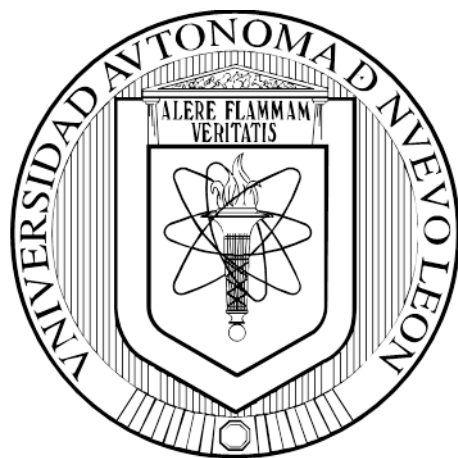


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**IMPACTO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Mycobacterium tuberculosis*  
EN EL PERFIL DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN LA TUBERCULOSIS  
PULMONAR**

**POR**


**BIOL. LUIS JESÚS CORTEZ DE LA FUENTE**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**DICIEMBRE 2015**

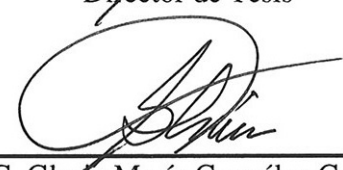
IMPACTO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Mycobacterium tuberculosis*  
EN EL PERFIL DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN LA  
TUBERCULOSIS PULMONAR

Comisión de Tesis




---

Dr. C. José Prisco Palma Nicolás  
Director de Tesis



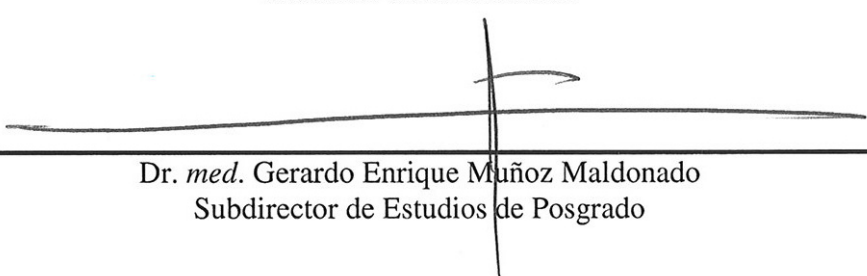
---

Dr. C. Gloria María González González  
Co Director de Tesis



---

Dr. C. Alejandro Sánchez González  
Miembro de la Comisión



---


Dr. *med.* Gerardo Enrique Muñoz Maldonado  
Subdirector de Estudios de Posgrado

IMPACTO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Mycobacterium tuberculosis*  
EN EL PERFIL DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN LA  
TUBERCULOSIS PULMONAR

Por

Biol. Luis Jesús Cortez de la Fuente

Este trabajo se realizó en el Centro regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. José Prisco Palma Nicolás.



---

Dr. C. José Prisco Palma Nicolás  
Director de Tesis

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó como uno de los requisitos parciales para obtener el grado de Maestro en Ciencias con orientación en Microbiología Médica, y contó con el apoyo de una beca por parte de CONACYT durante la estancia en el postgrado.

También se recibió apoyo financiero del Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Oaxaca, a través del proyecto FOMIX 193298: “Desarrollo de tecnologías para diagnóstico rápido de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar y estudio de la diversidad genética de aislados clínicos drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes coinfectados con VIH en el Estado de Oaxaca”.

## DEDICATORIAS

A **Dios**, quien me permitió vivir esta experiencia y me otorgó sabiduría, fortaleza y resiliencia para superar todos los obstáculos y llegar a la meta final.

A mi padre **Luis Lorenzo Cortés Tejeda**, quien me enseñó a confrontar cualquier desafío, a seguir siempre un camino de rectitud y a nunca darme por vencido. Su ejemplo y sus enseñanzas siempre estuvieron presentes en el desarrollo de este trabajo.

A mi madre **Lidia Gloria de la Fuente Martínez**, quien me brindó su apoyo incondicional, su cariño, y sus consejos. Siempre estuvo presente en los momentos más críticos y sus palabras de aliento permitieron levantarme en los días más oscuros.

A mi hermana **Lidia Gloria Cortez de la Fuente**, quien me estuvo aconsejando durante todo este tiempo para ser un estudiante ejemplar. Su gran afecto y sus invaluable consejos me convirtieron en un mejor hermano y una mejor persona.

