADN	7
1.6 Antecedentes	8
II. Planteamiento del problema	10
III. Pregunta de investigación	12
IV. Objetivo general	12
V. Objetivos específicos	12
VI. Materiales y métodos	13
6.1 Muestras y aspectos éticos	14
6.1.1 Recolección	14
6.1.2 Tamaño muestral	15
6.1.3 Transporte	15
6.1.4 Criterios de inclusión de las muestras	16
6.1.5 Criterios de exclusión	16
6.1.6 Consideraciones éticas	17
6.1.7 Normas de Bioseguridad	17
6.2 1era fase: Comparación de tratamientos	17
6.2.1 Tratamiento con NaOH-NALC	17
6.2.2 Tratamiento con saponina	18
6.2.3 Extracción de ADN	19
6.2.4 Evaluación de la calidad	19

6.2.5	Cuantificación del ADN	19
6.2.6	Relación del ADN humano con el ADN de MTB	20
6.3	2da fase: Comparación de kits de extracción de ADN comerciales	20
6.3.1	Tratamiento con NaOH-NALC	20
6.3.2	Extracción de ADN	21
6.3.3	Evaluación de la calidad del ADN	24
6.3.4	Cuantificación del ADN	24
6.4	Análisis estadístico	24
VII.	Resultados	25
7.1	Fase 1: Comparación de los tratamientos con NaOH-NALC y saponina	25
7.1.1	Cantidad de ADN	25
7.1.2	Calidad del ADN	27
7.1.3	Relación ADN de <i>H. sapiens</i> y <i>M. tuberculosis</i>	29
7.2	Fase 2: Comparaciones de kits de extracción de ADN comerciales	35
7.2.1	Cantidad de ADN	35
7.2.2	Calidad del ADN	36
VIII.	Discusión	38
8.1	Evaluación del efecto del tratamiento con NaOH-NALC o saponina	38
8.1.1	Sin tratamiento	40
8.1.2	Tratamiento con NaOH-NALC	40
8.1.3	Tratamiento con saponina	41
8.1.4	Cantidad y calidad del ADN extraído	41
8.1.5	Relación entre ADN de MTB y ADN humano	42
8.1.6	Evaluación de complejidad, costos y recursos	43
8.2	Comparación entre los kits comerciales de extracción de ADN	44
8.2.1	Cantidad de ADN extraído	48
8.2.2	Calidad del ADN extraído	49
8.2.3	Evaluación de costos y recursos	50
8.3	Implicaciones para la Secuenciación de Nueva Generación (NGS)	50
8.4	Limitaciones y futuras direcciones	52
8.5	Relevancia del estudio de <i>M. tuberculosis</i> de muestras clínicas	55
IX.	Conclusiones	56

X. Referencias bibliográficas	58
Anexos	66

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Flujograma del desarrollo del estudio
- Figura 2. Cantidad de ADN (ng) según cada tratamiento.
- Figura 3. Relación entre las cruces de baciloscopia y la cantidad de ADN (ng) obtenido en cada tratamiento.
- Figura 4. Relación 260/230 obtenido en cada tratamiento.
- Figura 5. Relación 260/280 obtenido en cada tratamiento.
- Figura 6. Comparación de los valores de Ct de la amplificación del gen ribonucleasa (*Homo sapiens*) de las tres condiciones de tratamiento de muestras de esputo.
- Figura 7. Relación entre las cruces de baciloscopia y los valores de Ct del PCR del gen ribonucleasa (*H. sapiens*) obtenido en cada tratamiento.
- Figura 8. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen ribonucleasa (*H. sapiens*) y la cantidad de ADN (ng) de las muestras de esputo sin ningún tratamiento.
- Figura 9. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen ribonucleasa (*H. sapiens*) y la cantidad de ADN (ng) de las muestras de esputo tratadas con saponina.
- Figura 10: Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen ribonucleasa (*H. sapiens*) y la cantidad de ADN (ng) de las muestras de esputo tratadas con NaOH-NALC.
- Figura 11. Comparación de los valores de Ct de la amplificación del gen Rv2626c (*M. tuberculosis*) de las tres condiciones de tratamiento de muestras de esputo.
- Figura 12. Relación entre las cruces de baciloscopia y los valores de Ct del PCR Rv2626c (*M. tuberculosis*) obtenido en cada tratamiento.
- Figura 13. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen Rv2626c (*M. tuberculosis*) y la cantidad de ADN (ng) sin ningún tratamiento.
- Figura 14. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen RV2626c (*M. tuberculosis*) y la cantidad de ADN (ng) tratadas con saponina.
- Figura 15. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen Rv2626c (*M. tuberculosis*) y la cantidad de ADN (ng) tratadas con NaOH-NALC.

Figura 16. Cantidad de ADN (ng) obtenida según cada kit comercial (sin valores atípicos).

Figura 17. Relación entre las cruces de baciloscopia y la cantidad de ADN (ng) obtenida en cada kit comercial (sin valores atípicos)

Figura 18. Relación 260/230 obtenidos según cada kit comercial

Figura 19. Relación 260/280 obtenidos según cada kit comercial

## LISTA DE ABREVIATURAS

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

ADN: ácido desoxirribonucleico

TB: tuberculosis

XDR TB: TB extremadamente resistente

MDR TB: TB multirresistente

WGS: Secuenciación del genoma completo

NaOH: hidróxido de sodio

NALC: N-acetil-L-cisteína

NGS: secuenciación de nueva generación

PBS: solución salina tamponada con fosfato

ARN: ácido ribonucleico

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Ct: umbral de ciclos o *cycle threshold*

CIEI: Comité Institucional de Ética en Investigación

NaCl: Cloruro de sodio

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio

ng: nanogramos

ul: microlitros

DTT: ditioneitol

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

pH: potencial de hidrógeno

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio

TCEP: tris(2-carboxietil)fosfina

## Resumen

La determinación molecular de la resistencia en pacientes con tuberculosis (TB) a partir de muestras clínicas es clave para el control de esta enfermedad. Los métodos usados actualmente se basan en kits comerciales que analizan un número limitado de genes. El secuenciamiento masivo de última generación es una herramienta poderosa para conocer la composición genética de cualquier organismo; sin embargo, los resultados dependen de la cantidad y calidad del ADN. La extracción de ADN de muestras clínicas representa un desafío debido a la baja cantidad de bacterias y alta cantidad de contaminantes. En este estudio se comparó la cantidad y calidad del ADN obtenidas de muestras de esputo empleando dos métodos de descontaminación utilizando NaOH-NALC (13,14) y saponina (15,16) y tres kits comerciales de extracción de ADN: ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (23), Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (24) y Quick-DNA Miniprep Plus Kit (25). Asimismo, la cantidad de ADN, la calidad del ADN, la presencia de contaminantes, la relación entre ADN de MTB y humano fueron evaluados, debido a que estos parámetros son críticos porque afectan a la calidad y rendimiento del secuenciamiento. En resumen, esta investigación optimizó los tratamientos de muestras de esputo y métodos de extracción de ADN para aplicaciones futuras de secuenciación.

Palabras claves: extracción de ADN, tratamiento de esputo, cantidad de ADN, calidad de ADN, *Mycobacterium tuberculosis*

## **Abstract**

Molecular determination of resistance in tuberculosis (TB) patients from clinical samples is key to disease control. Currently used methods are based on commercial kits that analyze a limited number of genes. Next-generation massive sequencing is a powerful tool for understanding the genetic makeup of any organism; however, results depend on the quantity and quality of DNA. DNA extraction from clinical samples is challenging due to the low bacterial count and high contaminant content. This study compared the quantity and quality of DNA obtained from sputum samples using two decontamination methods using NaOH-NALC (13,14) and saponin (15,16) and three commercial DNA extraction kits: the ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (23), the Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (24), and the Quick-DNA Miniprep Plus Kit (25). Likewise, DNA quantity, DNA quality, the presence of contaminants, and the ratio of MTB to human DNA were evaluated, as these parameters are critical because they affect sequencing quality and performance. In summary, this research optimized sputum sample treatment and DNA extraction methods for future sequencing applications.

Keywords: DNA extraction, sputum treatment, DNA quantity, DNA quality, Mycobacterium tuberculosis

## **I. Introducción:**

### 1.1 La enfermedad de la tuberculosis

La tuberculosis (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), es una de las enfermedades infecciosas con mayores tasas de morbilidad y mortalidad más altas del mundo. Este patógeno infecta principalmente las vías respiratorias y los pulmones (tuberculosis pulmonar), en esta etapa primaria la persona no presenta ningún síntoma y no contagia la enfermedad hasta su reactivación por alguna inmunodeficiencia (estado activo) con presencia de fiebre, cansancio, tos con sangre, dolor pectoral, entre otros. (1,2)

Las micobacterias son bacilos ácido-alcohol de crecimiento lento y se transmiten por vía aérea cuando la persona contagiada tose, estornuda o escupe. Infectan a los macrófagos y células dendríticas intersticiales que sirven como reservorios tempranos que activan la respuesta inmune adaptativa. Estas micobacterias son dependientes de los organismos vivos, sin embargo, en esputo pueden seguir activas por largo tiempo, además que son resistentes a diversos productos químicos debido a su gran contenido de lípidos en las tres capas de su pared celular. (3,4)

En el 2021, se estimó que el 25% de la población mundial tenía evidencia inmunológica de haber tenido la infección por MTB según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Según el informe del 2022, fueron 7,5 millones las personas diagnosticadas mundialmente y hubo 1,30 millones de muertes, en donde el Perú es uno de los países con mayor número de casos y con alta mortalidad acumulada. Además, según el Ministerio de Salud del Perú, se ha aumentado el retraso de diagnóstico en los años 2020 y 2021, debido a la pandemia por la COVID-19. Estas cifras subrayan la necesidad de enfoques integrados para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la TB. (1, 2)

## 1.2 Resistencia de *M. tuberculosis* a diferentes fármacos

Actualmente, los fármacos utilizados para el tratamiento de la tuberculosis (TB) se dividen en medicamentos de primera y segunda línea. Los primeros se caracterizan por tener menos efectos secundarios y ser más baratos, estos incluyen a la isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina. (7) Sin embargo, son muchos los casos que no se completa todas las dosis, promoviendo la TB extremadamente resistente (XDR TB) y multirresistente (MDR TB). La OMS calculó que 410000 personas con TB desarrollaron resistencia a múltiples medicamentos o a la rifampicina en 2022, donde el Perú fue uno de los 26 países con mayores casos de TB resistente. (2) Esta creciente incidencia de cepas MDR y XDR es alarmante, lo cual genera la necesidad de un diagnóstico temprano y tratamiento individual eficiente que pueda reducir la propagación y desarrollo de estas cepas. Por ello, es imprescindible el desarrollo de herramientas de diagnóstico fenotípicos y genotípicos que detecten la resistencia con mayor rapidez y precisión. (9)

## 1.3 Técnicas “gold standard” de detección de *M. tuberculosis*

Las técnicas de detección de MTB incluyen métodos variados como la baciloscopia, el cultivo de micobacterias, las pruebas moleculares, las pruebas de imagen y las inmunológicas. La baciloscopia es rápida y económica, pero su sensibilidad es limitada. El cultivo es altamente sensible pero lento. Las pruebas moleculares, como el Xpert MTB/RIF y el Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test, ofrecen alta sensibilidad y especificidad con rapidez, pero pueden ser costosas y requieren equipos especializados. Las pruebas de imagen, como radiografías y tomografías, son útiles para detectar anomalías pulmonares, pero no confirman la infección. Las pruebas inmunológicas, como el test de Mantoux y los ensayos de liberación de interferón-gamma, evalúan la respuesta inmune a MTB, pero no diferencian entre infección activa y latente. (10,11)

#### 1.4 Secuenciación del genoma completo (WGS) para el estudio de *M. tuberculosis* de muestras clínicas

La secuenciación del genoma completo (WGS) es un método avanzado que permite obtener la secuencia del genoma de ADN de un organismo. Por lo que proporciona una visión detallada y completa de la genética de un organismo (amplia gama de mutaciones genéticas detectadas), lo que la hace muy valiosa para diversas aplicaciones en biología, medicina y otros campos. Anteriormente, ha sido considerado para el diagnóstico, ya que se puede utilizar para caracterizar un aislado clínico, identificar especies y/o subtipos probables y proporcionar una resolución superior en comparación con los enfoques basados en técnicas estándar. Además, ofrece la posibilidad de predecir el perfil de resistencia completo a múltiples fármacos, lo cual es esencial ante la creciente cifra de casos multidrogoresistentes de pacientes con tuberculosis. (12)

El rango deseado de la cantidad de ADN en nanogramos es de 50-100 para la mayoría de los protocolos de secuenciación. Las cantidades demasiado bajas pueden no ser suficientes para secuenciar, mientras que cantidades demasiado altas pueden indicar la presencia de contaminantes o requerir dilución. Las relaciones de pureza tal como el 260/280 debe estar en el rango de 1.8 a 2.0, indicando una buena pureza de ADN, libre de contaminantes como proteínas; valores menores sugieren contaminación por proteínas, mientras que valores mayores a 2.0 pueden indicar la presencia de ARN. En el caso de la relación 260/230 debe estar en el rango de 2.0 a 2.2, indicando la ausencia de contaminantes orgánicos como sales, fenol o carbohidratos. (20)

#### 1.5 Tratamiento y extracción de ADN de las muestras de esputo

El tratamiento de muestras de esputo implica la descontaminación y concentración de las muestras para facilitar la detección de las micobacterias en cultivos o en análisis molecular, su elección depende del análisis requerido.

### 1.5.1 Tratamiento con NALC-NaOH:

El tratamiento de esputo con NaOH-NALC es un método ampliamente utilizado para la descontaminación de muestras antes de la extracción de ADN. El NaOH, un agente fuertemente alcalino, actúa desnaturalizando proteínas y lípidos, desintegrando las membranas celulares y eliminando microorganismos contaminantes como bacterias no deseadas, hongos y células humanas. Este proceso permite la liberación del contenido intracelular. Sin embargo, la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), rica en ácidos micólicos y otros componentes resistentes, es más robusta frente a la acción del NaOH, lo que permite que las micobacterias sobrevivan en mayor medida. (13,14)

Por otro lado, el N-acetil-L-cisteína (NALC) desempeña un papel clave como agente mucolítico, ya que rompe enlaces disulfuro en las glicoproteínas del moco. Esto reduce la viscosidad del esputo, facilitando la desintegración de la muestra y liberando las micobacterias atrapadas en el moco. La combinación de NALC y NaOH mejora la homogeneización de la muestra, asegurando que las micobacterias estén uniformemente distribuidas y accesibles durante el proceso de extracción de ADN. (13,14)

La digestión de esputo utilizando NALC-NaOH no solo proporciona un crecimiento más rápido de las micobacterias en cultivos, sino que también permite una detección más temprana de MTB. Este enfoque es crucial para el diagnóstico preciso de la tuberculosis (TB), ya que facilita la liberación y detección de MTB, al tiempo que reduce significativamente la contaminación con otras bacterias y hongos. (5,13,14)

### 1.5.2 Tratamiento con saponina:

El tratamiento con saponina, en este caso derivada de Quillaja sp., permite la lisis selectiva de células humanas, aprovechando sus propiedades como detergente no iónico para inducir la formación de poros al aumentar la permeabilidad de la membrana. Este proceso es clave para interactuar con los colesterol presentes en las membranas biológicas, logrando una disrupción efectiva de las mismas. La cadena de azúcares de la saponina, en conjunto con su núcleo triterpénico o esterooidal, le otorgan una estructura anfipática, con una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica, que facilita su inserción en

las bicapas lipídicas de las membranas celulares. Esto causa desestabilización y un aumento en la permeabilidad de las membranas, permitiendo un enfoque más específico en el ADN patógeno presente en las muestras. (15,16)

Este método ha demostrado ser particularmente efectivo en el procesamiento de muestras de esputo, permitiendo la ruptura selectiva de células humanas y facilitando la posterior extracción de ADN bacteriano, como el de *M. tuberculosis*. Además, el uso combinado de saponina y DNasa mejora significativamente la sensibilidad en la detección de patógenos mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS). Esta estrategia maximiza la recuperación de ADN patógeno al reducir la contaminación con ADN humano, optimizando así los análisis genómicos para la identificación de infecciones bacterianas. (15,16)

En el tratamiento de esputo, la saponina se ha utilizado a una concentración final del 2.5% para romper las membranas de las células humanas, la cual ha sido probada a distintas concentraciones anteriormente según reporta Charalampous T. (16) Las células bacterianas, incluyendo MTB, tienen paredes celulares compuestas por peptidoglicano y otros componentes como ácidos micólicos, que son menos susceptibles a la acción de las saponinas. Por lo tanto, la estructura robusta de las paredes celulares bacterianas permite que las bacterias sobrevivan al tratamiento, mientras que las células humanas son lisadas. Después de la lisis celular, el esputo tratado se somete a varios pasos de centrifugación y lavado con PBS (solución salina tamponada con fosfato). Estos pasos ayudan a eliminar los restos celulares humanos y otros contaminantes, lo que mejora la pureza del ADN bacteriano extraído. (16)

### 1.5.3 Extracción de ADN:

La extracción del ADN implica la alteración de la pared celular y nuclear, la liberación del material citosólico y genético y purificación del ADN micobacteriano. La pared celular de las micobacterias es rígida, abundante en lípidos, resistente a varios tampones de lisis y métodos mecánicos, físicos, químicos o enzimáticos afectan la calidad y cantidad del ADN extraído. La alta pureza y concentración del ADN es crítico, ya que estos valores tienen un impacto significativo en la confiabilidad y calidad de los datos

(por ejemplo, profundidad de secuenciación, densidad de conglomerados alta o baja, etc).  
(6)

Las técnicas actuales requieren grandes cantidades de ADN de MTB, a menudo obtenidas mediante cultivos, pero esto es costoso y consume tiempo. Por tanto, existe un interés creciente en desarrollar métodos de secuenciación de genomas completos (WGS) sin necesidad de cultivo y en mejorar los protocolos de extracción para obtener ADN más puro y concentrado. Sin embargo, estos esfuerzos enfrentan desafíos significativos debido a la alta viscosidad de las muestras de esputo, la baja carga bacteriana y la alta contaminación con ADN bacteriano y humano. La capacidad de obtener ADN de MTB puro y concentrado sin cultivo no solo es más rápida, sino que también permite una mejor detección de genes de resistencia a los fármacos, lo cual es fundamental para el manejo efectivo de la tuberculosis. (8)

#### 1.6 Antecedentes:

El avance en las técnicas de secuenciación y extracción de ADN ha tenido un impacto significativo en el estudio y manejo de MTB. Estudios recientes, como los de Nimmo et al. (17) y Brown et al. (18), han demostrado que el secuenciamiento de *M. tuberculosis* a partir de muestras de esputo puede revelar una diversidad genética más amplia que la obtenida de cultivos, lo que sugiere una representación más precisa de la población bacteriana en pacientes. También sugieren que el secuenciamiento del genoma completo (WGS) directamente de muestras respiratorias es factible y proporciona datos de vigilancia rápidos, siendo crucial para la gestión clínica y el control de la tuberculosis. (18,19)

La evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN, como se observa en el estudio de Terranova et al. (12), ha resaltado la importancia de la selección del método adecuado para garantizar un alto rendimiento y calidad del ADN. Estudios sobre la tasa de mutación de MTB y la mejora en la extracción de ADN para WGS subrayan la importancia de una extracción eficiente de ADN de muestras de esputo. Para el enriquecimiento de ADN de MTB, se han implementado estrategias como la filtración, centrifugación en gradiente de densidad, tratamiento con detergentes, enzimas y

sonicadores, así como la captura de híbridos y el uso de cebadores específicos en PCR. Además, la depleción de ADN humano mediante nucleasas específicas y kits comerciales y la optimización de protocolos de lisis para micobacterias han mejorado la recuperación de ADN puro y concentrado. Investigaciones adicionales han explorado la mejora de la licuefacción y descontaminación del esputo usando técnicas como saponinas para aumentar la permeabilidad de las membranas bacterianas. (16, 21, 23)

Actualmente, existen estudios que realizan el método de descontaminación de esputos de pacientes con TB utilizando NALC-NaOH. Por ejemplo, en un estudio de Tarhan et al., se empleó esta técnica antes de aplicar diferentes métodos de extracción de ADN para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR, observándose que el método de absorción en fase sólida (QIAamp) tuvo la mayor tasa de detección positiva (58%) en comparación con otros métodos más simples como ebullición o proteinasa K (53). Por otro lado, Buijtels y Petit compararon directamente el método NaOH-NALC con la descontaminación por ácido sulfúrico, demostrando que si bien no hubo diferencias significativas en la recuperación de *M. tuberculosis*, la recuperación de micobacterias no tuberculosas (NTM) fue significativamente mayor con el método del ácido sulfúrico (54), lo que resalta cómo la elección del método de descontaminación puede influir en la diversidad microbiana detectada.

Existe evidencia en la literatura, que sugiere que el tratamiento con saponina podría ser más efectivo para la eliminación de células humanas debido a su capacidad para inducir la formación de poros en las membranas celulares al interactuar con los colesterol presentes en estas. (15,16) Además, ha mostrado mejorar significativamente la sensibilidad de detección de patógenos mediante secuenciación de nueva generación (NGS).