A mis abuelos: **Lorenzo, Beatriz, Mario y Alejandrina**; y a mis tíos: **Patricia, Juan, Mario, Manuel, Leticia y Cecilia**. Gracias por el apoyo que me brindaron para concluir el Postgrado, pero sobre todo, por los valiosos consejos que me proporcionaron a lo largo de mi carrera profesional.

Al **Dr. C. José Palma**, quien me enseñó todo lo que se necesita para ser un buen investigador, sobretodo el despertar de la curiosidad por aquellas preguntas que aún no tienen respuesta y la búsqueda interminable por contestar dichos cuestionamientos.

A la **Dra. C. Gloria González**, por haberme aceptado en el Departamento de Microbiología y en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas, siempre estuvo al pendiente con el desarrollo de este trabajo.

Al **Dr. C. Alejandro Sánchez**, por sus consejos y siempre estar abierto para cualquier duda que pudiera surgir en la realización de este proyecto.

A mis amigos del Departamento de Microbiología: **Mariana, Rogelio, Alexandra, Rita, Álvaro, Abraham, Byron, Carolina, Sonia, Daniela, Saira**. Sus consejos como colegas microbiólogos fueron invaluable, pero las risas y las experiencias que compartimos a lo largo de este trayecto no tienen precio.

A la **Dra. C. Licet Villarreal Treviño** y la **M. C. Manuela Vela**. Gracias a sus clases nació mi interés por el estudio de la Microbiología.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias Biológicas: **Minoshka, Gabriela, Carolina, Judith, Rosa, Alejandro, Edgar, Juan Francisco, Juan de Dios, Irving, Jesús, Franco, Ileana**. Tal vez nuestros caminos se separaron, pero su amistad persiste y siempre me motivó a continuar hacia adelante.

A mis amigos del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas: **Carolina, Laura, Aurora, Nohemí, Marcela, Lydia, Alma**, por haberme apoyado con todos sus conocimientos, pero sobre todo por brindarme su amistad.

A todo el personal del Departamento de Microbiología que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo, especialmente a **Aída y Mayra**, quienes estuvieron al pendiente en todo momento.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Importancia de la tuberculosis .....	1
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	4
1.3 Tuberculosis pulmonar.....	6
1.4 Diagnóstico de tuberculosis .....	7
1.5 Métodos serológicos y la respuesta inmune humoral .....	10
1.6 Diversidad genética de <i>M. tuberculosis</i> .....	14
2. ANTECEDENTES .....	18
3. JUSTIFICACIÓN .....	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS .....	24
5.1 Objetivo General.....	24
5.2 Objetivos Específicos.....	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
6.1 Población de estudio .....	25
6.2 Origen del Material Biológico .....	25
6.2.1 Muestras de Expectoración.....	25
6.2.2 Muestras de Suero.....	25
6.2.3 Proteínas de Filtrado de Cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	26
6.3 Metodología.....	26
6.3.1 Baciloscopía.....	26
6.3.2 Aislamiento de <i>M. tuberculosis</i> e identificación fenotípica.....	27
6.3.3.1 Extracción de DNA Genómico de Micobacterias (Lisis enzimática/CTAB) .....	27
6.3.3.2 Cuantificación de DNA Genómico por espectrofotometría.....	28
6.3.4 Identificación molecular por el Método de las deleciones genómicas.....	29
6.3.5 PCR Múltiplex para la delección RD <sup>Rio</sup> .....	30
6.3.6.1 Protocolo de amplificación para la genotificación por Spoligotyping .....	31
6.3.6.2 Hibridación de la membrana y detección de spoligotipos.....	31
6.3.6.3 Regeneración de la membrana de Spoligotyping.....	33
6.3.7 Confirmación de los Linajes Principales de <i>M. tuberculosis</i> por LSPs .....	33