Diversos estudios han evaluado kits comerciales de extracción de ADN a partir de muestras respiratorias. Terranova et al. compararon cinco kits en esputo y reportaron que el ZymoBIOMICS mostró un rendimiento intermedio, aunque con una mayor profundidad de secuenciación en una muestra específica. (23) Mohamed Ali et al. encontraron que el Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit produjo mayor cantidad de ADN

que el kit de Roche, aunque este último mostró mejor rendimiento en la amplificación de ITS. (26) Por su parte, Ko et al. utilizaron el Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit para extraer ADN genómico de *M. tuberculosis*, obteniendo resultados adecuados para secuenciación. (27) Aunque los estudios no se enfocan exclusivamente en MTB en esputo, estos kits han demostrado eficacia en contextos clínicos similares. Además, son los más económicos y comerciales utilizados en Perú. Por ello, en este trabajo se compararon estos tres kits y se evaluó la cantidad y calidad del ADN extraído de esputo de pacientes con tuberculosis positiva, así como el efecto del tratamiento de descontaminación de la muestra, empleando el método con NaOH-NALC y con saponina en el rendimiento de la extracción del ADN.

## **II. Planteamiento del problema:**

La obtención de ADN micobacteriano directamente desde esputo clínico representa un reto importante, tanto por la baja abundancia relativa del bacilo como por la alta proporción de ADN del hospedero, la viscosidad de la muestra y la presencia de inhibidores que pueden comprometer las etapas posteriores del análisis molecular, como la PCR y la secuenciación de nueva generación (NGS). Tradicionalmente, el tratamiento de estas muestras ha recurrido al protocolo de descontaminación con NaOH-NALC, ampliamente utilizado en los laboratorios de tuberculosis por su capacidad para licuar el esputo y reducir la carga de flora contaminante. Sin embargo, este método no siempre garantiza una preservación adecuada del ADN micobacteriano y puede dejar inhibidores residuales.

Una estrategia alternativa que ha cobrado interés es el uso de saponina, un detergente natural capaz de lisar selectivamente células eucariotas sin afectar significativamente a *Mycobacterium tuberculosis*, permitiendo así disminuir el contenido de ADN humano y facilitar la recuperación del ADN bacteriano. No obstante, la eficacia de saponina frente a métodos clásicos como NaOH-NALC no ha sido suficientemente comparada en condiciones controladas, especialmente en cuanto a su impacto en la calidad del ADN obtenido para secuenciación.

En este contexto, recientes estudios han demostrado el potencial de métodos comerciales estandarizados para procesar directamente esputo clínico y obtener resultados robustos mediante NGS. Por ejemplo, Cabibbe et al. (2020) evaluaron el rendimiento del kit Deeplex Myc-TB en combinación con la secuenciación mediante Oxford Nanopore MinION, utilizando muestras descontaminadas con OMNIgene-SPUTUM, un reactivo estabilizante que permite transporte a temperatura ambiente y evita la degradación del ADN. Este estudio mostró una alta cobertura y concordancia con la plataforma MiniSeq de Illumina, con una proporción de lecturas alineadas superior al 90% en MinION y cobertura >99% en las regiones objetivo, demostrando la factibilidad del análisis directo desde sedimento de esputo. (26)

Más recientemente, Cabibbe et al. (2024) presentaron una comparación directa entre el kit AmPORE TB de Oxford Nanopore Diagnostics y Deeplex Myc-TB, ambos aplicados sobre ADN extraído de muestras de esputo descontaminadas. El kit AmPORE TB demostró una validez del 98%, tiempos de respuesta inferiores a 6 horas, y alta concordancia para mutaciones de resistencia frente a rifampicina, pirazinamida, fluoroquinolonas y otros fármacos clave (55) . No obstante, ambos estudios se realizaron con muestras previamente tratadas mediante reactivos comerciales como OMNIgene-SPUTUM y kits de extracción automatizados, lo cual representa una barrera para su adopción generalizada en entornos de recursos limitados.

En este marco, es fundamental evaluar el rendimiento de métodos de tratamiento accesibles y adaptables como NaOH-NALC y saponina, tanto de forma individual como combinada, en el contexto de extracción de ADN desde esputo. Su comparación con diferentes kits de extracción permitirá determinar qué combinación permite obtener ADN de calidad suficiente para análisis moleculares avanzados, sin comprometer la sensibilidad diagnóstica ni incurrir en altos costos. Esta optimización preanalítica puede ser determinante para la implementación efectiva de estrategias de secuenciación directa en programas nacionales de tuberculosis, especialmente en contextos donde el acceso a tecnologías de alto costo es limitado.

### III. Pregunta de investigación:

¿Cómo afectan los métodos de descontaminación NALC-NaOH y saponina, y los kits comerciales de extracción (ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep y Quick-DNA Miniprep Plus Kit) en la cantidad y calidad de ADN obtenido de muestras de esputo de pacientes con *M. tuberculosis* para su uso futuro en secuenciación?

### IV. Objetivo general:

- Evaluar el efecto de dos métodos de descontaminación (NALC-NaOH y saponina) y tres kits comerciales de extracción en relación a la cantidad y calidad de ADN obtenido de muestras de esputo de pacientes con *M. tuberculosis*.

### V. Objetivos específicos:

FASE 1: Comparación de 2 métodos de descontaminación empleando NALC-NaOH y saponina

- Comparar la cantidad y calidad de ADN total.
- Comparar la cantidad de ADN de *M. tuberculosis* y *Homo sapiens* mediante PCR cuantitativa (qPCR).
- Determinar la relación de la baciloscopía con la cantidad total de ADN y con el valor de *cycle threshold* (Ct) del qPCR.

FASE 2: Comparación de kits comerciales de extracción de ADN

- Comparar la cantidad y calidad del ADN total.
- Determinar la relación entre la baciloscopía y la cantidad total de ADN.

## VI. Materiales y métodos:

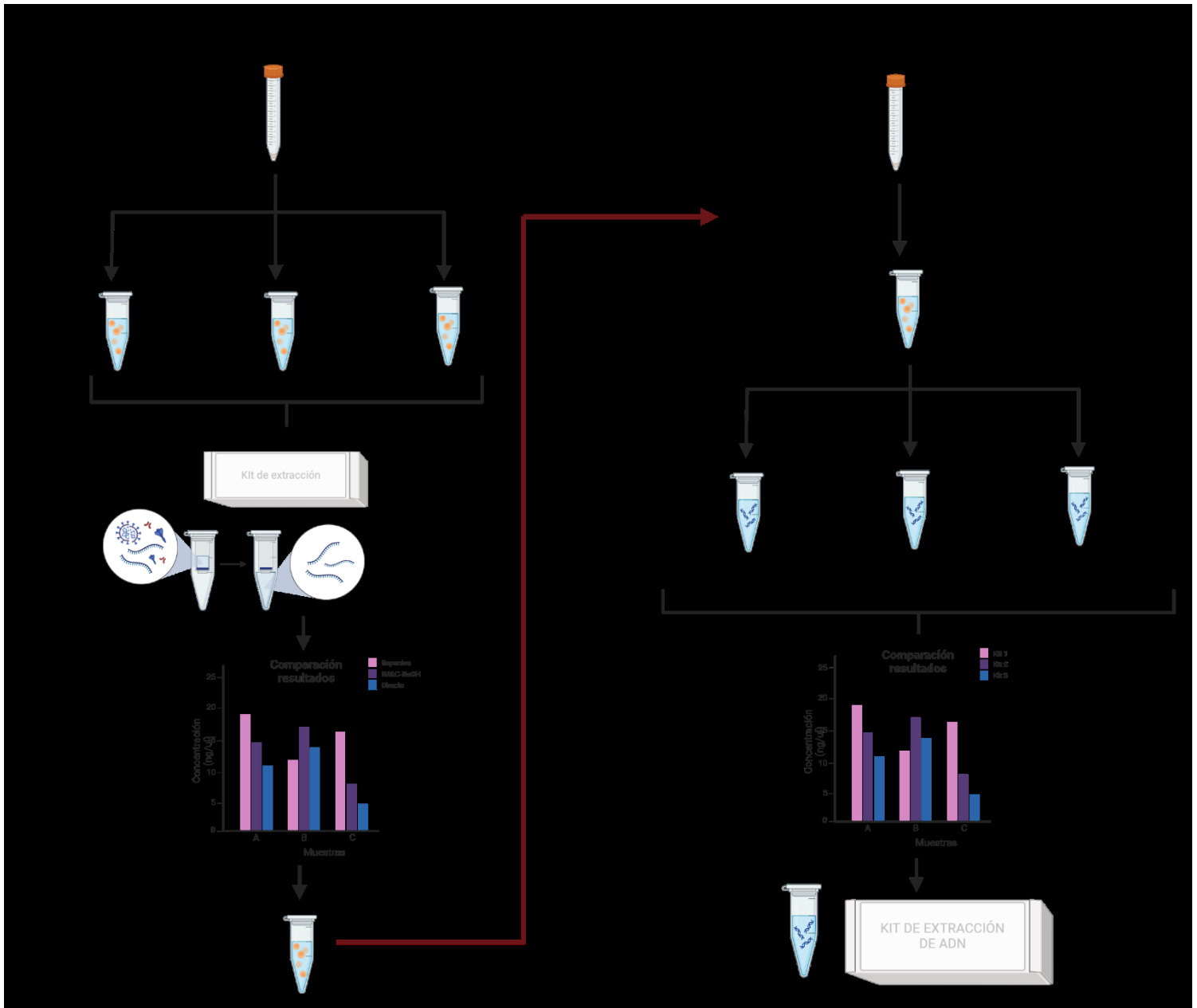


Figura 1. Flujograma del desarrollo del estudio

## **6.1 Muestras y aspectos éticos:**

### **6.1.1 Recolección:**

Setenta y un remanentes de esputo provenientes de pacientes con diagnóstico de tuberculosis (TB), con baciloscopía mínima Bk 1+ y un volumen mínimo de 2 mL, fueron recolectados para la presente tesis. Las muestras fueron obtenidas del Laboratorio de Referencia Regional de Tuberculosis de la Dirección Regional de Salud del Callao. La información correspondiente a los resultados de baciloscopía de cada muestra fue registrada para su posterior análisis.

Los esputos fueron recolectados dos veces por semana y, tras su recepción, se almacenaron refrigerados a 4 °C por un tiempo menor a 24 horas antes de ser utilizados en los experimentos. Esta estrategia de conservación tuvo como objetivo preservar la integridad del ADN micobacteriano y minimizar la proliferación de contaminantes, condiciones críticas para garantizar la calidad y cantidad de ADN extraído posteriormente.

Para los experimentos, cada muestra fue dividida en tres alícuotas destinadas a distintas comparaciones:

- Treinta y dos muestras fueron destinadas para evaluar distintos tratamientos de descontaminación de esputo (sin tratamiento, tratamiento con NALC-NaOH y tratamiento con saponina).
- Treinta y nueve muestras fueron empleadas para la comparación de diferentes kits comerciales de extracción de ADN.

Esta división experimental permitió controlar las variables de procesamiento y asegurar la comparabilidad entre condiciones evaluadas.

### 6.1.2 Tamaño muestral:

El tamaño muestral (al menos 29 muestras por grupo) se calculó utilizando el programa R Studio, considerando un nivel de significancia de 0.05, un tamaño del efecto medio de 0.25 (que representa la diferencia mínima detectable entre grupos en términos de desviaciones estándar) y una potencia deseada de 0.9. Esto significa que el diseño experimental tiene una probabilidad del 90% de detectar una diferencia real entre los grupos si existe una diferencia de esta magnitud.

Bajo estos parámetros, el tamaño muestral estimado fue de al menos 29 muestras por grupo para garantizar la detección de diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones (Anexo 1). Debido a la naturaleza clínica de las muestras y a la posibilidad de pérdidas experimentales o exclusiones, se recolectó un número mayor de muestras de lo estrictamente necesario. Esto permitió disponer de suficiente material biológico para completar los análisis planeados y garantizar la robustez de los resultados reportados. Así, las 71 muestras fueron adecuadamente distribuidas entre las condiciones experimentales, 32 fueron destinadas para la comparación de tratamientos de esputo y 39 en la comparación de los kits comerciales, superando el tamaño muestral mínimo requerido, como se evidencia en las tablas de resultados presentadas.

### 6.1.3 Transporte:

Las muestras fueron enviadas a la universidad vía terrestre en grupos de al menos 10 muestras dentro de los 7 días posteriores a la toma del lavado nasal siguiendo las medidas de Bioseguridad descritas en el documento de Normas de Bioseguridad en el Laboratorio de Mycobacterium (Anexo 5).

El proceso de transporte y recepción se realizó bajo las siguientes condiciones:

- Cada muestra fue depositada en un frasco rotulado de boca ancha (envase primario).
- Los frascos fueron colocados individualmente en bolsas plásticas selladas (envase secundario).

- Posteriormente, las bolsas fueron embaladas en *coolers* usar cursiva o comillas con ice-packs (envase terciario) para mantener la cadena de frío.
- A su llegada a la universidad, los *coolers* fueron depositados en la pre-cámara de acceso al laboratorio de bioseguridad nivel 3 (P3).
- El personal autorizado ingresó los *coolers* a la cabina de flujo laminar dentro de la P3.
- Todos los envases primarios y secundarios, así como los coolers, fueron desinfectados con solución de TEGO 5%.
- Finalmente, las muestras fueron almacenadas a 4°C dentro del laboratorio P3 hasta su procesamiento experimental.

#### 6.1.4 Criterios de inclusión de las muestras:

Para asegurar la homogeneidad de la población de estudio, las muestras incluidas debían cumplir los siguientes criterios:

- Proceder de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar confirmado por prueba molecular Xpert MTB/RIF positiva (Cepheid).
- Contar con una baciloscopia mínima de una cruz (Bk 1+).
- Tener un volumen mínimo de 2 mL de esputo.
- Provenientes de pacientes en cualquier estado de tratamiento (es decir, se aceptaron muestras tanto de pacientes sin tratamiento como de pacientes bajo tratamiento antituberculoso).
- Disponibilidad para ser procesadas dentro de los 7 días posteriores a la recolección.

#### 6.1.5 Criterios de exclusión:

No se establecieron criterios de exclusión específicos respecto al estado de tratamiento del paciente ni al tiempo de enfermedad. Sin embargo, se descartaron aquellas muestras que:

- Presentaran un volumen insuficiente (<2 mL)
- No cuenten con resultado positivo de Xpert MTB/RIF

- Sufrieran derrames, contaminación visible, o pérdida de cadena de frío durante el transporte.

#### 6.1.6 Consideraciones éticas:

Este proyecto fue presentado al Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para su evaluación y se ejecutó una vez que fue aprobado. Las muestras de esputos fueron usadas en forma anónima por lo que no se realizó seguimiento o localización de los pacientes. El ADN de *M tuberculosis* fue guardado.

La exención del requisito de consentimiento informado fue solicitado al comité de ética de acuerdo a la Pauta 10 en el documento Pautas éticas internacionales para la investigación relacionadas con la salud con seres humanos (28), se cumplen las 3 condiciones para la Dispensa del Consentimiento Informado: a) No sería factible o viable sin dicha exención, b) tiene un valor social importante y c) entraña apenas riesgos mínimos para los participantes.

#### 6.1.7 Normas de Bioseguridad:

Debido a que *M. tuberculosis* es un agente patógeno de riesgo tipo 3 para humanos, los remanentes de las muestras de esputo fueron trabajados posterior a la capacitación del investigador en el Laboratorio de *Mycobacterium* siguiendo las indicaciones del Manual de Normas de Bioseguridad (Anexo 5), y las indicaciones del Trabajo en el Laboratorio de *Mycobacterium* (Anexo 6).

### **6.2 Primera fase: Comparación de tratamientos:**

#### **6.2.1 Tratamiento con NaOH-NALC:**

El tratamiento con NALC-NaOH es el método usado para descontaminar las muestras de esputo. La solución NaOH-NALC se preparó disolviendo 8,0 g de hidróxido de sodio en 200 mL de agua destilada (4% de NaOH) y 5,8 g de citrato de sodio en otros 200 mL de agua destilada (2.82% de  $\text{Na}_3 \text{C}_6 \text{H}_5 \text{O}_7$ ). Estas soluciones se combinaron en volúmenes

iguales, se mezclaron y se esterilizaron en autoclave a 121-124 °C durante 15 minutos. Después de etiquetar con el nombre y la fecha de preparación, se almacenó en alícuotas en tubos con tapa de rosca en refrigeración a 2-8 °C hasta por un mes. Previo a ser usado, 0.05 g de N-acetil L-cisteína (NALC) fue agregado a 10 mL de la solución NaOH – citrato de sodio (0.5% de NALC). (14)

A 2 ml de esputo se le agregó 2 ml de la solución NaOH-NALC. La muestra fue agitada para asegurar una mezcla homogénea y luego se incubó a temperatura ambiental (20 a 25 °C) por 15 minutos. Posteriormente, el tampón de fosfato (PBS) fue agregado hasta llegar a un volumen de 15 ml para neutralizar la reacción alcalina. La mezcla fue homogenizada mediante inversión y luego fue centrifugó a 10000 rpm por 10 min a 27°C. El sobrenadante fue descartado y el sedimento fue suspendido con 600 µl de PBS para su análisis posterior. (14)

### **6.2.2 Tratamiento con saponina:**

Seis cientos cincuenta µl de esputo fue centrifugado a 8000 g durante 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado y el sedimento fue suspendido en 400 µl de PBS. Luego, 400 µl de 5% de saponina diluída en PBS fue agregado para alcanzar una concentración final del 2,5%, seguido de una incubación por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, 350 µl de agua estéril fue agregado e incubado a temperatura ambiente durante 30 segundos. Luego, 19,2 µl de NaCl 5M fue agregado, mezclado y centrifugado a 6.000 g durante 5 minutos. Luego, el sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue suspendido en 160 µl de PBS. (16)

Ciento sesenta 160 µl de 5,5 M NaCl y 100 mM MgCl<sub>2</sub> fue agregado e incubado durante 15 minutos a 37 °C con agitación a 800 r.p.m. Luego, la muestra fue lavada con 800 µl de PBS, seguido de una centrifugación a 6.000 g durante 3 minutos y, posteriormente, se descartó el sobrenadante. El sedimento fue suspendido en 1000 µl de PBS, seguido de otra centrifugación a 6.000 g durante 3 minutos, y la subsiguiente eliminación del sobrenadante. Este paso se repitió una vez más, y el sedimento fue suspendido en 200 µl de PBS. (16)

### **6.2.3 Extracción de ADN:**

La extracción del ADN se realizó de acuerdo con los pasos descritos en el protocolo de Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Anexo 4), con algunas modificaciones. 200 µl de BioFluid & Cell Buffer y 20 µl de proteinasa K fueron agregados a 200 µl de muestra. La mezcla fue homogenizada usando vortex durante 10-15 segundos y luego fue incubada 55°C durante 90 minutos. 1 volumen de Genomic Binding Buffer fue añadido y mezclado agitando durante 10-15 segundos. La mezcla fue transferida a una columna Zymo-Spin™ IIC-XLR en un tubo de recolección y centrifugada a  $\geq 12.000 \times g$  durante 1 minuto. La columna fue lavada con 400 µl de tampón de prelavado fue agregado a la columna e incubado durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a  $\geq 12.000 \times g$  durante 1 minuto y se vació el tubo de recolección. Se procedió a agregar 700 µl de tampón de lavado de ADN a la columna de centrifugado, incubando durante 5 minutos. Finalmente, la columna fue lavado con 200 µl de tampón de lavado El ADN fue eluido con 50 µl de Tampón de elución luego de incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. (25)

### **6.2.4 Evaluación de la calidad:**

La calidad fue evaluada usando 1 µl de ADN en un NanoDrop 2000c Spectrophotometer Thermo Scientific previa calibración con agua libre de nucleasas por duplicado para cada muestra.

### **6.2.5 Cuantificación del ADN:**

La cantidad del ADN fue determinada usando el Qubit™ 4 Fluorometer. Las soluciones de blanqueo del Qubit™ 1x dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) fue preparado mezclando 10 µl de Blanco 1 o Blanco 2 con 190 µl de la solución con el fluorescente, se dio un espín a los blancos y se incubó por 3 minutos. Luego, se calibró el equipo Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen). Las muestras fueron preparadas mezclando 1 µl del ADN con 199 µl de la solución fluorescente mediante vortex, se dio un espín a las muestras y se incubó por 3 minutos. Finalmente, 1 µl de la muestra preparada fue medida en el equipo Qubit™ 4 Fluorometer. El mínimo, máximo, media y desviación estándar fueron calculados con el código de *summary* en R Studio.

### **6.2.6 Evaluación de la relación de ADN humano con el ADN de MTB:**

La relación de la cantidad de ADN humano y la cantidad de ADN de MTB fue evaluado mediante PCR (reacción en cadena de polimerasa) cuantitativo tomando de referencia los resultados de valores de Ct (cycles thresholds). El ciclaje fue realizado en el termociclador QuantStudio 5 Dx Real-time PCR System con el SYBR™ Green PCR Master Mix APPLIED BIOSYSTEMS. La reacción incluyó 5 µl de SYBR™ Green, 1 µl de Forward Primer (3 µM), 1 µl Reverse Primer (3 µM) y 3 µl de la muestra, volumen final de 10 ul. El gen que codifica la subunidad p30 de la ribonucleasa P/MRP (RPP30) de *H. sapiens* fue amplificado con los primers: forward 5'- AGA TTT GGA CCT GCG AGC G -3' y reverse 5'- GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT -3'. Una parte del cromosoma de MTB 11 fue amplificado con los primers: forward 5'- ACC TGA TGT TCT TCC ATG ACG T -3' y el reverse 5'- AAA CAC GTC ATG GAA GAA CAT C -3. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: etapa de choque térmico inicial a una temperatura de 50°C por 2 minutos seguido de 95°C por 10 minutos, la etapa de ciclaje de 40 repeticiones a 95°C por 15 segundos seguido de 60°C por un minuto, la etapa de fusión de 95°C por 15 segundos, 60°C por un minuto y 95°C por un segundo, y la etapa de choque térmico final de 40°C por 10 minutos. (30)

## **6.3 Segunda fase: Comparación de kits de extracción de ADN comerciales:**

### **6.3.1 Tratamiento con NaOH-NALC:**

El método de tratamiento usado en la segunda fase fue el de NaOH-NALC, debido a que los resultados fueron mejores que los resultados del tratamiento con saponina. El protocolo descrito anteriormente fue modificado en lo siguiente: El volumen de muestra de esputo inicial usado fue de 2 ml y el sedimento fue resuspendido en 600µl de PBS.

### 6.3.2 Extracción de ADN:

La selección de los kits fue realizada tomando en cuenta el tipo de muestra, rendimiento y requerimientos específicos del análisis. El Quick-DNA Miniprep Plus Kit, es un kit versátil que puede ser usado con varios tipos de muestras clínicas que contienen una variedad de patógenos. Este kit ofrece varias ventajas, entre ellas la pureza del ADN, que es crucial para su aplicación en secuenciación. Con una temperatura de incubación más baja (55°C), se evita la degradación del ADN, y sus columnas Zymo-Spin™ IIC-XLR permiten manejar volúmenes mayores, ofreciendo una mejor capacidad de retención y pureza del ADN.

El Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit es eficaz debido a su diseño específico para muestras mixtas de bacterias y hongos. Este kit ofrece una mayor eficiencia de lisis celular específica para estos patógenos, mejorando la cantidad de ADN recuperado. Además, en estudios anteriores de comparación de kits, el ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit mostró resultados sobresalientes: una mayor profundidad de secuenciación y rendimiento de extracción de ADN significativamente superior. Su capacidad para extraer ADN de alta calidad y pureza lo convirtió en una opción destacada, especialmente para aplicaciones donde la precisión y la cantidad de ADN eran críticas.

Otras diferencias entre estos kits son los tipos de columnas y filtros (Zymo-Spin™ IICR3 vs. Zymo-Spin™ IIC-XLR vs. Zymo-Spin™ IICR), los tampones de lavado y los buffers. Aunque los procedimientos de homogeneización por vortex y centrifugación fueron similares, difieren ligeramente en tiempos y velocidades específicas. Estas diferencias técnicas influyeron significativamente en la cantidad y calidad del ADN extraído, así como en la presencia de inhibidores que afectan las etapas posteriores del análisis de ADN, como la amplificación por PCR y la secuenciación.

- ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Cat. No. D4300):

200 µl de BioFluid & Cell Buffer y 20 µl de proteinasa K fueron agregados a 200 µl de muestra. La mezcla fue homogenizada usando vortex durante 10-15 segundos y luego fue incubada 55°C durante 90 minutos. 1 volumen de Genomic Binding Buffer fue añadido

y mezclado agitando durante 10-15 segundos. La mezcla fue transferida a una columna Zymo-Spin™ IIC-XLR en un tubo de recolección y centrifugada a  $\geq 12.000 \times g$  durante 1 minuto.

El protocolo del ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit fue seguido (Anexo 2) con algunas modificaciones. 20  $\mu\text{l}$  de solución de lisis con proteinasa K y 750  $\mu\text{l}$  de solución de lisis fue agregado a 200  $\mu\text{l}$  de muestra tratada e incubada a 65°C durante 90 minutos. Las células fueron lisadas en un adaptador de vortex a máxima potencia por 40 minutos. Luego, se centrifugaron los tubos de lisis ZR BashingBead™ (0,1 y 0,5 mm) en una microcentrífuga a 10.000  $\times g$  durante 1 minuto. 400  $\mu\text{l}$  de sobrenadante fue transferido al filtro Zymo-Spin™ III-F en un nuevo tubo de recogida y centrifugado a 8.000  $\times g$  durante 1 minuto. El eluido fue desechado. Luego, 1200  $\mu\text{l}$  de tampón de unión a ADN fue agregado al tubo de recolección anterior que contenía el filtrado y se homogeneizó. 800  $\mu\text{l}$  de la mezcla fue transferido a una columna Zymo-Spin™ IICR y se centrifugó a 10.000  $\times g$  durante 1 minuto. El eluido fue descartado y el paso anterior fue repetido. Luego, 400  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado 1 de ADN fue agregado a la columna y centrifugado a 10.000  $\times g$  durante 1 minuto. El flujo fue descartado; seguidamente, 700  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado 2 de ADN fue agregado a la columna y centrifugado a 10.000  $\times g$  durante 1 minuto. El flujo fue descartado. Luego, 200  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado 2 de ADN fue agregado a la columna y centrifugado a 10.000  $\times g$  durante 1 minuto. (23)

Seguidamente, la columna fue transferida a un tubo de 1,5 ml tubo. 50  $\mu\text{l}$  de agua libre de DNasa/RNasa fue añadido directamente a la columna. La muestra fue incubada 30 minutos y centrifugada a 10.000  $\times g$  durante 1 minuto para eluir el ADN. Finalmente, se colocó un filtro Zymo-Spin™ III-HRC en un tubo de recolección nuevo y se agregaron 600  $\mu\text{l}$  de solución de preparación ZymoBIOMICS™ HRC. Se centrifugó a 8.000  $\times g$  durante 3 minutos. Se transfirió el ADN eluido (Paso 12) a un Zymo-Spin™ III-HRC preparado. Se filtró en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y se centrifugó a exactamente 16.000  $\times g$  durante 3 minutos. (23)

- Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Cat. No. D6005):

El protocolo del Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Anexo 3) fue seguido con algunas modificaciones. 200 µl de muestra tratada y 750 µl de lisis ZymoBIOMICS™ fueron agregados a un tubo de lisis ZR BashingBead™, el cual contiene beads de 0,1 mm y 0,5 mm de diámetro. Luego, 20 µl de proteinasa K fue agregado, e incubado a 65°C por 90 minutos homogenizado en un adaptador de vortex a máxima potencia durante 40 minutos. Posteriormente, la muestra fue centrifugada 10.000 g durante 1 minuto. El sobrenadante (hasta 400 µl) fue transferido a un filtro Zymo-Spin™ III-F en un tubo de recogida y fue centrifugado a 8.000 g durante 1 minuto. Seguidamente, 1200 µl de tampón de lisis genómica fue agregado al filtrado en el tubo de recolección anterior. (24)

Después, se transfirieron 800 µl de la mezcla del paso anterior a una columna Zymo-Spin™ IICR3 en un tubo de recolección y se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto. Se desechó lo filtrado y se repitió este paso. Se continuó el proceso agregando 200 µl de tampón de prelavado de ADN a la columna Zymo-Spin™ IICR en un tubo de recogida nuevo y centrifugando a 10.000 g durante 1 minuto, desechando lo filtrado. (24)

Posteriormente, se añadieron 500 µl de tampón de lavado de ADN a la columna Zymo-Spin™ IICR y se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto, desechando lo filtrado. La columna Zymo-Spin™ IICR se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y se agregaron 50 µl (35 µl mínimo) de elución de ADN Buffer directamente a la matriz de la columna. Se incubó por 15 minutos y luego se centrifugó a 10.000 g durante 30 segundos para eluir el ADN. (24)

- Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Cat. No. D4069):

El ADN fue extraído de 200µl de muestra tratada siguiendo los pasos del protocolo de Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Anexo 4) con las modificaciones detalladas anteriormente.

### **6.3.3 Evaluación de la calidad del ADN:**

Se utilizaron los mismos procedimientos mencionados anteriormente.

### **6.3.4 Cuantificación del ADN:**

Se utilizaron los mismos procedimientos mencionados anteriormente.

## **6.4 Análisis estadístico:**

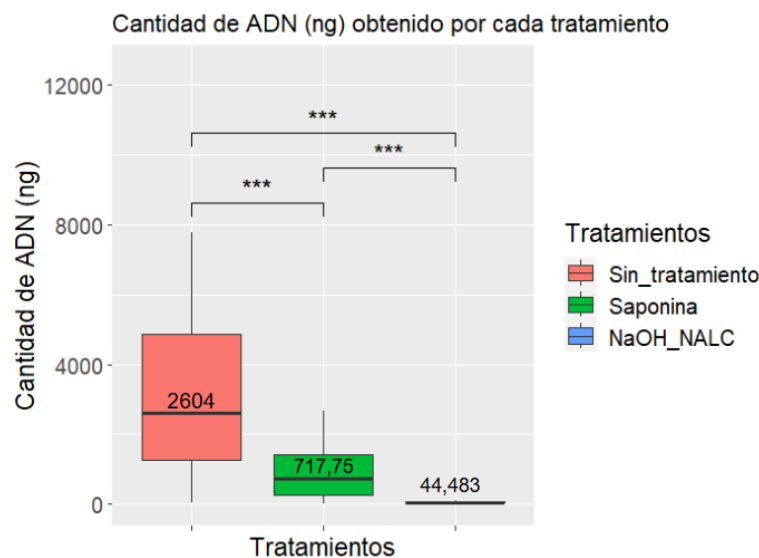
La prueba de Kruskal-Wallis fue usada para comparar la cantidad y calidad de ADN de más de dos grupos independientes que incluyeron datos que no cumplen con los supuestos de normalidad requeridos por ANOVA. La prueba Kruskal-Wallis también fue usada para evaluar la relación entre las cruces de baciloscopia con la cantidad de ADN o los valores de Ct. Las medianas de la cantidad de ADN y valores de Ct fueron comparadas. Luego, el test de Wilcoxon con ajuste de Bonferroni fue usado para realizar comparaciones por pares (pairwise) cuando las diferencias fueron significativas (valor  $p < 0.05$ ). El ajuste corrige el nivel de significancia para múltiples comparaciones, reduce el riesgo de cometer errores tipo I (falsos positivos) y proporciona un método robusto para identificar qué grupos específicos difieren entre sí. Asimismo, se utilizó la correlación de Spearman para evaluar la relación entre la cantidad de ADN y los valores de Ct del PCR porque es adecuada para datos no paramétricos, robusta frente a outliers, y eficaz para detectar relaciones monótonas que pueden no ser lineales, características que suelen presentarse en los datos de experimentos de PCR.

## VII. Resultados:

### 7.1 Fase 1: Comparación de los tratamientos con NaOH-NALC y saponina

#### 7.1.1 Cantidad de ADN

La cantidad de ADN obtenido en cada tratamiento (NaOH-NALC o saponina) y sin tratamiento se muestra en el anexo 7. La media de ADN recuperado fue mayor en el grupo sin tratamiento (3223 ng), seguida por el grupo tratado con saponina (898 ng) y finalmente el grupo tratado con NaOH-NALC (55 ng). La distribución de estos datos se visualiza en la gráfica de caja y bigotes de la Fig. 2.



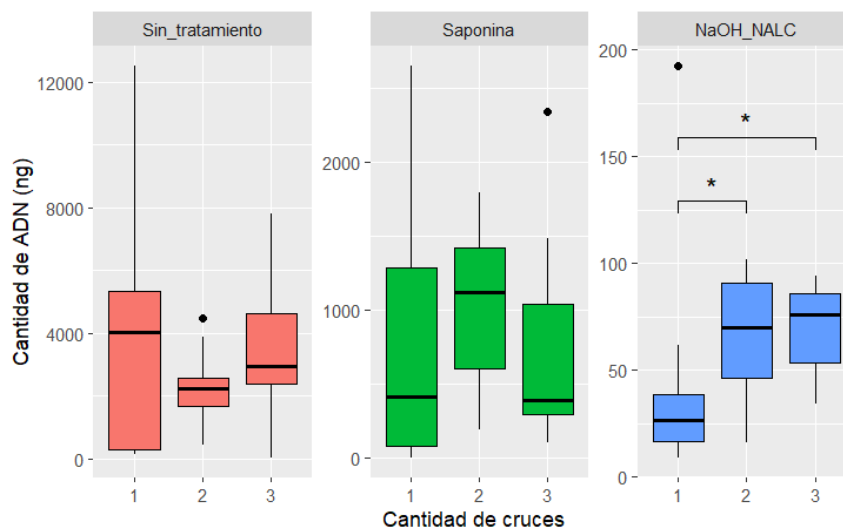
**Figura 2. Cantidad de ADN (ng) según cada tratamiento. \*\*\*  $p < 0,001$ .**

Los resultados de las pruebas estadísticas indicaron que los datos de la cantidad de ADN obtenida no cumplen con los supuestos de normalidad ni de homogeneidad de varianzas. La prueba de Shapiro-Wilk mostró valores de  $p < 0,01$  para todos los tratamientos (sin tratamiento:  $p = 0,0042$ ; saponina:  $p = 0,0082$ ; NaOH-NALC:  $p = 0,0011$ ), indicando una distribución no normal. Asimismo, la prueba de Bartlett reveló una alta heterogeneidad de varianzas entre los grupos ( $\chi^2 = 227,25$ ;  $p < 0,0001$ ).

La cantidad de ADN obtenida de los tratamientos fue diferente entre al menos 2 grupos, con un Chi-cuadrado de 57.186, grados de libertad (df) de 2 y valor p de 3.822e-13. Las

muestras sin tratamiento tienen mayor cantidad de ADN que las muestras tratadas con NaOH-NALC (valor p de 2.1e-10) y saponina (valor p de 5.4e-05); las muestras tratadas con saponina tienen mayor cantidad de ADN que aquellas tratadas con NaOH-NALC (valor p de 5.6e-08).

La distribución de la cantidad de ADN obtenida según la carga bacteriana (Anexo 7); la distribución ajustada (eje Y) de los resultados de NaOH-NALC para visualizar mejor los resultados de NaOH-NALC es mostrada en la Figura 3. Los resultados muestran que la carga bacilar no afectaron a la cantidad de ADN obtenido en las muestras sin tratamiento y con tratamiento de saponina (valor p de 0.4834 y 0.4844 respectivamente); sin embargo la carga bacilar si afecta la cantidad de ADN cuando las muestra fueron tratadas con NaOH-NALC (valor p = 0.0095). La prueba de Bonferroni mostró diferencias entre las muestras con 1 y 3 cruces (valor p = 0.0113) y entre las muestras con 1 y 2 cruces (valor p = 0.0241), es decir, las muestras con una cruz tienen una diferencia significativa menor en relación a las de 2 y 3 cruces.

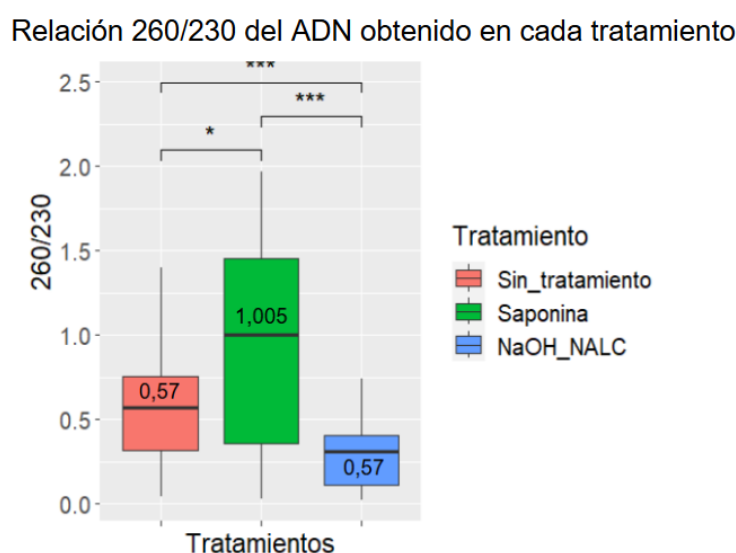


**Figura 3. Relación entre las cruces de baciloscopia y la cantidad de ADN (ng) obtenido en cada tratamiento. \* p<0.05**

## 7.1.2 Calidad del ADN

### Determinación de carbohidratos o polifenoles inhibidores (260/230) (Anexo 7)

La distribución de los valores de calidad del ADN (relación 260/230) por tratamiento se muestra en la Figura 4. En promedio, la calidad fue mayor en el grupo tratado con saponina (0,98), seguido por el grupo sin tratamiento (0,58), y finalmente el grupo tratado con NaOH-NALC (0,29).



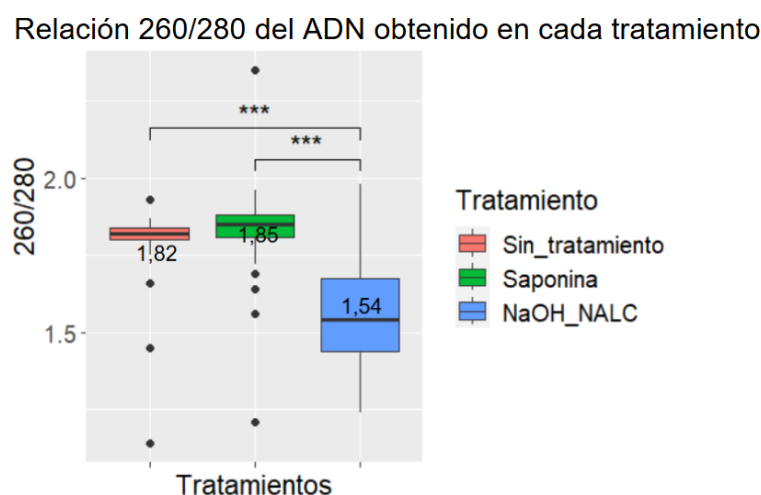
**Figura 4. Relación 260/230 obtenidos en cada tratamiento.** \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Los datos de la relación 260/230 no siguieron una distribución normal en los grupos sin tratamiento ( $p < 0,001$ ) y con saponina ( $p < 0,001$ ), mientras que los datos del grupo tratado con NaOH-NALC sí cumplieron con la normalidad ( $p = 0,71$ ). Sin embargo, las varianzas fueron homogéneas entre los tres grupos ( $p = 0,65$  en la prueba de Bartlett), lo que permitiría aplicar pruebas que asumen homogeneidad de varianzas; aun así, debido a la falta de normalidad en algunos grupos, se optó por una prueba no paramétrica.

La calidad del ADN (260/230) entre los tres tratamientos son diferentes entre al menos dos de los grupos (chi-cuadrado de 26.064 y valor  $p$  de  $2.189e-06$ ). Las calidad del ADN fue diferente entre el ADN sin tratamiento y NaOH-NALC (valor  $p$  de 0.0015); entre sin tratamiento y saponina (valor  $p$  de 0.0328), y entre saponina y NaOH-NALC (valor  $p$  de  $1.5e-05$ ).

## Determinación de proteínas y ARN (260/280) (Anexo 7)

La distribución de los valores de calidad del ADN (relación 260/280) por tratamiento se muestra en la Figura 5. En promedio, los valores fueron similares entre los grupos sin tratamiento (1,79) y con saponina (1,83), mientras que el grupo tratado con NaOH-NALC mostró un promedio ligeramente menor (1,56).



**Figura 5. Relación 260/280 obtenido en cada tratamiento. \*\*\*  $p < 0.001$ .**

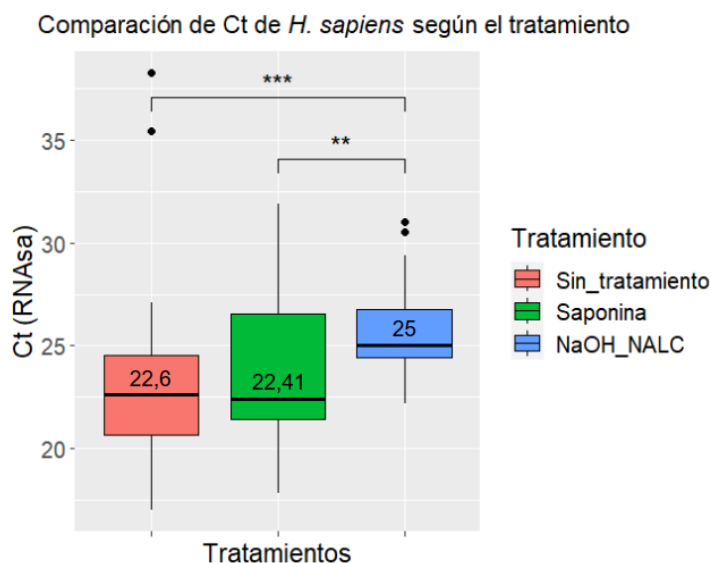
Los datos de la calidad del ADN (relación 260/280) no cumplieron con la normalidad en los grupos sin tratamiento ( $p < 0,001$ ) y con saponina ( $p < 0,001$ ), mientras que el grupo tratado con NaOH-NALC sí presentó una distribución normal ( $p = 0,71$ ). Las varianzas fueron homogéneas entre los grupos ( $p = 0,65$  en la prueba de Bartlett).

La prueba de Kruskal-Wallis sobre la calidad 260/280 evidenció que hay diferencia entre al menos dos de los grupos (valor  $p < 0.05$ ). Las comparaciones pareadas que hay diferencia entre la cantidad de proteína y ARN en las muestras obtenidas sin tratamiento y NaOH-NALC (valor  $p$  de  $1.6e-07$ ) y entre para saponina y NaOH-NALC (valor  $p$  de  $9.3e-08$ ); sin embargo, no hay diferencia, entre sin tratamiento y saponina (valor  $p$  de  $0.12$ ).

### 7.1.3 Relación ADN de *H. sapiens* y *M. tuberculosis*

- a. Análisis de PCR del gen ribonucleasa (*H. sapiens*) bajo las tres condiciones de tratamiento de muestras de esputo

Los valores de Ct obtenidos para cada muestra se encuentran en el Anexo 7. En promedio, los valores de Ct del gen ribonucleasa fueron más bajos en el grupo sin tratamiento (23,17), seguidos por el grupo tratado con saponina (23,59) y luego por el grupo NaOH-NALC (25,71), lo que indicaría una mayor cantidad de ADN amplificable en los dos primeros grupos. La distribución de estos valores por tratamiento se muestra en la Figura 6. En cada grupo se presentaron 2 muestras no detectadas.