6.3.8	Identificación molecular de la familia LAM por RFLPs .....	34
6.3.9	Análisis de LSPs en las Regiones de Diferenciación RD115, RD182, RD183, RD193 y RD219 .....	36
6.3.10.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	37
6.3.10.2	Transferencia en cámara sumergida.....	38
6.3.10.3	Western Blot .....	39
6.3.11	Cuantificación de anticuerpos totales IgM.....	40
6.3.12	Cuantificación de anticuerpos totales IgG .....	41
6.3.13	Inmunoensayo para detectar la respuesta de los anticuerpos IgM e IgG contra las proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> .....	43
6.3.14	Titulación de anticuerpos IgM e IgG contra las proteínas del filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> .....	44
6.4	Análisis estadísticos .....	45
7.	RESULTADOS.....	46
7.1	Banco de DNA genómico de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i> .....	46
7.2	Identificación molecular de <i>M. tuberculosis</i> .....	48
7.3	Identificación molecular de la deleción RDRío ( $\Delta$ RD <sup>Río</sup> ).....	50
7.4	Genotipificación de los aislamientos clínicos por Spoligotyping .....	52
7.5	Confirmación de los Linajes Principales por LSPs.....	57
7.6	Confirmación de la familia LAM por RFLPs .....	60
7.7	Análisis de LSPs en las Regiones de Diferenciación RD115, RD182, RD183, RD193 y RD219 .....	62
7.8	Western Blot contra las proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	65
7.9	Cuantificación de anticuerpos totales IgM por ELISA.....	67
7.10	Cuantificación de anticuerpos totales IgG por ELISA.....	69
7.11	Inmunoreactividad de anticuerpos IgM contra las proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	70
7.12	Inmunoreactividad de anticuerpos IgG contra las proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv .....	72
7.13	Título de anticuerpos de clase IgG.....	73
8.	DISCUSIÓN .....	77
9.	CONCLUSIÓN .....	85
10.	REFERENCIAS.....	86



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales antígenos de origen protéico utilizados para el diagnóstico serológico. ....	11
<b>Tabla 2.</b> Iniciadores utilizados en el método de las deleciones genómicas.....	29
<b>Tabla 3.</b> Iniciadores utilizados en la PCR múltiplex de la detección de la deleción RD <sup>Rio</sup> .....	30
<b>Tabla 4.</b> Composición de los buffers utilizados en la fase de hibridación del Spoligotyping.....	32
<b>Tabla 5.</b> Iniciadores utilizados en el análisis de LSPs para la identificación de los linajes principales. ....	34
<b>Tabla 6.</b> Iniciadores utilizados para la amplificación del gen Rv3062. ....	35
<b>Tabla 7.</b> Iniciadores utilizados en el análisis de LSPs dentro del linaje Euro-Americano.....	36
<b>Tabla 8.</b> Características de los pacientes con TB en el estudio.....	47
<b>Tabla 9.</b> Total de aislamientos clínicos después de aplicar los criterios de exclusión. ....	47
<b>Tabla 10.</b> Perfiles de identificación de especies y sub especies del Complejo <i>M. tuberculosis</i> por el método de las deleciones genómicas.....	48
<b>Tabla 11.</b> Espoligotipos de <i>M. tuberculosis</i> encontrados en el estudio.....	54
<b>Tabla 12.</b> Diversidad genética en las cepas del Linaje Principal del Este Asiático. ....	58
<b>Tabla 13.</b> Diversidad genética en las cepas del Linaje Principal Euro-Americano.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tasas de incidencia de TB en el 2014. ....	2
<b>Figura 2.</b> Incidencia de tuberculosis pulmonar (TBP) por cada 100,000 habitantes. ....	3
<b>Figura 3.</b> Casos nuevos de tuberculosis pulmonar por grupos de edad en Nuevo León. ....	3
<b>Figura 4.</b> Perfiles de inmunoreactividad de pacientes con TBP en un ELISA. ....	12
<b>Figura 5.</b> Patrones de inmunoreactividad de pacientes con TBP en Western Blot. ....	13
<b>Figura 6.</b> Estructura del locus DR en el genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y <i>M. bovis</i> BCG P3. .	16
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática del polimorfismo en las regiones DR de diferentes cepas del complejo <i>M. tuberculosis</i> . ....	16
<b>Figura 8.</b> DNA genómico de <i>M. tuberculosis</i> . ....	48
<b>Figura 9.</b> Paneles de tipificación obtenidos con el método de las deleciones genómicas. ....	50
<b>Figura 10.</b> Panel de tipificación para la deleción RD <sup>Rio</sup> . ....	52
<b>Figura 11.</b> Familias encontradas por el método de Spoligotyping. ....	53
<b>Figura 12.</b> Dendrograma de los aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i> con base en el análisis de similitud de sus espoligotipos. ....	56
<b>Figura 13.</b> Patrones de tipificación de los sub linajes del Este Asiático. ....	57
<b>Figura 14.</b> Polimorfismos de Secuencia Larga de las cepas del Linaje Principal Indo-Oceánico. .	59
<b>Figura 15.</b> Diversidad genética de las cepas del Linaje Principal Indo-Oceánico. ....	60
<b>Figura 16.</b> Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción para la identificación de la familia LAM. ....	61
<b>Figura 17.</b> Diversidad genética de las cepas de la familia LAM. ....	62
<b>Figura 18.</b> Western-Blot de suero de pacientes con TBP, utilizando anticuerpos secundarios de clase IgM. ....	66
<b>Figura 19.</b> Western-Blot de suero de pacientes con TBP, utilizando anticuerpos secundarios de clase IgG. ....	66
<b>Figura 20.</b> Cuantificación de anticuerpos totales de la clase IgM en sueros de pacientes con TBP infectados con cepas de <i>M. tuberculosis</i> de diferente linaje. ....	68
<b>Figura 21.</b> Cuantificación de anticuerpos totales de la clase IgG en sueros de pacientes con TBP infectados con cepas de <i>M. tuberculosis</i> de diferente linaje. ....	70
<b>Figura 22.</b> Inmunoreactividad de clase IgM contra las proteínas del filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. ....	71
<b>Figura 23.</b> Inmunoreactividad de clase IgG contra las proteínas del filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. ....	73