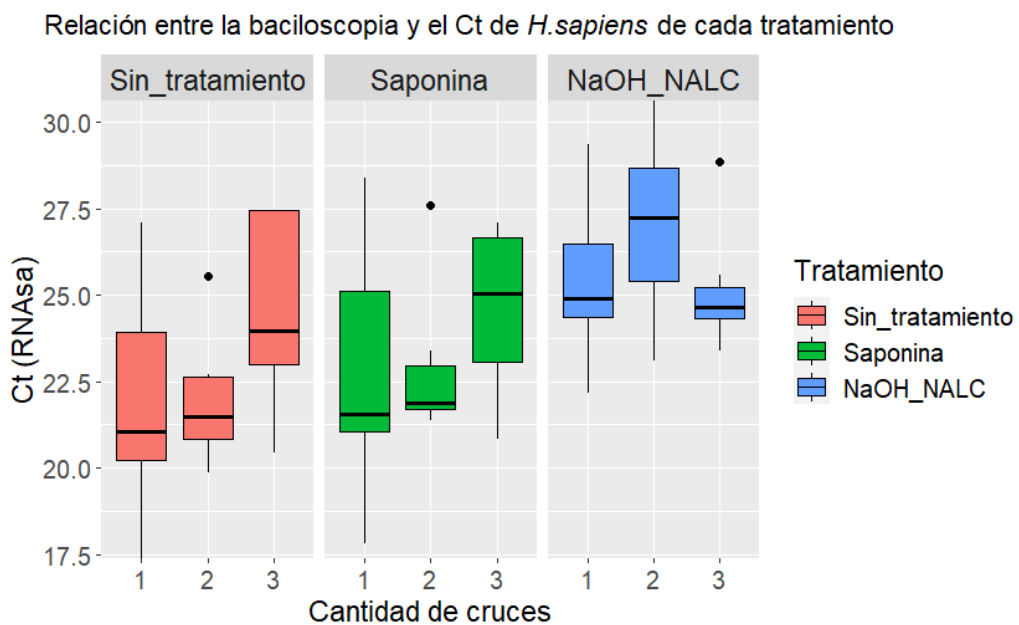


**Figura 6. Comparación de los valores de Ct de la amplificación del gen ribonucleasa (*Homo sapiens*) de las tres condiciones de tratamiento de muestras de esputo. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .**

Los valores de Ct para la amplificación del gen ribonucleasa no cumplieron con la normalidad en todos los grupos, con valores  $p$  menores a 0,01 en las pruebas de Shapiro-Wilk (sin tratamiento:  $p = 2,4 \times 10^{-5}$ ; saponina:  $p = 0,0098$ ; NaOH-NALC:  $p = 0,09$ ). Además, las varianzas entre los grupos no fueron homogéneas, según la prueba de Bartlett ( $p = 0,0038$ ), lo que limita el uso de pruebas paramétricas.

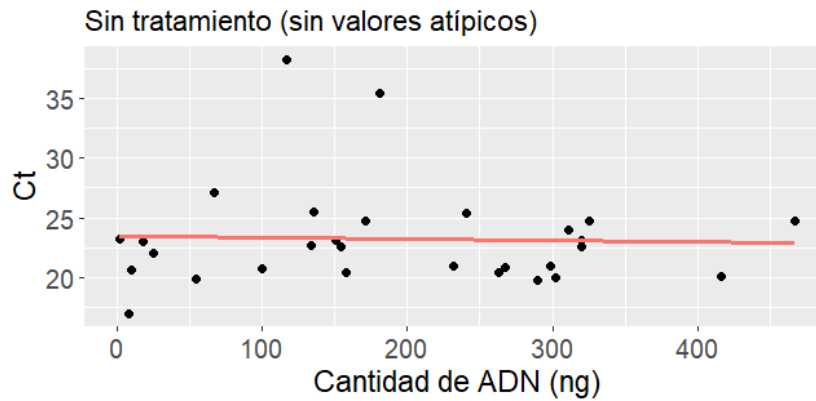
Los valores de Ct de la amplificación del gen ribonucleasa es diferente entre al menos dos de los grupos (valor p de  $1,095 \times 10^{-4}$ ). El Ct fue del tratamiento con NaOH-NALC fue mayor al Ct de las muestras sin sin tratamiento (valor p de 0.00012) y mayor al tratamiento con saponina (valor p de 0.00433); sin embargo el Ct fue similar, entre sin tratamiento y saponina (valor p de 0.56157).

La distribución de los valores de Ct obtenidos en cada tratamiento en relación a las cruces de baciloscopia se muestra en la Figura 7. Los valores de Ct fueron significativamente similares entre las muestras con diferente carga bacilar en todos los tratamientos (valor ps  $> 0.05$ ).

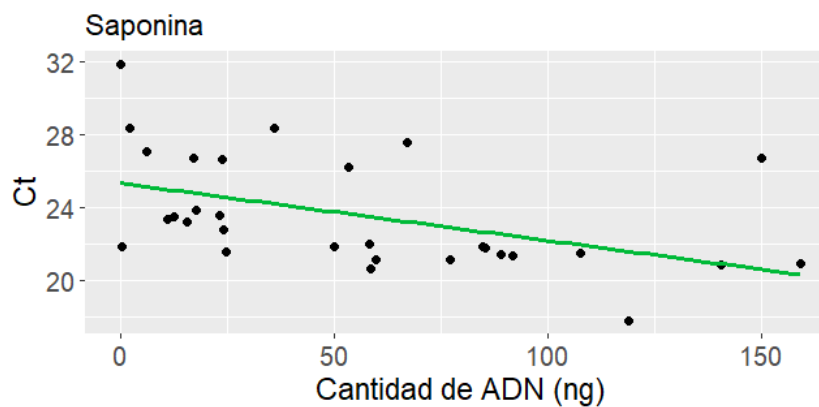


**Figura 7. Relación entre las cruces de baciloscopia y los valores de Ct del PCR gen ribonucleasa (*H. sapiens*) obtenido en cada tratamiento.**

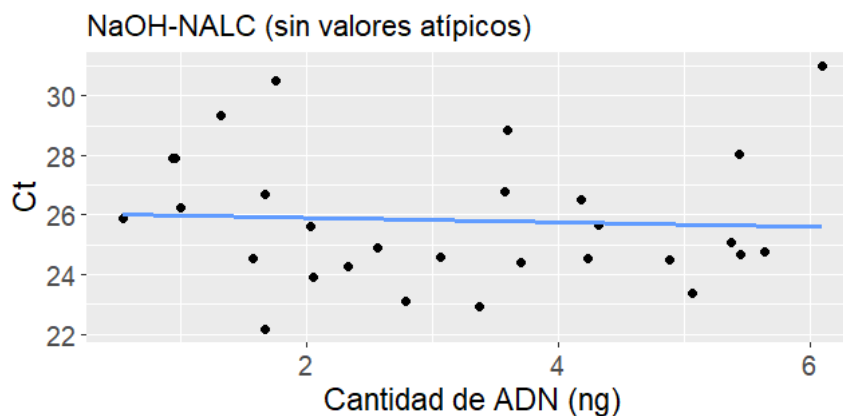
La correlación entre la cantidad de ADN y el Ct fue significativa solamente en las muestras de ADN tratadas con saponina (valor p de 0.0002); donde el Ct tiende a disminuir cuando la cantidad de ADN aumenta. Se realizaron gráficos de dispersión con una línea azul referente a la regresión lineal, que muestra la tendencia general en la relación entre las dos variables de cada tratamiento con y sin los valores atípicos cuando se requería. (Figura 8, 9 y 10)



**Figura 8. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen ribonucleasa (*H. sapiens*) y la cantidad de ADN (ng) de las muestras de esputo sin ningún tratamiento. Sin valores atípicos.  $p = 0.9219$ ,  $n = 31$ .**



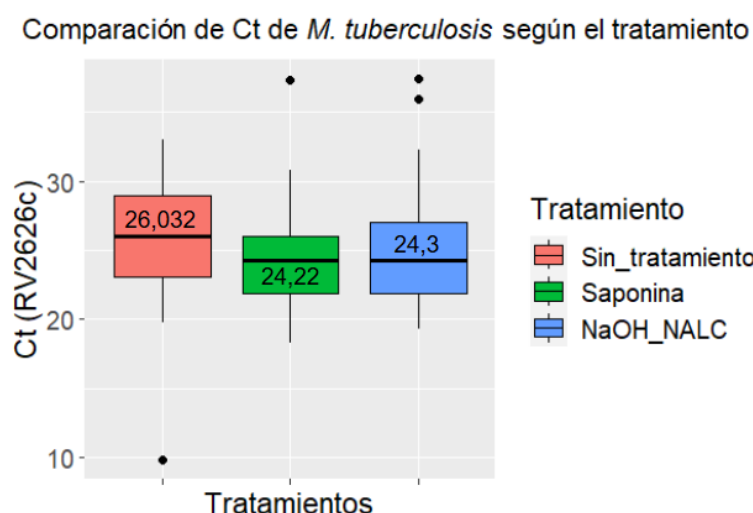
**Figura 9. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen ribonucleasa (*H. sapiens*) y la cantidad de ADN (ng) de las muestras de esputo tratadas con saponina. Correlación negativa significativa.  $p = 0.0002$ ,  $n = 32$ .**



**Figura 10. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen ribonucleasa (*H. sapiens*) y la cantidad de ADN (ng) de las muestras de esputo tratadas con NaOH-NALC. Sin valores atípicos.  $p = 0.3152$ ,  $n = 31$ .**

b. Análisis de PCR del gen Rv2626c (*M. tuberculosis*) bajo tres condiciones de tratamiento de muestras de esputo

La cantidad de ADN utilizada y los valores de Ct se encuentran en el Anexo 7. En promedio, los valores de Ct del gen Rv2626c fueron más bajos en el grupo directo (25,82), seguidos por los grupos con saponina (24,35) y NaOH-NALC (24,96). La distribución de estos valores por tratamiento se muestra en la Figura 11. Se registraron 3 muestras no detectadas en el grupo directo, ninguna en el grupo con saponina y 1 en el grupo con NaOH-NALC.



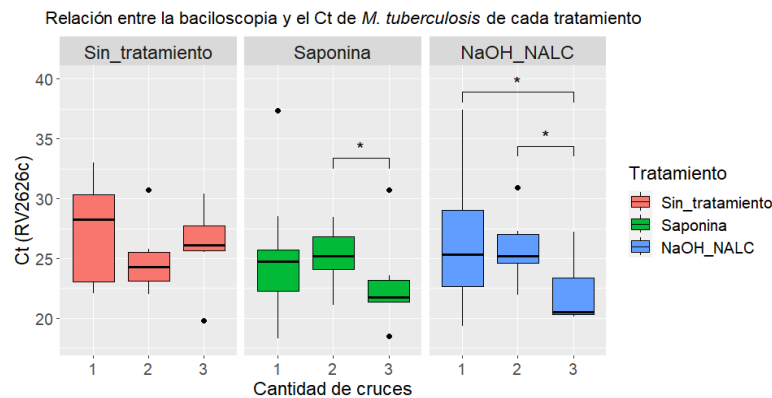
**Figura 11. Comparación de los valores de Ct de la amplificación del gen Rv2626c (*M. tuberculosis*) de las tres condiciones de tratamiento de muestras de esputo.**

Los valores de Ct para la amplificación del gen Rv2626c no cumplieron con la normalidad en los grupos sin tratamiento ( $p = 0,011$ ) y NaOH-NALC ( $p = 0,018$ ), mientras que el grupo con saponina presentó un valor  $p$  de 0,038, indicando también una posible desviación de la normalidad aunque cercano al umbral de 0,05. Las varianzas entre los grupos fueron homogéneas ( $p = 0,61$  en la prueba de Bartlett).

Los valores de Ct de la amplificación del gen Rv2626c de MTB son similares entre todos los grupos diferentes (valor  $p$  de 0.1048).

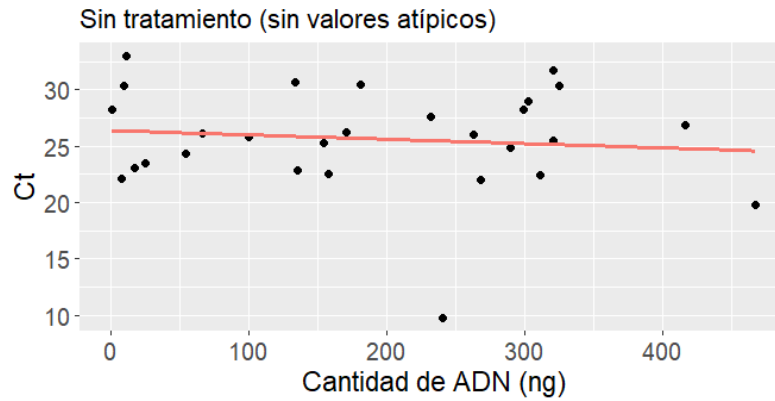
La distribución de los valores de Ct obtenidos en cada tratamiento en relación a las cruces de baciloscopía se muestra en la Figura 13. Los valores de Ct entre carga bacteriana fue

diferente en los tratamientos de saponina y NaOH-NALC (valor de p 0.075 y 0.0306, respectivamente); y fue similar entre las muestras sin tratamiento (valor p de 0.4603). En la comparación por pares en NaOH-NALC y Saponina, este último porque estaba cercano a 0.05, los resultados de NaOH-NALC mostraron menor Ct en las muestras con 3 cruces en relación a las de 2 (valor p de 0.033) y las de 1 (valor p de 0.269). Asimismo, en el grupo de saponina, los valores de Ct entre los grupos de 2 y 3 cruces fueron diferentes (valor p de 0.0402). (Figura 12)

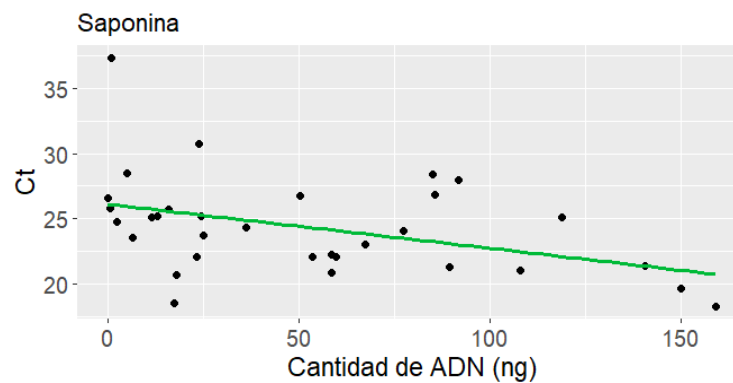


**Figura 12. Relación entre las cruces de baciloscopia y los valores de Ct del PCR Rv2626c (*M. tuberculosis*) obtenido en cada tratamiento. \* p < 0.05.**

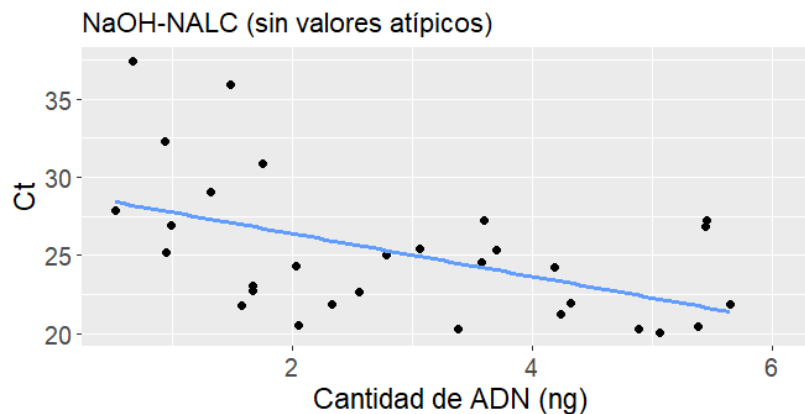
La correlación entre la cantidad de ADN y los valores de Ct en cada tratamiento mostraron un valor p de 0.0283, -0.3999 y -0.5504 para el sin tratamiento, saponina y NaOH-NALC respectivamente y un valor p de 0.8840, 0.0233 y 0.0013. En el caso del tratamiento con saponina, se encontró una correlación negativa débil pero significativa, lo que sugiere que mayores cantidades de ADN tienden a reducir ligeramente los valores de Ct. Por otro lado, en el tratamiento NaOH-NALC se observó una correlación negativa moderada y significativa, indicando que un aumento en la cantidad de ADN se asocia con una disminución más clara en los valores de Ct, lo que podría reflejar una mayor eficacia en la amplificación de ADN en este tratamiento. Los gráficos de dispersión incluyendo una línea azul referente a la regresión lineal, que muestra la tendencia general con y sin los valores atípicos se muestran en las Figuras 13, 14, y 15.



**Figura 13. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen Rv2626c (*M. tuberculosis*) y la cantidad de ADN (ng) sin ningún tratamiento. Sin valores atípicos.  $p = 0.8840$ ,  $n = 31$ .**



**Figura 14. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen RV2626c (*M. tuberculosis*) y la cantidad de ADN (ng) tratadas con saponina. Correlación negativa débil significativa,  $p = 0.0233$ ,  $n = 32$ .**

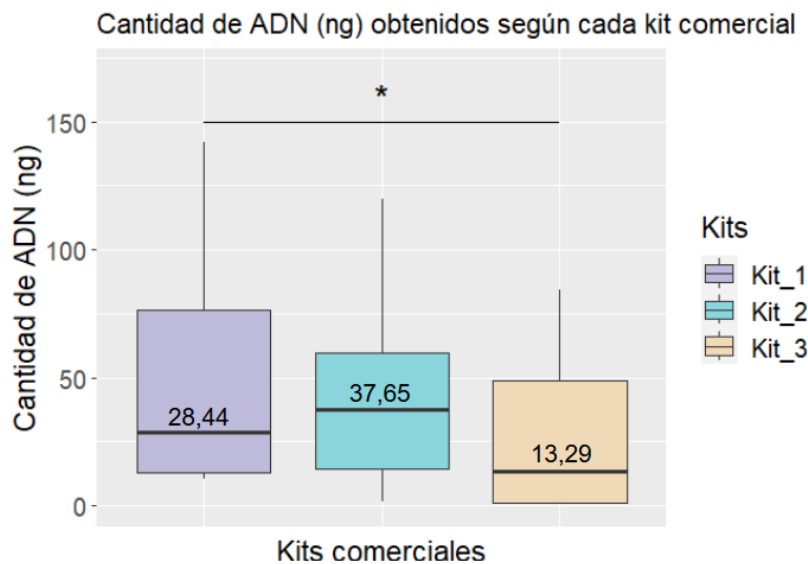


**Figura 15. Correlación de los valores de Ct de la amplificación del gen Rv2626c (*M. tuberculosis*) y la cantidad de ADN (ng) tratadas con NaOH-NALC. Sin valores atípicos. Correlación negativa moderada significativa,  $p = 0.0013$ ,  $n = 31$ .**

## 7.2 Fase 2: Comparaciones de kits de extracción de ADN comerciales

### 7.2.1 Cantidad de ADN

La cantidad de ADN obtenido con los kits comerciales Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Kit 1), Quick-DNA Miniprep Plus (Kit 2) y ZymoBIOMICS DNA Miniprep (Kit 3) se muestra en el Anexo 8. En promedio, el Kit 1 presentó la mayor cantidad de ADN (91,19 ng), seguido por el Kit 2 (77,87 ng) y el Kit 3 (50,06 ng). La distribución de estos datos por cada kit se presenta en la gráfica de caja y bigotes de la Figura 16.

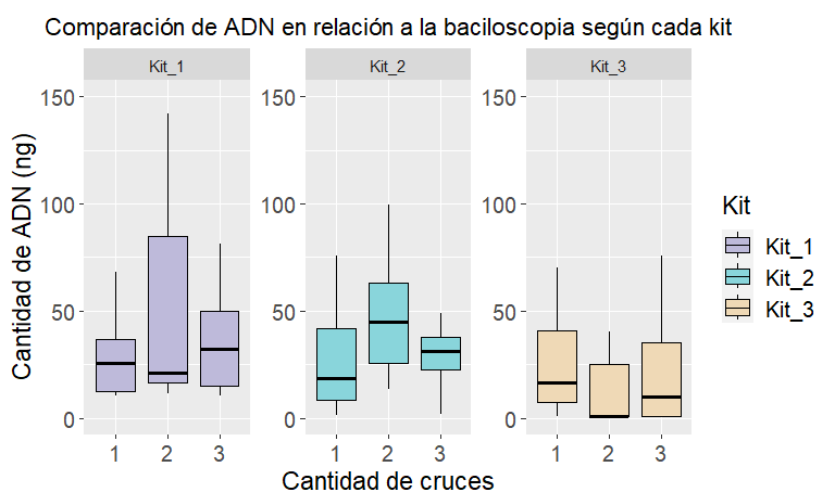


**Figura 16. Cantidad de ADN (ng) obtenida según cada kit comercial (sin valores atípicos).** \*  $p < 0.05$ . Kit 1: Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep kit, Kit 2: Quick-DNA Miniprep Plus kit (Kit 2) y Kit 3: ZymoBIOMOCS DNA Miniprep Kit.

La cantidad de ADN obtenida con los tres kits comerciales no sigue una distribución normal ( $p < 0,001$  para todos los kits en la prueba de Shapiro-Wilk) y las varianzas entre los grupos no son homogéneas, como lo indica la prueba de Bartlett ( $p < 0,001$ ).

La cantidad de ADN obtenida de los kits fue diferente entre al menos 2 grupos, con un Chi-cuadrado de 7.4836, grados de libertad de 2 y valor p de 0.02371. Los resultados de los valores p para la comparación pareada entre Kit\_1 y Kit\_2 fue de 1.0, entre Kit\_2 y Kit\_3 de 0.095 y entre Kit\_1 y Kit\_3 Miniprep Kit fue 0.031, esta última comparación mostró diferencia significativa.

La distribución de la cantidad de ADN (ng) obtenida según la carga bacteriana (Anexo 8) y la distribución normalizada (eje Y) en todos los grupos es mostrada en la Figura 17. Los resultados de la suma de rangos de Kruskal-Wallis arrojó un valor p de 0.8387, 0.3279 y 0.8387 para el Kit 1, Kit 2 y Kit 3 respectivamente, por lo que no había diferencias estadísticamente significativas en las cantidades obtenidas de los tres kits entre los niveles de la variable cruces.



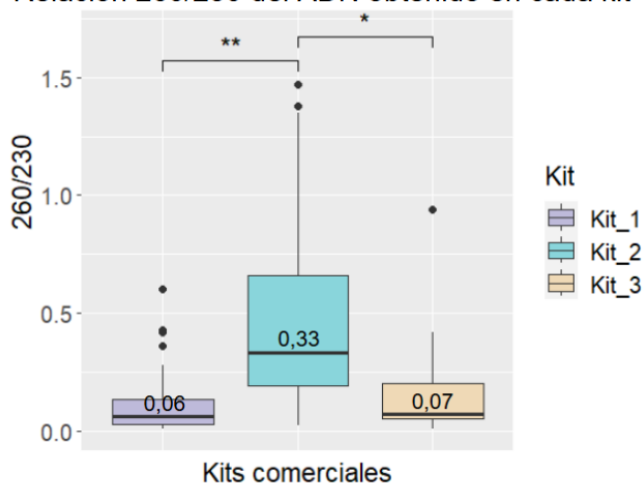
**Figura 17. Relación entre las cruces de baciloscofia y la cantidad de ADN (ng) obtenida en cada kit comercial (sin valores atípicos).** Kit 1: Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep kit, Kit 2: Quick-DNA Miniprep Plus kit (Kit 2) y Kit 3: ZymoBIOMOCS DNA Miniprep Kit.

### 7.2.2 Calidad del ADN

#### Determinación de carbohidratos o polifenoles inhibidores (260/230) (Anexo 8)

El resumen estadístico de la calidad del ADN (relación 260/230) obtenida con cada kit comercial se muestra en la Figura 18. En promedio, el Kit 2 presentó la mejor calidad (0,46), seguido por el Kit 3 (0,15) y el Kit 1 (0,12).

Relación 260/230 del ADN obtenido en cada kit



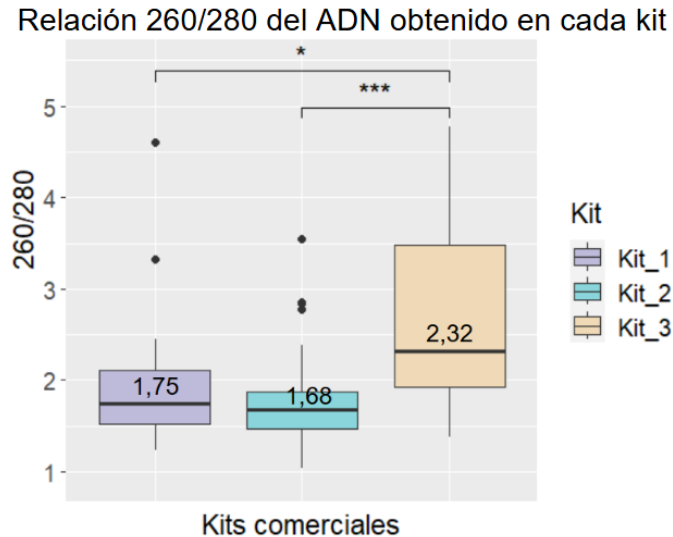
**Figura 18. Relación 260/230 obtenidos según cada kit comercial.** \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Kit 1: Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep kit, Kit 2: Quick-DNA Miniprep Plus kit (Kit 2) y Kit 3: ZymoBIOMOCs DNA Miniprep Kit.

Ninguno de los kits comerciales cumplió con la normalidad en la calidad del ADN (relación 260/230), según la prueba de Shapiro-Wilk ( $p < 0,001$  para los tres kits). Además, las varianzas no fueron homogéneas entre los grupos, como indicó la prueba de Bartlett ( $p < 0,001$ ).

La calidad del ADN (260/230) entre los tres tratamientos son diferentes entre al menos dos de los grupos (valor  $p$  de  $1.151e-07$ ). La calidad del ADN fue diferente entre el Kit\_1 y Kit\_2 (valor  $p$  de  $1.0e-06$ ) y entre el Kit\_2 y Kit\_3 (valor  $p$  de  $4.6e-05$ ), mientras que entre Kit\_1 y Kit\_3 no hubo diferencia significativa (valor de  $p$  de 0.2).

#### Determinación de proteínas y ARN (260/280) (Anexo 8)

El resumen estadístico de la calidad del ADN (relación 260/280) obtenida con cada kit comercial se presenta en la Figura 19. En promedio, el Kit 3 mostró la mejor calidad con un valor de 2,69, seguido por el Kit 1 con 1,88 y el Kit 2 con 1,77.



**Figura 19. Relación 260/280 obtenidos según cada kit comercial.** \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Kit 1: Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep kit, Kit 2: Quick-DNA Miniprep Plus kit (Kit 2) y Kit 3: ZymoBIOMOCs DNA Miniprep Kit.

Los datos de calidad del ADN (relación 260/280) obtenidos con los tres kits comerciales no cumplen con la normalidad, según la prueba de Shapiro-Wilk ( $p < 0,001$  para todos los kits). Además, las varianzas entre los grupos no son homogéneas, como lo indica la prueba de Bartlett ( $p < 0,001$ ).

La calidad del ADN fue diferente entre al menos dos de los grupos (valor  $p < 0.05$ ). Las comparaciones pareadas mostraron que no hay diferencia entre Kit\_1 y Kit\_2 (valor  $p$  de 1.000); sin embargo si hubieron diferencias entre Kit\_2 y Kit\_3 (valor  $p$  de 0.00012) y entre Kit\_1 y Kit\_3 (valor  $p$  de  $4.7e-06$ ).

## VIII. Discusión:

### 8.1 Evaluación del efecto del tratamiento con NaOH-NALC o saponina:

El tratamiento previo de la muestra de esputo es fundamental para evitar las desventajas que presentan diversos métodos de extracción de ADN. En la mayoría de estudios se hace uso de dithiothreitol (DTT) como único reactivo previo a la extracción de muestras biológicas junto con una inactivación por calor. (17,48,49,50) Estas fuentes muestran limitaciones si no se combina con otros tratamientos para mejorar la calidad y cantidad

de ADN de MTB, especialmente si se quiere utilizar para secuenciación. Por lo que otros estudios emplean N-acetil-L-cisteína o NaOH para la disolución de esputo y la recuperación de ADN o ARN microbiano. (51, 52)

También existen investigaciones donde implementan métodos optimizados para detectar infecciones respiratorias bacterianas mediante el uso de saponina para depleción de ADN humano, lo que permite eliminar hasta el 99.99 % de ADN del huésped en muestras respiratorias, aumentando la capacidad de detectar ADN bacteriano con alta sensibilidad y especificidad. (33) La secuenciación metagenómica (RMg) mostró tiempos de respuesta rápidos (6-24 horas) y un 93-96.6 % de sensibilidad en comparación con cultivos tradicionales, que tardan entre 29 y 40 horas. (34) Estos métodos identificaron patógenos difíciles de cultivar, como *M.tuberculosis*, *Tropheryma whipplei*, y *Legionella pneumophila*, por ejemplo para *M. abscessus* se incrementaron entre 12.5 y 74.5 veces los reads bacterianos, alcanzando cobertura completa del genoma tras el tratamiento con saponina. (37) Además, en infecciones mixtas o cultivos negativos, lograron identificar patógenos en un 93.7 % de los casos, sin verse afectados por el uso previo de antibióticos, lo que refuerza su potencial para diagnósticos más rápidos y efectivos en infecciones graves como la sepsis. (38) Todos estos artículos toman como base la estandarización realizada de descontaminación con saponina por la tesis doctoral de Charalampous T. (16)

El estudio de Charalampous se centró en mejorar la detección de ADN microbiano en muestras clínicas, específicamente de esputo, reduciendo la interferencia del ADN humano mediante el tratamiento con saponina. La saponina, conocida por su capacidad para permeabilizar las membranas de las células eucariotas, demostró ser muy eficaz en la reducción del ADN del huésped, logrando una depleción de hasta 74 veces mediante análisis de PCR cuantitativa (qPCR). En estas pruebas, los valores de Ct para el ADN humano aumentaron significativamente con el tratamiento con saponina, lo que indica un agotamiento exitoso del ADN del huésped, mientras que el ADN bacteriano (16S rRNA) se preservó. (16)

En la primera parte de este trabajo se optó por realizar una comparación entre el protocolo estandarizado de tratamiento de esputo con saponina de Charalampous T. (16) y el

método tradicional de descontaminación de esputo orientado a detectar con cual se puede obtener mayor cantidad de ADN recuperado de *M. tuberculosis* y la reducción del ADN humano. Evaluar el efecto de estos agentes en la concentración y pureza obtenida proporciona información crucial sobre su idoneidad para su uso en análisis moleculares posteriores, como la secuenciación o PCR. Los resultados obtenidos de esta primera parte relacionada al primer objetivo específico, proporcionan una evaluación comparativa entre los tres grupos de tratamiento de muestras de esputo: NaOH-NALC, Saponina y sin tratamiento (sin tratamiento), con posterior extracción por el kit Quick-DNA Miniprep Plus Kit. La eficacia de estos tratamientos se evaluó en términos de la cantidad y calidad del ADN extraído, así como de la cantidad específica de ADN de MTB y de humano.

### 8.1.1 Sin tratamiento

La simplicidad y rapidez del procedimiento son sus principales ventajas. Este método produjo la mayor cantidad de ADN en promedio (3334 ng), lo que es beneficioso para aplicaciones que requieren grandes cantidades de ADN. Sin embargo, el ADN obtenido incluye material genético de múltiples bacterias y del propio huésped, lo que puede complicar la interpretación de los resultados de secuenciación y puede requerir pasos adicionales de purificación para aislar el ADN específico de MTB.

### 8.1.2 Tratamiento con NaOH-NALC

Aunque el tratamiento es efectivo, puede resultar en una menor cantidad de ADN extraído. En este estudio, la cantidad promedio fue de 54 ng de ADN total, significativamente menor que en los métodos sin tratamiento y con saponina. Esto puede ser debido a la lisis parcial de las bacterias y la posible pérdida de ADN durante el proceso de descontaminación. Además, la alta alcalinidad del NaOH puede desnaturalizar no solo proteínas y lípidos, sino también a los ácidos desoxirribonucleicos si no se maneja el tiempo adecuadamente. Un tiempo de exposición prolongado o concentraciones inadecuadas pueden resultar en la degradación del ADN, afectando la calidad del material genético para aplicaciones posteriores. (14) Cabe resaltar que la eficiencia del tratamiento con NaOH-NALC puede variar según la composición de la muestra de esputo, incluyendo

la carga bacteriana inicial y la presencia de otros componentes que pueden interactuar con los agentes químicos utilizados.

### 8.1.3 Tratamiento con saponina

Al eliminar las células humanas y otros contaminantes, el tratamiento con saponina mejora la calidad del ADN extraído, lo cual es crucial para aplicaciones que requieren ADN bacteriano de alta pureza, como la secuenciación. Aunque las paredes celulares bacterianas son más resistentes, un tratamiento prolongado o concentraciones más altas de saponina pueden dañar las bacterias y afectar la cantidad de ADN extraído. Además, el protocolo de tratamiento con saponina incluye varios pasos de incubación y centrifugación, lo que puede aumentar la complejidad y el tiempo necesario para preparar las muestras. (15,16)

### 8.1.4 Cantidad y calidad del ADN extraído:

Con respecto a los resultados de la cantidad y calidad, todos los tratamientos mostraron diferencias significativas. Aunque el grupo sin tratamiento proporciona una alta cantidad de ADN (media de 3334.55 ng) y la relación 260/280 es cercano al rango ideal (1.8 - 2.0), la pureza de 260/230 es moderada, lo que sugiere la presencia de contaminantes en algunas muestras. En relación al tratamiento con saponina, presentó la mayor pureza de ADN (relaciones 260/280 y 260/230), lo que indica una efectiva eliminación de proteínas y contaminantes. Aunque la cantidad de ADN (media de 872.2 ng) fue menor que el grupo sin tratamiento, fue mayor que el tratamiento con NaOH-NALC (media de 54.608 ng). De acuerdo a este último tratamiento, fue efectivo para la descontaminación y eliminación de material genético no deseado, aunque esto no se refleja en una alta pureza en la relación 260/230, lo que indica que no es tan eficiente en eliminar carbohidratos y polifenoles inhibidores.

En síntesis, en comparación con el grupo sin tratamiento y el tratamiento con NaOH-NALC, el tratamiento con saponina ofrece un equilibrio entre cantidad y pureza de ADN. Mientras que el grupo sin tratamiento produce mayores cantidades de ADN, incluyendo contaminantes, y el NaOH-NALC es altamente eficaz en descontaminar de manera más

robusta pero a expensas de una menor cantidad de ADN. Por lo que el tratamiento con saponina logra una buena selectividad y reducción de contaminantes, aunque con cierta variabilidad en los resultados. Sin embargo, nos referimos a ADN total, no específicamente de *M. tuberculosis*, por lo que se tiene que considerar los resultados de los qPCRs específicos para TB antes de llegar a una conclusión de la eficiencia de estos tratamientos.

#### 8.1.5 Relación entre ADN de MTB y ADN humano:

La relación entre el ADN de MTB y el ADN humano es crucial para la precisión del secuenciamiento. En este caso, el objetivo principal es maximizar la cantidad de ADN obtenido de TB en relación a la cantidad total de ADN de manera que no haya tanto ruido en el secuenciamiento correspondiente a otras bacterias o del propio huésped. Por lo tanto, también se buscaba que la cantidad de ADN de *H. sapiens* idealmente sea menor en el mejor tratamiento a comparación de los otros.

Por un lado, si observamos la comparación en el diagrama de caja y bigotes de humano (Figura 7) se puede ver que el grupo de NaOH-NALC tiene un mayor Ct, en otras palabras, menos ADN humano, a comparación de saponina y sin tratamiento; y entre estos dos no hay diferencias. Cabe resaltar que estas comparaciones son a nivel de medianas, pero las cantidades que se colocaron para amplificar no fueron normalizadas entre los grupos. En otras palabras, el rango de los nanogramos de ADN que se colocaron para amplificar para el grupo de NaOH-NALC fue entre 0.5319 y 11.556, para saponina, 0.0052 y 159.3, y sin tratamiento, 1.6398 y 750,6. Por otro lado, cuando comparamos el diagrama de caja y bigotes de TB, no hay diferencias entre los grupos (Figura 12). Por lo tanto, sólo se podría confirmar que sin importar la cantidad, todos los métodos obtuvieron la misma cantidad de ADN de TB. En otras palabras, a pesar que NaOH-NALC haya obtenido menor cantidad de ADN total, obtuvo una misma cantidad de ADN de TB que los otros métodos y, por ello, un mayor porcentaje del ADN total correspondía a TB.

Adicionalmente, se realizaron correlaciones entre el ADN colocado en las amplificaciones y los valores de Ct de humano (Fig. 9,10 y 11) y TB (Fig. 14, 15 y 16) para cada tratamiento. En los gráficos del método sin tratamiento no parece tener una

relación significativa con la cantidad de ADN añadido en ninguno de los dos casos (ADN humano o TB), lo que sugiere que no es el mejor método para extraer selectivamente ADN de *M. tuberculosis*. En el grupo de saponina, los resultados de ADN humano tienen una correlación negativa y altamente significativa, lo que indica que mayores cantidades de ADN extraído con este tratamiento están asociadas con mayores cantidades de ADN humano amplificado. Esto sugiere que este tratamiento extrae más ADN humano, lo cual es contraproducente para obtener mayor cantidad de ADN de TB en relación al ADN total. Sin embargo, para el ADN de TB, aunque la correlación es negativa, es más débil a la de NaOH-NALC. Por último, en este último grupo mencionado, los resultados del ADN humano no tienen una correlación significativa, lo que indica que este tratamiento no extrae grandes cantidades de ADN humano, lo cual es deseable para el objetivo. Además, para el ADN de TB, se observa una correlación negativa moderada y significativa, lo que implica que este tratamiento es efectivo para extraer ADN de MTB.

Es relevante destacar que, aunque el rango de ADN colocado en el PCR para el tratamiento NALC-NaOH es el más reducido en comparación con los otros tratamientos, aún así ha demostrado tener las mejores correlaciones para TB. Esto sugiere que, en futuros trabajos, sería importante considerar ampliar este rango de ADN colocado en el PCR para explorar aún más el potencial de este tratamiento en mejorar la relación entre ADN de MTB y ADN humano, optimizando así la extracción de ADN de interés. Asimismo, los valores de calidad podrían ser mejorados mediante variaciones del protocolo y posteriores purificaciones. Para proceder a la segunda parte de esta investigación se consideró a NALC-NaOH como el tratamiento más prometedor para obtener mayor ADN de MTB, ya que no extrae cantidades significativas de ADN humano, mientras que muestra una moderada y significativa correlación con la cantidad de ADN de TB añadido.

#### 8.1.6 Evaluación de complejidad, costos y recursos:

El tratamiento con saponina tiende a ser más laborioso y costoso en comparación con el NaOH-NALC. Esto se debe a los múltiples pasos de incubación y centrifugación requeridos en el proceso de tratamiento con saponina, lo que aumenta tanto el tiempo necesario para completar el procedimiento como el costo asociado con el uso de reactivos

y consumibles adicionales. Por otro lado, el tratamiento con NaOH-NALC es generalmente más simple y rápido. Requiere menos manipulación de la muestra y menos pasos, lo que lo hace más eficiente en términos de tiempo y recursos. Sin embargo, este enfoque puede resultar en una menor cantidad de ADN total extraído en comparación con la saponina, pero se obtiene igual cantidad de TB. (14,16)

### 8.2 Comparación de la eficacia de kits comerciales de extracción de ADN:

En cuanto a la extracción del ADN, los tipos de métodos presentan diferencias que se reflejan en los resultados. Por ejemplo, el uso de calor combinado con ribólisis mecánica (FastPrep-24) implica un tratamiento rápido y eficiente para muestras complejas, aplicando calor a 95°C por 1 hora y utilizando centrifugación a 16,000 x g. (17, 41) Sin embargo, el FastPrep-24 puede romper el ADN afectando la integridad. En cambio, el método de fenol-cloroformo emplea un tratamiento más laborioso, como la centrifugación y el uso de calor a 100°C, pero es altamente confiable para eliminar inhibidores, lo que lo hace ideal para secuenciación (50). También está el uso de kits especializados como el Ultra Deep Microprep DNA Kit o el DNA PrepMate-M, pero en muchos casos, estos kits no están disponibles en Perú. (33, 50) Asimismo, los kits de Qiagen ofrecen un enfoque más estandarizado y rápido (18, 52); sin embargo, el costo de estos kits es considerablemente alto en comparación con métodos más tradicionales. Por último, los métodos enzimáticos como el uso de lisozima requieren digestiones prolongadas, lo que, aunque garantiza alta pureza, puede alargar el proceso. (33, 34)

Existen estudios que comparan diferentes kits comerciales para extraer ADN de bacterias, como el de L. Terranova et al, en donde comparan 5 kits comerciales: Roche High Pure PCR Template Preparation Kit, Zymo Quick-DNA Universal Kit, MoBio PowerLyzer PowerSoil DNA isolation kit, QIAGEN QIAmp Cador Pathogen Mini kit y ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit. En este estudio se muestra que Roche y Zymo Universal proporcionan una mayor profundidad de secuenciación y ofrecen un rendimiento de extracción de ADN significativamente superior. Asimismo, Zymobiomics también es una opción robusta con buen rendimiento de extracción y adecuada profundidad de secuenciación. Por otro lado, QIAGEN y Mobio podrían ser menos preferidos debido a sus menores rendimientos de ADN, aunque siguen siendo

competentes en términos de amplificación y detección del gen 16S rRNA. (12) También en Charalampous T. et al, mencionan a MagNA Pure Compact (Roche), MaxWell (Promega) y QIAcube (QIAGEN) los cuales son ejemplos de sistemas automatizados que ofrecen extracción y purificación rápida de ADN (27 min para 8 muestras en Compact, 36 min para 48 muestras en Maxwell y 90 min para 96 muestras en QIAcube). (35)

En comparación con métodos no comerciales, los métodos manuales pueden variar significativamente entre laboratorios y operadores, lo que puede introducir variabilidad en la calidad del ADN extraído. Esto puede afectar negativamente la reproducibilidad de los resultados de secuenciación. Los métodos manuales y no comerciales a menudo requieren una optimización extensa para cada tipo de muestra específica. Esto puede ser un proceso largo y complejo, que requiere experiencia técnica y recursos adicionales. Además, los procedimientos manuales pueden ser más propensos a la contaminación cruzada y otros errores técnicos, lo que puede comprometer la integridad del ADN extraído y los resultados de la secuenciación. La eficiencia del proceso de extracción de ADN puede ser menor en métodos no comerciales, tanto en términos de cantidad como de calidad del ADN recuperado, lo que puede resultar en una menor cobertura y calidad de la secuenciación. (27,32)

En la segunda parte de este trabajo se escogieron los kits comerciales de la marca Zymo Research ya que ofrecen varias ventajas en comparación con métodos no comerciales y son menos costosos a comparación de otras marcas. Los protocolos de cualquier kit comercial pasan por rigurosos controles de calidad durante su fabricación, lo que garantiza una consistencia en el rendimiento y la pureza del ADN extraído. Esto es importante para obtener resultados reproducibles y confiables en la secuenciación. Además, los fabricantes de kits comerciales han optimizado los protocolos para maximizar el rendimiento y la pureza del ADN. Por lo tanto, suelen ser más eficientes y menos propensos a errores en comparación con los métodos manuales, que pueden ser más variables y dependientes del operador. También, suelen tener protocolos más rápidos y menos laboriosos, lo que reduce el tiempo de preparación y permite procesar más muestras en menos tiempo. (30,31)

Se han escogido los kits Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep, Quick-DNA Miniprep Plus y ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, debido a que son altamente versátiles y específicos para manejar muestras complejas. El primero, por ejemplo, está diseñado específicamente para la extracción de ADN de hongos y bacterias, lo que lo hace ideal para esputos que pueden contener una variedad de microorganismos. Esta capacidad para manejar matrices complejas asegura una alta eficiencia en la extracción de ADN de patógenos relevantes en muestras de TB. El segundo ofrece una extracción rápida y eficiente de ADN de varios tipos de muestras, incluidas las difíciles como el esputo, garantizando una recuperación máxima del ADN, esencial para obtener resultados precisos en secuenciación. El tercero está diseñado para extraer ADN de muestras complejas y diversas, incluyendo microbiomas, lo cual es ideal para esputos con alta carga microbiana, minimizando el sesgo de extracción, esencial para estudios metagenómicos y de secuenciación profunda. (23,24,25)

El ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit utiliza un método robusto de lisis celular que incluye una incubación prolongada con una solución de lisis y Proteinasa K a 65°C durante 90 minutos, seguido de una ruptura mecánica intensiva mediante vortex a máxima potencia por 40 minutos. Este proceso asegura una disgregación completa de las membranas celulares, facilitando la liberación de ADN. La centrifugación subsiguiente y el uso de filtros Zymo-Spin™ aseguran una eliminación eficaz de los residuos celulares. La combinación de tampones de lavado y elusión específicos mejora la pureza del ADN, aunque la cantidad total de ADN obtenido puede ser menor debido a la rigurosidad del proceso de purificación, que minimiza la contaminación con proteínas y otros residuos. (23)

El Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit también emplea un método de lisis dual, combinando una digestión enzimática con Proteinasa K y una disrupción mecánica mediante vortex. Sin embargo, el tiempo de incubación y la composición de los tampones de lisis son diferentes, lo que podría afectar la eficiencia de la ruptura celular y la liberación de ADN. Este kit utiliza un paso de centrifugación adicional para separar los componentes celulares y varias etapas de lavado para purificar el ADN. La eficacia de la eliminación de contaminantes puede no ser tan alta como en el ZymoBIOMICS Kit, lo

que podría explicar la mayor cantidad de ADN recuperado pero con una calidad ligeramente inferior en términos de pureza. (24)

El Quick-DNA Miniprep Plus Kit sigue un protocolo simplificado que incluye una digestión inicial con Proteinasa K a 55°C y un proceso de lisis química con un tampón específico. La ausencia de una ruptura mecánica intensiva puede resultar en una liberación menos completa de ADN de células más resistentes, lo que podría explicar las menores cantidades de ADN extraído en comparación con los otros kits. Sin embargo, el proceso de purificación de este kit incluye múltiples pasos de lavado con tampones específicos que mejoran la pureza del ADN, como se evidencia en los resultados de las mediciones de 260/230 y 260/280. Esto sugiere que, aunque la cantidad de ADN es menor, la calidad del ADN es suficientemente alta para aplicaciones que requieren alta pureza. (25)

Los tres kits comerciales escogidos están diseñados para proporcionar ADN de alta pureza y calidad, libre de contaminantes que puedan inhibir las reacciones de PCR y secuenciación. La pureza del ADN es fundamental para asegurar la precisión y reproducibilidad de los análisis posteriores, especialmente en estudios de secuenciación donde las impurezas pueden afectar significativamente la calidad de los datos. También la facilidad de uso y los protocolos eficientes de estos kits son factores importantes. Asimismo, son compatibles con diversas plataformas de secuenciación, asegurando que el ADN extraído sea adecuado para aplicaciones avanzadas como la secuenciación de próxima generación (NGS). (23,24) Además, a menudo incluyen componentes y reactivos que mejoran la seguridad del manejo de muestras infecciosas, reduciendo el riesgo de exposición a patógenos y mejorando la seguridad del laboratorio. (30,31) Finalmente, Zymo Research es una compañía reconocida por sus productos de alta calidad y soporte técnico excelente, aparte de la disponibilidad de los kits y los costos asociados con su adquisición a través de distribuidores locales o internacionales, asegurando un suministro continuo y un soporte adecuado. (25,36)

Los resultados de las extracciones de ADN por los tres kits comerciales proporcionan una evaluación comparativa de estos kits comerciales, considerando tanto la cantidad como la calidad del ADN extraído, medidos en términos de concentración de ADN y relaciones

de pureza (260/280 y 260/230), de muestras de esputo de pacientes con tuberculosis con el fin de evaluar la pureza. Cada muestra fue tratada con NaOH-NALC y procesada según los protocolos y reactivos de cada kit.

### 8.2.1 Cantidad de ADN extraído:

Los resultados de las cantidades de ADN extraído varió significativamente entre los kits utilizados. El Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit mostró la mayor cantidad promedio de ADN con una media de 91.19 ng, seguido del Quick-DNA Miniprep Plus Kit con una media de 77.87 ng. La amplia gama de valores obtenidos (desde un mínimo de 10.35 ng hasta un máximo de 1602 ng y de 1.64 ng hasta 59.85 ng respectivamente) sugiere que estos kits son capaces de manejar tanto muestras con bajo contenido de ADN como aquellas con alto contenido. El ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit obtuvo la menor cantidad promedio con una media de 50.06 ng. Según la prueba de Kruskal-Wallis y comparaciones pareadas indicaron que había diferencias significativas únicamente entre el ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit y el Quick-DNA Miniprep Plus Kit ( $p = 0.031$ ). Estos resultados sugieren que, en términos de cantidad de ADN, el Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit es más eficiente, aunque la diferencia no es significativa respecto al Quick-DNA Miniprep Plus Kit.

La combinación de incubación a 65°C con Proteinasa K y la homogeneización mediante vortex a máxima potencia del Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit asegura una ruptura efectiva de células fúngicas y bacterianas robustas. Asimismo, la formulación de los tampones y el diseño de las columnas de purificación parecen ser eficaces para capturar y eluir grandes cantidades de ADN. En el caso de Quick-DNA Miniprep Plus Kit, la incubación a 55°C con Proteinasa K, sin un paso de lisis mecánica intensiva, podría ser suficiente para muestras con células muy resistentes. Aunque el procedimiento es más rápido y sencillo, esto puede resultar en una menor eficiencia en la recuperación de ADN de muestras complejas, pero no ha sido significativo a comparación del anterior kit. En relación al ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, a pesar de tener un procedimiento intensivo de lisis, los tampones y condiciones utilizados pueden estar optimizados para una mayor pureza del ADN más que para la cantidad. (23,24,25)

Es crucial reconocer que las muestras de esputo pueden variar significativamente en su contenido de ADN debido a factores como la carga bacteriana inicial, la presencia de contaminantes y la calidad del esputo. Estas diferencias intrínsecas pueden afectar los resultados de extracción de ADN, lo que significa que cierta variabilidad es esperable y aceptable. Los kits deben ser evaluados no solo por la cantidad de ADN extraído, sino también por su capacidad para manejar eficazmente estas diferencias intrínsecas en las muestras.

### 8.2.2 Calidad del ADN extraído:

La calidad del ADN extraído fue evaluada mediante las relaciones de pureza 260/280 y 260/230. El primero varía entre 1.8-2.0 e indica una buena pureza de ADN, mientras que el segundo, cuando los valores están entre 2.0-2.2, sugiere ausencia de contaminantes orgánicos. (20) Estas medidas pueden variar significativamente entre los diferentes kits de extracción debido a las diferencias en sus métodos de lisis, purificación y elución.

Por un lado, la relación 260/230 el Quick-DNA Miniprep Plus Kit presentó los mejores relaciones de pureza, seguido por el ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit y el Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit. Por otro lado, para la relación 260/280, los resultados indican que el ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit produce una calidad de ADN significativamente más alta en comparación con los otros dos kits y entre estos no se encontró diferencias significativas. Sin embargo, los rangos del primero superan el valor de 2.2, lo que puede ser debido a la presencia de contaminación con ARN o cambios en el pH y fuerza iónica: soluciones ácidas pueden subestimar en 0.2-0.3 y las soluciones básicas sobreexpresan en 0.2-0.3. (20) Mientras que para los otros dos kits, la media está alrededor de 1.8, lo que sugiere que la mayor parte del ADN extraído es de alta pureza, con poca contaminación por proteínas.

El Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit está diseñado específicamente para hongos y bacterias, proporcionando una buena eficiencia de lisis y purificación para estos tipos de células, lo que ha demostrado un 260/280 aceptable, con niveles bajos de contaminación proteica. Sin embargo, tiene una baja relación 260/230, lo que indica la presencia de contaminantes como carbohidratos o polifenoles, lo cual puede interferir en

aplicaciones posteriores especialmente en secuenciación. El Quick-DNA Miniprep Plus Kit es adecuado para una amplia gama de muestras, incluyendo tejidos y fluidos corporales y ha demostrado una relación 260/280 razonablemente buena. Y aunque su relación 260/230 ha sido baja (media de 0.4623 ng), ha sido la mayor entre los tres kits comerciales. Por último, el ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, además de su baja relación 260/230 que afecta la calidad general del ADN, tiene valores 260/280 altos lo que sugieren ADN libre de contaminantes proteicos, pero puede indicar contaminación con ARN.

### 8.2.3 Evaluación de costos y recursos:

Todos los kits mencionados tienen un tiempo de procesamiento similar, lo que los hace comparables en términos de eficiencia temporal, asimismo requieren equipo estándar de laboratorio, incluyendo centrifugas y pipetas. Si comparamos en relación al costo descrito en la sección XII sobre el Presupuesto, el ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit tiene el precio más alto por muestra (S/. 28.52), seguido por el Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (S/. 18.64) y el Quick-DNA Miniprep Plus Kit (S/.13.50). Por lo tanto, si consideramos el costo por muestra, el tiempo de procesamiento y los requisitos de equipo, así como la calidad y cantidad de ADN que se necesita obtener, este último kit comercial es la opción más rentable y eficiente.

### 8.3 Implicaciones para la Secuenciación de Nueva Generación (NGS):

En términos de cantidad de ADN obtenido, los tres kits comerciales evaluados ofrecen diferentes resultados. El Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit mostró una media de 91.19 ng, con un rango que varía desde 10.35 ng hasta 1602 ng, lo que sugiere que en la mayoría de los casos, la cantidad de ADN es suficiente para NGS, donde generalmente se requiere un mínimo de 50-100 ng de ADN. El Quick-DNA Miniprep Plus Kit presentó una media de 77.87 ng, con un rango de 1.638 ng a 739.5 ng, lo que también podría ser adecuado para NGS en la mayoría de los casos. El ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, aunque tuvo la menor cantidad de ADN extraído con una media de 50.06 ng, por lo que no cumple con los requisitos mínimos de NGS en la mayoría de las muestras evaluadas.

(39)

La calidad del ADN es otro factor crítico, evaluado a través de las relaciones 260/230 y 260/280. Los valores 260/230 para los tres kits indicaron la presencia de contaminantes como carbohidratos y polifenoles, con medias de 0.1223, 0.4623 y 0.1497 para los kits Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep, Quick-DNA Miniprep Plus y ZymoBIOMICS DNA Miniprep, respectivamente. Estos valores están por debajo del rango ideal (2.0-2.2), sugiriendo la presencia de contaminantes. Pero se podrían mejorar estos valores empleando algunos pasos adicionales de purificación con beads o por columnas, aunque esto reduciría la cantidad de ADN obtenido. Por otro lado, en términos de la relación 260/280, que indica la presencia de proteínas y RNA, todos los kits mostraron resultados dentro o cerca del rango ideal (1.8-2.0), con el ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit mostrando una media de 2.685, lo que sugiere una mayor pureza del ADN extraído. (20)

La relación de ADN bacteriano y humano es crucial para obtener datos de secuenciación precisos y libres de ruido. En estudios preliminares, como se menciona en Charalampous, las muestras tratadas con NaOH-NALC y saponina mostraron diferentes niveles de pureza y cantidad de ADN bacteriano, afectando la relación de ADN humano a bacteriano. Es esencial asegurarse de que el ADN extraído tenga una proporción adecuada de ADN bacteriano para minimizar el ruido en los datos de secuenciación. (35)

Para asegurar que las muestras extraídas cumplen con los requisitos para NGS y que la relación de ADN bacteriano a humano es adecuada, sería recomendable realizar estudios de validación adicionales, donde se incluya la secuenciación de algunas muestras para evaluar la calidad de las lecturas, la cobertura y la proporción de lecturas asignadas a ADN bacteriano versus humano. Además, se debe utilizar herramientas bioinformáticas para evaluar la calidad de las secuencias, identificar contaminantes y asegurar que la mayoría de las lecturas sean del ADN objetivo (bacteriano). Comparar los resultados de secuenciación entre los diferentes kits ayudará a determinar cuál proporciona la mejor relación calidad-cantidad para NGS.

#### 8.4 Limitaciones y futuras direcciones:

Una limitación significativa relacionada con el tamaño de muestra radica en la capacidad de generalizar los resultados y sacar conclusiones representativas de la población objetivo. Con un tamaño de muestra pequeño, existe el riesgo de que las muestras no sean completamente representativas de la diversidad genética y clínica dentro de la población de pacientes con tuberculosis. Esto puede afectar la validez externa de los resultados y limitar la aplicabilidad de los hallazgos a una población más amplia. Asimismo, puede aumentar la variabilidad en los resultados, lo que dificulta la detección de diferencias significativas entre grupos o condiciones. Esto puede conducir a conclusiones erróneas o a la falta de detección de asociaciones importantes entre variables.

La variabilidad intrínseca en las muestras de esputo, como la carga bacteriana y la presencia de contaminantes, puede influir significativamente en los resultados de la extracción de ADN. Esta variabilidad afecta la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados entre diferentes kits y tratamientos, lo cual es crucial para asegurar la calidad y fiabilidad de los análisis genéticos posteriores. En este contexto, la carga bacteriana puede variar considerablemente entre muestras, afectando la cantidad de ADN extraído. De igual forma, la presencia de contaminantes, como proteínas, células epiteliales y otros materiales orgánicos, puede interferir con la pureza del ADN y su capacidad para ser secuenciado correctamente. Para minimizar la variabilidad, la estandarización de las condiciones de tratamiento y procesamiento es fundamental. Además, la implementación de controles de calidad internos y la realización de pruebas de validación periódicas pueden ayudar a identificar y corregir cualquier desviación en el procedimiento.

La descontaminación efectiva de las muestras de esputo es crítica para garantizar la pureza del ADN extraído, lo que a su vez influye en la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos en análisis moleculares. Los agentes mucolíticos, como la dithiothreitol (DTT) o la N-acetilcisteína (NAC), pueden ayudar a disolver las mucosidades presentes en las muestras de esputo, facilitando así la liberación del ADN atrapado en ellas. Asimismo, los detergentes suaves, como el lauril sulfato de sodio (SDS) o el Tween 20, disuelven las membranas celulares y desnaturalizan proteínas, facilitando así la liberación del ADN. (43) En futuras investigaciones, sería beneficioso explorar la

combinación de tratamientos de descontaminación para mejorar aún más la calidad del ADN extraído. Se deben realizar pruebas exhaustivas para determinar cómo estos tratamientos afectan la cantidad de ADN recuperado y su integridad, así como para identificar posibles fuentes de contaminación que puedan afectar los resultados de los análisis moleculares.

Un aspecto crucial para mejorar en la cantidad y calidad del ADN extraído es la optimización de los protocolos de lisis. Diferentes combinaciones de agentes líticos, tiempos de incubación y condiciones de procesamiento pueden ser evaluadas para maximizar la ruptura celular sin degradar el ADN. Por ejemplo, el uso de agentes enzimáticos específicos junto con disrupción mecánica controlada puede mejorar la eficiencia de la lisis bacteriana, liberando más ADN sin aumentar la cantidad de contaminantes. (40) También, se podría evaluar la temperatura y el tiempo de incubación para la actividad de las enzimas y la ruptura de las membranas celulares, lo que afecta la liberación y recuperación del ADN, como hicieron en Dippenaar et al. (8) Esto debido a que una temperatura más alta y un tiempo de incubación más prolongado pueden aumentar la eficiencia de la lisis celular y la liberación de ADN, pero también pueden aumentar el riesgo de degradación del ADN debido a la actividad de nucleasas. Por último, la utilización de técnicas avanzadas de filtración y centrifugación en gradientes de densidad puede mejorar la separación y purificación del ADN bacteriano cómo realizan en Mesman AW et al. (42)

Aunque se evaluaron tres kits comerciales, existen otros métodos de extracción de ADN que podrían ser investigados en el futuro. Como por ejemplo la extracción enzimática, la combinación de batido de perlas con extracción enzimática y síntesis química con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) que menciona Amaro et al. (31) O también la comparación de extracciones con fenol-cloroformo, alcohol al 70%, Chelex 100 + Nonidet P-40 (NP-40), Chelex 100, Chelex 100 + 70%Alcohol, cloroformo + CTAB(N- Bromuro de cetil-N,N,Ntrimetilamonio) de Almeida. (32) Estos difieren de los kits comerciales en varios aspectos, incluyendo los reactivos utilizados, los procedimientos específicos de extracción y las condiciones de procesamiento. Aunque estos métodos tradicionales requieren más tiempo y mayor riesgo de contaminación, pueden ser eficaces para la extracción de ADN. Sin embargo, deben pasar por un proceso

de estandarización de procedimiento, calidad de reactivos, concentraciones, tiempo, validación y repetibilidad.

La mejora en las técnicas de purificación post-extracción o los métodos de enriquecimiento de ADN bacteriano son esenciales para garantizar la calidad y la pureza del ADN obtenido. Entre los métodos de purificación post-extracción más utilizados se encuentran los kits comerciales, las columnas de filtración, las perlas magnéticas, resinas de intercambio iónico o geles. También existen métodos de purificación de ADN más tradicionales que involucran cloroformo, fenol (pH 7,9), cloroformo-isoamilalcohol y fenol-cloroformo-isoamilalcohol (pH 7,9), reductores 2-hidroxiquinolina,  $\beta$ -mercaptoetanol y TCEP como menciona Lever et al. (45) Estos pasos son importantes para la detección de cepas resistentes a múltiples fármacos, donde la precisión es crucial para el tratamiento adecuado. Aunque puedan ser costosos inicialmente, a largo plazo optimizan el uso de recursos al reducir la necesidad de repetición de pruebas debido a muestras de baja calidad o resultados inconclusos y puede acelerar el tiempo de respuesta en diagnósticos clínicos, mejorando así la gestión de pacientes.

La incorporación de nuevas tecnologías en el campo de la extracción y purificación de ADN ofrece una oportunidad significativa para mejorar el protocolo de manipulación de muestras complejas como el esputo de pacientes con tuberculosis. Por un lado, los dispositivos microfluídicos y automatizados mejoran significativamente la extracción de ADN al permitir una manipulación precisa de pequeñas muestras y minimizar la contaminación cruzada, lo que es crucial para obtener ADN de alta calidad de muestras de esputo. Estos sistemas garantizan la reproducibilidad y consistencia de los resultados al estandarizar el proceso de extracción, vital para aplicaciones clínicas y de investigación. (46) Por otro lado, los dispositivos automatizados aumentan la capacidad del laboratorio y reducen el tiempo de procesamiento al permitir la programación de protocolos personalizados para diferentes tipos de muestras, maximizando la recuperación de ADN bacteriano y minimizando contaminantes. (47)

### 8.5 Relevancia del estudio de *M. tuberculosis* de muestras clínicas:

La TB, particularmente en sus formas resistentes a los medicamentos, continúa siendo un desafío considerable para la salud pública a nivel global. La rápida y precisa identificación de MTB, así como su resistencia, es crucial no solo para administrar tratamientos adecuados, sino también para prevenir la propagación de la enfermedad y mejorar los resultados clínicos de los pacientes afectados. Los métodos de extracción de ADN y tratamiento son determinantes en este proceso, ya que impactan directamente en la cantidad y calidad del ADN extraído, lo cual puede influir en la eficiencia de los estudios posteriores sobre la bacteria.

En resumen, esta investigación destaca la importancia de seleccionar el kit de extracción y el tratamiento de descontaminación adecuados para optimizar la cantidad y calidad del ADN de MTB extraído de muestras de esputo. Los resultados sugieren que el ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, en combinación con el tratamiento con NaOH-NALC, proporciona los mejores resultados en relación a la obtención de ADN de MTB. Estos hallazgos son cruciales para mejorar la precisión y fiabilidad del secuenciamiento de nueva generación, contribuyendo así a un diagnóstico más efectivo y a la gestión de la tuberculosis.

## IX. Conclusiones:

### FASE 1: Comparación de métodos de descontaminación (NALC-NaOH vs Saponina)

- El tratamiento con NaOH-NALC resultó en una menor cantidad total de ADN y una calidad inferior en comparación con los otros tratamientos; sin embargo, demostró ser más efectivo para obtener ADN específico de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), lo que resalta su eficacia en la extracción selectiva del ADN bacteriano.
- En cuanto al ADN humano, el método con Saponina mostró mayores cantidades y mejor calidad, mientras que NaOH-NALC redujo significativamente la cantidad de ADN humano presente en las muestras, lo que puede favorecer la detección específica de MTB al disminuir el ADN hospedero que podría interferir en la amplificación.
- La baciloscopia se correlaciona de forma inversa con los valores de Ct: a mayor número de cruces, mayor es la carga de *Mycobacterium tuberculosis* en la muestra, reflejada en valores de Ct más bajos. Específicamente, las muestras con 3 cruces mostraron la mayor cantidad de MTB, seguidas por las de 2 cruces y luego las de 1 cruz. Esta tendencia tiene implicaciones clave para estudios moleculares, ya que las muestras con 2 o más cruces ofrecen mayor cantidad de ADN de MTB, haciéndolas más adecuadas para su extracción y posterior secuenciación.
- Si el objetivo principal es extraer ADN específico de MTB, el método NaOH-NALC es el más adecuado, ya que permite un enriquecimiento significativo del ADN bacteriano y reduce la contaminación con ADN humano. Esto es fundamental para análisis específicos de MTB, aunque la cantidad obtenida puede ser insuficiente para secuenciación directa con kits comerciales estándar que requieren alrededor de 100 ng de ADN y relaciones de pureza  $260/280 < 1.8$  y  $260/230 < 2$ . Para superar esta limitación, se recomienda combinar la extracción con NaOH-NALC con métodos de amplificación específicos como PCR para aumentar la cantidad de ADN MTB, o utilizar kits de preparación de librerías que funcionan con bajos inputs de ADN, además de considerar estrategias de

enriquecimiento adicionales para mejorar la proporción y cantidad de ADN bacteriano.

#### FASE 2: Comparación de kits comerciales de extracción de ADN

- Tanto el Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Kit 1) como el Quick-DNA Miniprep Plus Kit (Kit 2) proporcionaron cantidades similares de ADN, pero el Kit 2 mostró mejor rendimiento en términos de pureza, especialmente al presentar la mejor relación 260/230, lo que sugiere menor contaminación con inhibidores. Aunque el ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Kit 3) mostró la relación 260/280 más alta, estos valores excedieron los rangos típicos de ADN puro, lo que puede indicar contaminación con ARN. En conjunto, el Kit 2 se perfila como la mejor opción cuando se busca un balance entre rendimiento y calidad, especialmente para aplicaciones sensibles que requieren ADN libre de inhibidores.
- Los datos de baciloscopía de las muestras y la cantidad de ADN extraído no mostraron relaciones significativas en la mayoría de los casos.

## X. Referencias bibliográficas:

1. Rahlwes KC, Dias BRS, Campos PC, Alvarez-Arguedas S, Shiloh MU. Pathogenicity and virulence of Mycobacterium tuberculosis. Virulence [Internet]. 2023;14(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2022.2150449>
2. GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2023 [Internet]. Who.int. [citado el 20 de enero de 2024]. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373828/978924Dohál0083851-eng.pdf?sequence=1>
3. Rodríguez G. TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA [Internet]. Org.uy. [citado el 20 de enero de 2024]. Disponible en: <https://chlaep.org.uy/wp-content/uploads/2020/12/Micobacterias.pdf>
4. Guerrero C. y Sánchez C. Procedimientos en Microbiología Clínica [Internet]. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica SE. [citado el 20 de enero de 2024]. Disponible en: <https://www.seimc.org/ficheros/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf/647-1427>
5. Arteta, A. A., Arias, L. F., & Cadavid, C. E. (2022). Coloración de Ziehl-Neelsen en el laboratorio de patología: rendimiento y contribución al diagnóstico de micobacterias en el lavado broncoalveolar. Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud, 42(3), 460–469. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6347>
6. Caitlin Percy, Ilinca Memelis, Thomas Edwards, Adam P. Roberts, Giancarlo Biagini, Daire Cantillon. (2024) A mycobacterial DNA extraction protocol designed for resource limited settings generates high quality whole genome sequencing. Researchgate.net. 2024 [citado el 23 de octubre de 2024]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/381101880\\_A\\_mycobacterial\\_DNA\\_extraction\\_protocol\\_designed\\_for\\_resource\\_limited\\_settings\\_generates\\_high\\_quality\\_whole\\_genome\\_sequencing](https://www.researchgate.net/publication/381101880_A_mycobacterial_DNA_extraction_protocol_designed_for_resource_limited_settings_generates_high_quality_whole_genome_sequencing)

7. Sotomayor F. C, Palma B. J. Vacuna BCG, Inmunodeficiencias Primarias e Inmunodeficiencia Combinada Severa. Rev Chil Pediatr [Internet]. 2020 [citado el 20 de enero de 2024];91(4):648–648. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-41062020000400648&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062020000400648&lng=es)
8. Dippenaar A, Ismail N, Grobbelaar M, Oostvogels S, de Vos M, Streicher EM, et al. Optimizing liquefaction and decontamination of sputum for DNA extraction from Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) [Internet]. 2022;132(102159):102159. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2021.102159>
9. Dohál M, Porvazník I, Pršo K, Rasmussen EM, Solovič I, Mokrý J. Whole-genome sequencing and Mycobacterium tuberculosis: Challenges in sample preparation and sequencing data analysis. Tuberculosis (Edinb) [Internet]. 2020;123(101946):101946. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2020.101946>
10. Caulfield AJ, Wengenack NL. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. J Clin Tuberc Other Mycobact Dis [Internet]. 2016;4:33–43. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405579416300080>
11. Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. Respirology [Internet]. 2010 [citado el 20 de enero de 2024];15(2):220–40. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20199641/>
12. Terranova, L., Oriano, M., Teri, A., Ruggiero, L., Tafuro, C., Marchisio, P., Gramegna, A., Contarini, M., Franceschi, E., Sottotetti, S., Cariani, L., Bevivino, A., Chalmers, J., Aliberti, S., & Blasi, F. (2018). How to process sputum samples and extract bacterial DNA for Microbiota analysis. International Journal of Molecular Sciences, 19(10), 3256. <https://doi.org/10.3390/ijms19103256>

13. Peres RL. Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture [Internet]. Researchgate.net. 2009 [citado el 20 de enero de 2024]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/38095594\\_Comparison\\_of\\_two\\_concentrations\\_of\\_NALC-NaOH\\_for\\_decontamination\\_of\\_sputum\\_for\\_mycobacterial\\_culture](https://www.researchgate.net/publication/38095594_Comparison_of_two_concentrations_of_NALC-NaOH_for_decontamination_of_sputum_for_mycobacterial_culture)
14. Asencios Solís LL, Acurio Usca ME, Quispe Torres NA, Vásquez Campos LM. Susceptibilidad a drogas de Mycobacterium tuberculosis mediante observación microscópica (MODS). Instituto Nacional de Salud; 2012.
15. Hasan MR, Rawat A, Tang P, Jithesh PV, Thomas E, Tan R, et al. Depletion of human DNA in spiked clinical specimens for improvement of sensitivity of pathogen detection by Next-generation sequencing. J Clin Microbiol [Internet]. 2016;54(4):919–27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.03050-15>
16. Charalampous T. Development and application of clinical metagenomics for the diagnosis and characterisation of lower respiratory infections [Internet]. Uea.ac.uk. [citado el 20 de enero de 2024]. Disponible en: <https://ueaeprints.uea.ac.uk/id/eprint/80196/1/2020CharalampousTPhD.pdf>
17. Nimmo, C., et al. (2017). Whole genome sequencing Mycobacterium tuberculosis directly from sputum identifies more genetic diversity than sequencing from culture. BMC Genomics, 18(1), 608.
18. Brown, A.C., et al. (2015). Rapid whole-genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis isolates directly from clinical samples. Journal of Clinical Microbiology, 53(7), 2230-2237.
19. Votintseva, A. A., et al. (2017). Same-day diagnostic and surveillance data for tuberculosis via whole-genome sequencing of direct respiratory samples. Journal of Clinical Microbiology, 55(5), 1285-1298.

20. T123 – TECHNICAL BULLETIN, & Nano Drop Lite. (s/f). Interpretation of nucleic acid 260/280 relaciones. Thermofisher.com. Recuperado el 10 de junio de 2024, de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-relaciones.pdf>
21. Doughty, E.L., et al. (2014). Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of Mycobacterium tuberculosis during latent infection. Nature Genetics, 46(5), 482-486.
22. Balloux F, Brønstad Brynildsrud O, van Dorp L, Shaw LP, Chen H, Harris KA, et al. From theory to practice: Translating whole-genome sequencing (WGS) into the clinic. Trends Microbiol [Internet]. 2018;26(12):1035–48. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.004>
23. ZymoBIOMICSTM DNA Miniprep Kit DNA for microbiome or metagenome analyses Highlights [Internet]. Zymoresearch.com. [citado el 21 de enero de 2024]. Disponible en: [https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d4300t\\_d4300\\_d4304\\_zymbiomics\\_dna\\_miniprep\\_kit.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4300t_d4300_d4304_zymbiomics_dna_miniprep_kit.pdf)
24. Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit [Internet]. Zymoresearch.com. [citado el 21 de enero de 2024]. Disponible en: [https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d6005\\_quick-dna\\_fungal-bacterial\\_miniprep\\_kit.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d6005_quick-dna_fungal-bacterial_miniprep_kit.pdf)
25. Quick-DNATM Miniprep Plus Kit [Internet]. Zymoresearch.com. [citado el 21 de enero de 2024]. Disponible en: [https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d4068\\_d4069\\_quick-dna\\_miniprep\\_plus\\_kit.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4068_d4069_quick-dna_miniprep_plus_kit.pdf)
26. Yang J, Ye W, Zhang C, Lin W, Mei L, Liu S, et al. Accuracy of nanopore sequencing as a diagnostic assay for pulmonary tuberculosis versus smear, culture and Xpert

MTB/RIF: A head-to-head comparison. *Trop Med Infect Dis* [Internet]. 2023;8(9). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed8090441>

27. Ko E-M, Min J, Kim H, Jeong J-A, Lee S, Kim S. Molecular characteristics of drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates based on treatment duration. *Osong Public Health Res Perspect* [Internet]. 2024;15(5):385–94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.24171/j.phrp.2024.0101>

28. Las ORP. Elaboradas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) [Internet]. Cioms.ch. [citado el 31 de mayo de 2024]. Disponible en: [https://cioms.ch/wp-content/uploads/2017/12/CIOMS-EthicalGuideline\\_SP\\_INTERIOR-FINAL.pdf](https://cioms.ch/wp-content/uploads/2017/12/CIOMS-EthicalGuideline_SP_INTERIOR-FINAL.pdf)

29. Thermofisher.com. [citado el 21 de enero de 2024]. Disponible en: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017455\\_Qubit\\_1X\\_dsDNA\\_HS\\_Assay\\_Kit\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017455_Qubit_1X_dsDNA_HS_Assay_Kit_UG.pdf)

30. Catalog Number. SYBR green PCR master mix and SYBR green RT-PCR reagents kit [Internet]. Thermofisher.com. [citado el 21 de enero de 2024]. Disponible en: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms\\_041053.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_041053.pdf)

31. Oriano, M., Terranova, L., Teri, A., Sottotetti, S., Ruggiero, L., Tafuro, C., Marchisio, P., Gramegna, A., Amati, F., Nava, F., Franceschi, E., Cariani, L., Blasi, F., & Aliberti, S. (2019). Comparison of different conditions for DNA extraction in sputum - a pilot study. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s40248-018-0166-z>

32. de Almeida, I. N., da Silva Carvalho, W., Rossetti, M. L., Costa, E. R. D., & de Miranda, S. S. (2013). Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110: preliminary study. *BMC Research Notes*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-561>

33. Charalampous T, Kay GL, Richardson H, Aydin A, Baldan R, Jeanes C, et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2019 [citado el 14 de septiembre de 2024];37(7):783–92. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41587-019-0156-5>
34. Charalampous T, Alcolea-Medina A, Snell LB, Alder C, Tan M, Williams TGS, et al. Routine metagenomics service for ICU patients with respiratory infection. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2024;209(2):164–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.202305-0901oc>
35. Charalampous, T. (s/f). Development and application of clinical metagenomics for the diagnosis and characterisation of lower respiratory infections. Uea.ac.uk. Recuperado el 10 de junio de 2024, de <https://ueaeprints.uea.ac.uk/id/eprint/80196/1/2020CharalampousTPhD.pdf>
36. Services - US. (s/f). Recuperado el 10 de junio de 2024, de [https://www.thermofisher.com/pe/en/home/produalores\\_de\\_Ct-and-services/services.html](https://www.thermofisher.com/pe/en/home/produalores_de_Ct-and-services/services.html)
37. Kok NA, Peker N, Schuele L, de Beer JL, Rossen JWA, Sinha B, et al. Host DNA depletion can increase the sensitivity of Mycobacterium spp. detection through shotgun metagenomics in sputum. *Front Microbiol* [Internet]. 2022;13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.949328>
38. Li N, Cai Q, Miao Q, Song Z, Fang Y, Hu B. High- throughput metagenomics for identification of pathogens in the clinical settings. *Small Methods* [Internet]. 2021;5(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/smt.202000792>
39. de CABIMER ofrece Servicio, L. U. de G. (s/f). Guía de usuarios de SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS) de ILLUMINA. Cabimer.es. Recuperado el 11 de junio de 2024, de [https://www.cabimer.es/docs/genomica/Guia\\_Usuario\\_NGS\\_Illumina.pdf](https://www.cabimer.es/docs/genomica/Guia_Usuario_NGS_Illumina.pdf)

40. Salazar O, Asenjo J. Enzymatic lysis of microbial cells [Internet]. Researchgate.net. 2007 [citado el 11 de junio de 2024]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/6365767\\_Enzymatic\\_lysis\\_of\\_microbial\\_cells](https://www.researchgate.net/publication/6365767_Enzymatic_lysis_of_microbial_cells)
41. George S, Xu Y, Rodger G, Morgan M, Sanderson ND, Hoosdally SJ, et al. DNA Thermo-protection facilitates whole-genome sequencing of mycobacteria direct from clinical samples. J Clin Microbiol [Internet]. 2020;58(10). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00670-20>
42. Mesman AW, Rodriguez C, Ager E, Coit J, Trevisi L, Franke MF. Diagnostic accuracy of molecular detection of Mycobacterium tuberculosis in pediatric stool samples: a systematic review and meta-analysis. Tuberculosis [Internet] 2019;119:101878. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2019.101878>
43. Hammerschlag MR, Harding L, Macone A, Smith AL, Goldmann DA. Bacteriology of sputum in cystic fibrosis: evaluation of dithiothreitol as a mucolytic agent. J Clin Microbiol [Internet]. 1980;11(6):552–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.11.6.552-557.1980>
44. Soundararajan L, Kambli P, Priyadarshini S, Let B, Murugan S, Iravatham C, et al. Whole genome enrichment approach for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and drug resistance-associated mutations from direct sputum sequencing. Tuberculosis (Edinb) [Internet]. 2020;121(101915):101915. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2020.101915>
45. Lever MA, Torti A, Eickenbusch P, Michaud AB, Å anti-Temkiv T, JÃ ,rgensen BB. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. Front Microbiol [Internet]. 2015;6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00476>
46. Homann AR, Niebling L, Zehnle S, Beutler M, Delamotte L, Rothmund M-C, et al. A microfluidic cartridge for fast and accurate diagnosis of Mycobacterium tuberculosis

infections on standard laboratory equipment. *Lab Chip* [Internet]. 2021 [citado el 11 de junio de 2024];21(8):1540–8. Disponible en: [https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/lc/d1lc00035g?casa\\_token=oxGEiJJ05BUAAAAA:oNlwWxaCHic-XrJk-vzMHc0ZWpeTy4G2dJR0EnRzm1FeaQfAbEeDIKnB2lnsZ017veFF2Ap3Q-Tlk88I](https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/lc/d1lc00035g?casa_token=oxGEiJJ05BUAAAAA:oNlwWxaCHic-XrJk-vzMHc0ZWpeTy4G2dJR0EnRzm1FeaQfAbEeDIKnB2lnsZ017veFF2Ap3Q-Tlk88I)

47. Xiao L. Designing and implementing a large-scale high-throughput Total Laboratory Automation (TLA) system for DNA database construction. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2019;302(109859):109859. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.06.017>

48. Votintseva AA, Bradley P, Pankhurst L, del Ojo Elias C, Loose M, Nilgiriwala K, et al. Same-day diagnostic and surveillance data for tuberculosis via whole-genome sequencing of direct respiratory samples. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017;55(5):1285–98. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.02483-16>

49. Nilgiriwala K, Rabodoarivelo M-S, Hall MB, Patel G, Mandal A, Mishra S, et al. Genomic sequencing from sputum for tuberculosis disease diagnosis, lineage determination, and drug susceptibility prediction. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2023;61(3). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01578-22>

50. Choi J-H, Lee KW, Kang H-R, Hwang YI, Jang S, Kim D-G, et al. Clinical efficacy of direct DNA sequencing analysis on sputum specimens for early detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a clinical setting. *Chest* [Internet]. 2010;137(2):393–400. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.09-0150>

51. Victor Ndhlovu, Wilson Mandala, Derek Sloan, MercyKamdolozzi, Maxine Caws, Gerry Davies. View of Evaluation of the efficacy of two methods for direct extraction of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* sputum [Internet]. *Jidc.org*. 2018 [citado el 14 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/32027607/1982>

52. Brown AC. Whole-Genome Sequencing of Mycobacterium tuberculosis Directly from Sputum Samples. En: Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US; 2021. p. 459–80.

53. Tarhan G, Ceyhan İ, Şimşek H, Tuncer S. Evaluation of the efficacy of five DNA extraction methods for the detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in direct and processed sputum by an in-house PCR method. Turk J Med Sci [Internet]. 2009 [citado el 30 de abril de 2025];39(2):253–7. Disponible en: <https://journals.tubitak.gov.tr/medical/vol39/iss2/16>

54. Buijtel PCAM, Petit PLC. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. J Microbiol Methods [Internet]. 2005;62(1):83–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.010>

55. Cabibbe AM, Moghaddasi K, Batignani V, Morgan GSK, Di Marco F, Cirillo DM. Nanopore-based targeted sequencing test for direct tuberculosis identification, genotyping, and detection of drug resistance mutations: a side-by-side comparison of targeted next-generation sequencing technologies. J Clin Microbiol [Internet]. 2024;62(10):e0081524. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00815-24>

#### **Anexos:**

##### 1. Código del cálculo del tamaño muestral en R studio:

```
library (samplesizeCMH)
```

```
# Parámetros
```

```
k <- 3          # Número de grupos (kits)
```

```
alpha <- 0.05   # Nivel de significancia
```

```
power <- 0.90   # Potencia deseada
```

```
effect_size <- 0.25 # Tamaño del efecto esperado (delta)
```

```
# Calcular tamaño muestral para Kruskal-Wallis
```

```
result <- samplesize.KruskalWallis(k = k, alpha = alpha, power = power, d = effect_size)
print(result)
```

> result = 29

## 2. Protocolo de ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit:

1. Add sample to a **ZR BashingBead™ Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm)**. Add 750 µl **ZymoBIOMICS™ Lysis Solution** to the tube and cap tightly.

*Note: For samples stored and lysed in **DNA/RNA Shield™ Lysis Tubes**, do not add ZymoBIOMICS™ Lysis Solution and proceed to Step 2.*

Sample Type	Maximum Input
Feces	200 mg
Soil	250 mg
Liquid Samples <sup>1</sup> and Swab Collections <sup>2</sup>	250 µl
Cells (isotonic buffer, e.g. PBS)	50-100 mg (wet weight) (10 <sup>9</sup> bacterial and 10 <sup>8</sup> yeast cells)
Samples in DNA/RNA Shield™ <sup>3</sup>	≤ 1 ml

2. Secure in a bead beater fitted with a 2 ml tube holder assembly and process using optimized beat beating conditions (speed and time) for your device (see Appendix D)<sup>4</sup>.

*Optional Stopping Point: Following Step 2 is the best stopping point if breaking up the work is needed. Samples can be stored post-lysis for several hours at room temperature, or frozen at – 80 °C for long term storage.*

3. Centrifuge the **ZR BashingBead™ Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm)** in a microcentrifuge at ≥ 10,000 x g for 1 minute.
4. Transfer up to 400 µl supernatant to the **Zymo-Spin™ III-F Filter** in a **Collection Tube** and centrifuge at 8,000 x g for 1 minute. Discard the Zymo-Spin™ III-F Filter.
5. Add 1,200 µl of **ZymoBIOMICS™ DNA Binding Buffer** to the filtrate in the Collection Tube from Step 4. Mix well.
6. Transfer 800 µl of the mixture from Step 5 to a **Zymo-Spin™ IICR Column** in a Collection Tube and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
7. Discard the flow through from the Collection Tube and repeat Step 6.
8. Add 400 µl **ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 1** to the Zymo-Spin™ IICR Column in a new Collection Tube and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute. Discard the flow-through.
9. Add 700 µl **ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2** to the Zymo-Spin™ IICR Column in a Collection Tube and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute. Discard the flow-through.

10. Add 200  $\mu\text{l}$  **ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2** to the Zymo-Spin™ IICR Column in a Collection Tube and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
11. Transfer the Zymo-Spin™ IICR Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add 100  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{l}$  minimum) **ZymoBIOMICS™ DNase/RNase Free Water** directly to the column matrix and incubate for 1 minute. Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute to elute the DNA<sup>5,6</sup>.
12. Place a **Zymo-Spin™ III-HRC Filter** in a new Collection Tube and add 600  $\mu\text{l}$  **ZymoBIOMICS™ HRC Prep Solution**. Centrifuge at 8,000 x g for 3 minutes.
13. Transfer the eluted DNA (Step 11) to a prepared Zymo-Spin™ III-HRC Filter in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and centrifuge at exactly 16,000 x g for 3 minutes.

The filtered DNA is now suitable for PCR and other downstream applications.

<sup>1</sup> For water samples, filter using desired filter (not provided). Cut the filter into small pieces and place into ZR BashingBead™ Lysis Tubes (0.1 & 0.5 mm).

<sup>2</sup> Swabs can also be cut or broken, then placed directly in bead beating tube. For more information on processing swab samples, see Appendix B.

<sup>3</sup> Up to 1 ml of sample in DNA/RNA Shield can be processed directly in ZR BashingBead™ Lysis Tube. Adjust final volume to 1 ml with ZymoBIOMICS™ Lysis Solution or DNA/RNA Shield, if necessary.

<sup>4</sup> For optimal lysis efficiency and unbiased profiling all bead beater devices beyond those validated by Zymo Research should be calibrated using the ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard. See Appendix C.

<sup>5</sup> In some cases a brown-colored pellet may form at the bottom of the tube after centrifugation. Avoid this pellet when collecting the eluted DNA.

<sup>6</sup> If fungi or bacterial cultures were processed; the DNA is now suitable for all downstream applications.

### 3. Protocolo de Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit:

For optimal performance, add beta-mercaptoethanol (user supplied) to the **Genomic Lysis Buffer** to a final dilution of 0.5 % (v/v) *i.e.*, 500  $\mu\text{l}$  per 100 ml.

1. Add 50 – 100 mg (wet weight) fungal or bacterial cells<sup>1</sup> that have been resuspended in up to 200  $\mu\text{l}$  of water or isotonic buffer (*e.g.*, PBS) to a **ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 mm & 0.5 mm)**. Add 750  $\mu\text{l}$  **BashingBead™ Buffer** to the tube<sup>2</sup>.
2. Secure in a bead beater fitted with a 2 ml tube holder assembly and process at maximum speed for  $\geq 5$  minutes.

**Note:** Required processing time will vary depending on the device and application and therefore should be evaluated on a case by case basis.

*For example, processing times may be as little as 3 minutes when using high-speed cell disrupters (e.g., the portable TerraLyzer™ Sample Processor, FastPrep® -24, or similar) or as long as 20 minutes when using lower speeds (e.g., Disruptor Genie™, or standard benchtop vortexes). See manufacturer's literature for operating information.*

3. Centrifuge the **ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm)** in a microcentrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
4. Transfer up to 400  $\mu\text{l}$  supernatant to a **Zymo-Spin™ III-F Filter** in a **Collection Tube** and centrifuge at 8,000 x g for 1 minute.
5. Add 1,200  $\mu\text{l}$  of **Genomic Lysis Buffer** to the filtrate in the **Collection Tube** from Step 4.
6. Transfer 800  $\mu\text{l}$  of the mixture from Step 5 to a **Zymo-Spin™ IICR Column**<sup>3</sup> in a **Collection Tube** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.

7. Discard the flow through from the **Collection Tube** and repeat Step 6.
8. Add 200 µl **DNA Pre-Wash Buffer** to the **Zymo-Spin™ IICR Column** in a new **Collection Tube** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
9. Add 500 µl **g-DNA Wash Buffer** to the **Zymo-Spin™ IICR Column** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.

*For example, processing times may be as little as 3 minutes when using high-speed cell disrupters (e.g., the portable TerraLyzer™ Sample Processor, FastPrep® -24, or similar) or as long as 20 minutes when using lower speeds (e.g., Disruptor Genie™, or standard benchtop vortexes). See manufacturer's literature for operating information.*

3. Centrifuge the **ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm)** in a microcentrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
4. Transfer up to 400 µl supernatant to a **Zymo-Spin™ III-F Filter** in a **Collection Tube** and centrifuge at 8,000 x g for 1 minute.
5. Add 1,200 µl of **Genomic Lysis Buffer** to the filtrate in the **Collection Tube** from Step 4.
6. Transfer 800 µl of the mixture from Step 5 to a **Zymo-Spin™ IICR Column<sup>3</sup>** in a **Collection Tube** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
7. Discard the flow through from the **Collection Tube** and repeat Step 6.
8. Add 200 µl **DNA Pre-Wash Buffer** to the **Zymo-Spin™ IICR Column** in a new **Collection Tube** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
9. Add 500 µl **g-DNA Wash Buffer** to the **Zymo-Spin™ IICR Column** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
10. Transfer the **Zymo-Spin™ IICR Column** to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add 100 µl (35 µl minimum) **DNA Elution Buffer** directly to the column matrix. Centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds to elute the DNA.

Ultra-pure DNA is now ready for use in your experiments.

#### 4. Protocolo de Quick-DNA Miniprep Plus Kit:

##### Reagent Preparation

- ✓ Add 1,040 µl **Proteinase K Storage Buffer** to each **Proteinase K** (20 mg) tube prior to use. The final concentration of **Proteinase K** is ~20 mg/ml. Store at -20°C after mixing.

##### Sample Processing

*Resuspend cultured cell or E. coli pellets using DNA Elution Buffer or an isotonic buffer (e.g. PBS). For < 1 x 10<sup>6</sup> cells, resuspend in 100 µl; For 1-5 x 10<sup>6</sup> cells, resuspend in 200 µl.*

<b>Biological Fluids &amp; Cells</b>	<b>Solid Tissues</b>
<p>1. Add up to 200 <math>\mu</math>l<sup>1</sup> sample to a microcentrifuge tube and add:</p> <p>200 <math>\mu</math>l <b>BioFluid &amp; Cell Buffer (Red)</b> 20 <math>\mu</math>l <b>Proteinase K</b></p> <p><i>For inputs &lt; 200 <math>\mu</math>l, proportionally decrease BioFluid &amp; Cell Buffer (Red), and Proteinase K.</i></p> <p>2. Mix thoroughly or vortex 10-15 seconds and then incubate the tube at 55°C for 10 minutes<sup>2,3</sup>.</p> <p>3. Add <u>1 volume</u> <b>Genomic Binding Buffer</b> to the digested sample. Mix thoroughly or vortex 10-15 seconds.</p> <p><b>Example:</b> Add 105 <math>\mu</math>l Genomic Binding Buffer to the 105 <math>\mu</math>l digested sample.</p>	<p>1. To tissue samples (<math>\leq</math> 25 mg) in a microcentrifuge tube, add a solution of:</p> <p>95 <math>\mu</math>l Water 95 <math>\mu</math>l <b>Solid Tissue Buffer (Blue)</b> 10 <math>\mu</math>l <b>Proteinase K</b></p> <p>2. Mix thoroughly or vortex 10-15 seconds and then incubate the tube at 55°C for 1-3 hours or until tissue solubilizes<sup>2</sup>. Mix thoroughly before proceeding<sup>3</sup>.</p> <p>3. Add <u>2 volumes</u> <b>Genomic Binding Buffer</b> to the supernatant. Mix thoroughly or vortex 10-15 seconds.</p> <p><b>Example:</b> Add 400 <math>\mu</math>l Genomic Binding Buffer to the 200 <math>\mu</math>l mixture.</p>

4. Transfer the mixture to a **Zymo-Spin™ IIC-XLR Column** in a **Collection Tube**. Centrifuge at  $\geq$  12,000 x g for 1 minute<sup>4</sup>. Discard the flow through and collection tube.

<sup>1</sup> If using < 50  $\mu$ l sample, increase the volume to 50  $\mu$ l using **DNA Elution Buffer** or an isotonic buffer (e.g. PBS) before continuing.

<sup>2</sup> Overnight digestions are possible without affecting the integrity of the DNA.

<sup>3</sup> To remove insoluble debris, centrifuge at  $\geq$  12,000 x g for 1 minute. Transfer aqueous supernatant to a clean microcentrifuge tube. Avoid transferring the lipid layer and pelleted cellular debris.

<sup>4</sup> If the lysate is still visible on top of the matrix, centrifuge for another minute or until completely cleared.

5. Add 400  $\mu$ l **DNA Pre-Wash Buffer** to the spin column in a **new Collection Tube**. Centrifuge at  $\geq$  12,000 x g for 1 minute. Empty the Collection Tube.
6. Add 700  $\mu$ l **g-DNA Wash Buffer** to the spin column. Centrifuge at  $\geq$  12,000 x g for 1 minute. Empty the Collection Tube.
7. Add 200  $\mu$ l **g-DNA Wash Buffer** to the spin column. Centrifuge at  $\geq$  12,000 x g for 1 minute. Discard the Collection Tube with the flow through.
8. Transfer the spin column to a clean microcentrifuge tube. Add  $\geq$  50  $\mu$ l **DNA Elution Buffer** or water<sup>1</sup> directly on the matrix. Incubate for 5 minutes at room temperature, then centrifuge at maximum speed for 1 minute to elute the DNA<sup>2</sup>. The eluted DNA can be used immediately for molecular based applications or stored  $\leq$  -20°C for future use.

## 5. Manual de Normas de Bioseguridad

[https://docs.google.com/document/d/1EWZ-yz4xXyUtCHLE0DxpN4\\_aByTW9fPb/edit?usp=sharing&oid=108390043474136130530&rtpof=true&sd=true](https://docs.google.com/document/d/1EWZ-yz4xXyUtCHLE0DxpN4_aByTW9fPb/edit?usp=sharing&oid=108390043474136130530&rtpof=true&sd=true)

## 6. Trabajo en el Laboratorio de *Mycobacterium*

[https://docs.google.com/document/d/1AikDBdOcspqQuedAw2jb8\\_AotagSF0ug/edit?usp=sharing&oid=108390043474136130530&rtpof=true&sd=true](https://docs.google.com/document/d/1AikDBdOcspqQuedAw2jb8_AotagSF0ug/edit?usp=sharing&oid=108390043474136130530&rtpof=true&sd=true)

7. Resultados de la primera fase: Comparación de los tratamientos con NaOH-NALC y saponina

Nº	Muestras	Cruc	Sin tratamiento						Tratamiento con saponina						Tratamiento con NaOH-NALC					
			Ratio 280/260	Ratio 230/260	Cantidad (ng)	Cantidad (ng) colocada en los PCRs	Ct del target RNAsa ( <i>H. sapiens</i> )	Ct del target RV2626c ( <i>M. tuberculosis</i> )	Ratio 280/260	Ratio 230/260	Cantidad (ng)	Cantidad (ng) colocada en los PCRs	Ct del target RNAsa ( <i>H. sapiens</i> )	Ct del target RV2626c ( <i>M. tuberculosis</i> )	Ratio 280/260	Ratio 230/260	Cantidad (ng)	Cantidad (ng) colocada en los PCRs	Ct del target RNAsa ( <i>H. sapiens</i> )	Ct del target RV2626c ( <i>M. tuberculosis</i> )
1	4575	1	1,81	0,9	6930	415,8	20,106	26,855	1,85	0,89	976,5	58,59	20,629	22,237	1,52	0,39	42,615	2,5569	24,908	22,64
2	4575	1	1,8	1,09	4008	240,48	25,421	9,791	1,88	1,77	996	59,76	21,173	22,085	1,62	0,36	38,745	2,3247	24,29	21,881
3	4695	-	1,84	1,12	5190	311,4	23,983	22,41	1,21	0,57	8,22	0,4932	21,834	25,804	1,69	0,45	51,075	3,0645	24,597	25,408
4	4695	-	1,84	0,62	4830	289,8	19,765	24,906	1,72	0,28	975	58,5	22,025	20,836	1,5	0,32	56,25	3,375	22,941	20,335
5	5646	1	1,86	1,13	4980	298,8	21,012	28,257	1,88	0,14	1287	77,22	21,151	24,115	1,67	0,11	61,65	3,699	24,41	25,357
6	5669	2	1,87	0,33	906	54,36	19,852	24,285	1,81	0,32	405,9	24,354	22,794	25,203	1,61	0,54	46,35	2,781	23,088	25,02
7	3542	1	1,84	0,85	12510	750,6	21,05	30,307	1,83	1,7	2655	159,3	20,953	18,312	1,74	0,74	192,6	11,556	22,328	19,312
8	3915	1	1,8	0,57	133,8	8,028	17,002	22,089	1,85	1,97	1983	118,98	17,808	25,143	1,44	0,07	21,96	1,3176	29,365	29,038
9	5030	3	1,84	0,66	3021	181,26	35,451	30,422	1,87	0,26	1488	89,28	21,423	21,327	1,63	0,38	81,45	4,887	24,475	20,259
10	5030	3	1,8	0,55	4377	262,62	20,424	26,032	1,92	1,45	892,5	53,55	26,211	22,074	1,42	0,31	89,55	5,373	25,084	20,423
11	4735	2	1,82	0,57	4461	267,66	20,892	21,995	1,87	1,89	1797	107,82	21,472	21,088	1,52	0,13	72	4,32	25,663	21,964
12	4735	2	1,79	0,16	1671	100,26	Undetermined	Undetermined	1,64	0,36	600	36	28,336	24,327	1,75	0,14	59,625	3,5775	26,805	24,587
13	4735	2	1,82	0,38	2577	154,62	22,598	25,23	1,89	1,55	1122	67,32	27,582	23,055	1,82	0,04	69,75	4,185	26,53	24,221
14	3911	2	1,93	0,19	422,7	25,362	22,046	23,447	1,96	1,9	186,9	11,214	23,391	25,125	1,24	0,24	15,795	0,9477	27,908	25,175
15	4736	2	1,85	0,65	2226	133,56	22,709	30,693	1,56	1,48	1416	84,96	21,866	28,429	1,71	0,31	29,16	1,7496	30,508	30,898
16	3956	1	1,45	0,04	194,7	11,682	Undetermined	33,023	1,81	0,57	13,32	0,7992	Undetermined	37,345	1,69	0,04	11,115	0,6669	Undetermined	37,436
17	3956	1	1,66	0,04	166,8	10,008	20,625	30,332	2,35	0,03	79,95	4,797	Undetermined	28,48	1,38	0,29	24,795	1,4877	Undetermined	35,937
18	4771	1	1,81	1,06	5415	324,9	24,752	30,35	1,85	1,23	212,1	12,726	23,485	25,233	1,66	0,63	15,57	0,9342	27,889	32,272
19	4771	1	1,81	0,47	5040	302,4	20,025	28,993	1,8	0,36	262,2	15,732	23,196	25,687	1,75	0,03	16,56	0,9936	26,256	26,902
20	4771	1	1,82	1,4	5340	320,4	23,116	31,76	1,87	1,3	413,4	24,804	21,538	23,758	1,24	0,11	8,865	0,5319	25,887	27,88
21	4783	3	1,82	0,96	7785	467,1	24,769	19,791	1,9	1,33	2343	140,58	20,845	21,367	1,52	0,53	84,375	5,0625	23,372	20,094
22	5105	2	1,85	0,62	1674	100,44	20,703	25,771	1,84	0,89	835,5	50,13	21,867	26,735	1,54	0,34	90,9	5,454	24,685	27,25
23	4218	2	1,82	0,26	2256	135,36	25,54	22,801	1,9	0,12	1425	85,5	21,771	26,87	1,55	0,02	90,675	5,4405	28,06	26,827
24	4218	2	1,81	0,72	3861	231,66	20,919	27,602	1,89	1,42	1530	91,8	21,379	27,989	1,4	0,51	101,7	6,102	31,024	Undetermined
25	4589	1	1,84	0,27	1116	66,96	27,105	26,128	1,77	0,55	0,086	0,00516	31,883	26,553	1,44	0,02	27,81	1,6686	22,171	22,729
26	4589	1	1,84	0,37	298,2	17,892	22,977	23,021	1,8	1,13	35,73	2,1438	28,375	24,76	1,98	0,02	27,765	1,6659	26,704	23,03
27	4241	3	1,85	0,2	1953	117,18	38,274	Undetermined	1,69	0,68	386,7	23,202	23,602	22,069	1,52	0,52	70,65	4,239	24,541	21,279
28	2780	3	1,14	0,04	27,33	1,6398	23,229	28,271	1,88	0,89	105,9	6,354	27,098	23,557	1,4	0,56	33,84	2,0304	25,596	24,3
29	2780	3	1,84	0,37	2847	170,82	24,73	26,228	1,88	0,28	397,8	23,868	26,634	30,754	1,54	0,39	59,85	3,591	28,86	27,21
30	2780	3	1,79	0,53	2517	151,02	23,137	Undetermined	1,83	1,12	296,4	17,784	23,869	20,67	1,52	0,28	94,05	5,643	24,761	21,899
31	2780	3	1,75	0,72	5340	320,4	22,605	25,53	1,85	1,33	285,3	17,118	26,74	18,519	1,4	0,11	34,11	2,0466	23,928	20,548
32	4902	1	1,84	0,64	2631	157,86	20,373	22,536	1,81	1,7	2499	149,94	26,731	19,636	1,56	0,31	26,235	1,5741	24,547	21,776

### 8. Resultados de la segunda fase: Comparaciones de kits de extracción de ADN comerciales

N°	Muestras	Cruces	Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep kit			Quick-DNA Miniprep Plus kit			ZymoBIOMOCs DNA Miniprep Kit		
			Cantidad (ng)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Cantidad (ng)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Cantidad (ng)	Ratio 260/280	Ratio 260/230
1	13401	2	141,9	2,45	0,02	49,8	1,7	0,83	71,55	2,56	0,42
2	13349	3	39,6	1,88	0,6	49,05	1,61	0,18	13,29	2,41	0,38
3	13458	2	84	2,34	0,11	57,6	1,55	0,66	40,59	2,15	0,29
4	13419	1	68,25	3,33	0,07	13,23	1,18	0,04	37,62	2,07	0,16
5	13356	Pausibacilar	71,7	1,97	0,05	47,22	1,95	0,02	22,26	1,5	0,29
6	135011	1	184,5	1,86	0,28	72,15	1,6	0,65	44,91	1,48	0,01
7	13347	3	53,25	1,33	0,06	32,67	1,83	0,04	57,3	1,88	0,15
8	13400	1	1602	1,89	0,42	739,5	1,88	0,72	618	2,01	0,94
9	135041	1	85,95	1,74	0,13	37,65	1,64	0,23	55,5	1,38	0,23
10	13355	Pausibacilar	81,6	1,68	0,43	62,1	1,59	0,5	84,45	1,95	0,36
11	15031	1	42,795	1,77	0,03	33,975	2,38	0,22	40,455	1,67	0,23
12	15039	2	90,09	1,82	0,05	99,45	1,29	0,19	150,3	1,89	0,26
13	15152	1	25,155	4,6	0,01	75,6	2,3	0,19	52,2	2,01	0,06
14	15049	3	376,65	2,04	0,04	39,69	2,77	0,25	75,825	2,32	0,18
15	15144	1	16,83	1,75	0,02	7,11	2,85	0,25	70,425	1,75	0,19
16	15157	1	37,035	2,24	0,02	19,71	2,84	0,21	21,825	4,6	0,11
17	15029	1	42,48	2,41	0,02	39,735	1,09	0,12	41,175	2,58	0,13
18	15085	1	28,44	2,29	0,02	8,055	3,55	0,21	16,6725	1,79	0,21
19	15101	2	85,05	2,15	0,02	472,5	1,9	0,38	322,65	1,94	0,16
20	15160	1	31,68	2,09	0,01	51,75	1,41	0,14	28,395	2,07	0,06
21	1847	1	13,23	1,58	0,08	3,0825	1,68	0,61	9,9	1,75	0,03
22	6801	1	12,735	1,66	0,23	42,525	1,82	0,89	10,26	1,92	0,04
23	1870	1	11,835	1,54	0,18	119,925	1,8	1,35	9,45	3,29	0,04
24	4575	1	11,85	1,69	0,36	12,3975	1,71	0,59	9,81	3,5	0,06
25	4497	1	12,39	1,67	0,16	1,638	2,07	0,73	5,4765	2,01	0,12
26	4773	2	16,68	1,5	0,12	79,65	1,88	0,96	9,9	2,75	0,04
27	4695	Pausibacilar	11,31	2,13	0,01	25,245	1,68	0,99	10,215	3,03	0,04
28	4118	3	25,155	2,14	0,03	293,175	1,8	1,38	10,17	3,51	0,03
29	3956	1	25,83	1,23	0,02	17,235	1,41	0,44	1,0215	2,28	0,05

30	4735	2	21,24	1,59	0,05	40,32	1,67	0,34	1,1115	4,77	0,06
31	4736	2	17,235	2,01	0,03	29,43	1,55	0,33	1,1115	4,01	0,05
32	16850	3	81,45	1,41	0,1	1,6695	1,07	0,1	1,0485	10,46	0,05
33	16857	2	14,715	1,4	0,03	13,545	1,04	0,22	1,062	92,28	0,05
34	4783	3	11,7	1,38	0,6	29,43	1,47	0,57	1,0935	3,47	0,07
35	4771	1	12,285	1,65	0,03	9,765	1,54	0,05	1,062	11,37	0,05
36	3911	2	11,745	1,25	0,14	15,075	1,48	0,06	1,125	3,93	0,06
37	5030	3	10,35	1,35	0,07	20,2275	1,28	0,26	1,071	4,29	0,05
38	3915	1	10,35	1,23	0,06	7,56	1,47	0,66	0,8685	2,59	0,07
39	3542	1	35,325	1,23	0,06	266,4	1,77	1,47	1,0935	2,51	0,06