<b>Figura 24.</b> Titulación de anticuerpos de clase IgG contra las proteínas del filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. ....	74
<b>Figura 25.</b> Incremento en el título de anticuerpos de clase IgG contra las proteínas del filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv normalizados con los sueros control. ....	75

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

BAAR .....	Bacilo ácido-alcohol resistente
BCG .....	Bacilo Calmette Guérin
CFP .....	Proteínas de Filtrado de Cultivo
DNA.....	Ácido Desoxirribonucleico
DR.....	Drogo Resistente
DR.....	Repetición Directa
ELISA .....	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
IgG .....	Inmunoglobulina G
IgM.....	Inmunoglobulina M
LSP.....	Polimorfismos de Secuencia Larga
MDR .....	Multi Drogo Resistente
MIRU .....	Unidades Intercaladas Repetitivas de Micobacterias
MNT.....	Micobacterias No Tuberculosas
MtbB .....	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Beijing
MtbC .....	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OD.....	Densidad Óptica
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
OR.....	Odds Ratio
PCR.....	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPD .....	Derivado Proteico Purificado
PVDF .....	Polifluoruro de Vinildeno
RD.....	Regiones de Diferenciación
RFLP .....	Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción
SD .....	Desviación Estándar
SIDA .....	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIT .....	Spoligotype International Type
SNP .....	Polimorfismos de un Solo Nucleótido
Spoligotyping.....	Tipificación con los oligonucleótidos espaciadores
TAES .....	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
TB .....	Tuberculosis
TBP .....	Tuberculosis Pulmonar

TMB..... Tetrametilbenzidina  
VIH ..... Virus de la Inmunodeficiencia Humana  
VNTR.....Número Variable de Repeticiones en Tándem  
WB..... Western Blot

## RESUMEN

Biol. Luis Jesús Cortez de la Fuente

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

**Número de páginas:** 89

Candidato al grado de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Médica

**Área de estudio:** Micobacteriología

### **Título del estudio:**

“Impacto de la diversidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* en el perfil de la respuesta inmune humoral en la tuberculosis pulmonar”

**Propósito y método de estudio:** La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Se estima que la tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con *M. tuberculosis*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico de tuberculosis pulmonar (TBP) que sean rápidos y de bajo costo, como es el caso de los métodos serológicos. Sin embargo, se ha demostrado que la respuesta humoral de los pacientes con TBP es muy heterogénea para antígenos de naturaleza proteica, lo que ha dificultado el desarrollo de un método confiable. Entre las causas probables que dan origen a la alta heterogeneidad de la respuesta humoral podría estar la amplia diversidad genética en los diferentes linajes y sub linajes de *M. tuberculosis*. Esta variabilidad en su genoma denota una gran importancia, ya que se correlaciona con el grado de patogenicidad, distribución geográfica, susceptibilidad a fármacos, epidemiología, respuesta inmune celular y humoral. En el presente estudio se analizó la diversidad genética de un conjunto de 76 cepas, las cuales infectaron a individuos del Noreste de México (Matamoros, Tamaulipas) por medio de la genotipificación por Spoligotyping, para posteriormente identificar los perfiles de inmunoreactividad por medio de ensayos de ELISA y Western Blot. De esta manera se estudio el impacto que tiene la diversidad genética de *M. tuberculosis* en la respuesta inmune humoral.

**Conclusiones y contribuciones:** La respuesta humoral se encuentra asociada con el genotipo de la cepa infectante, siendo los sublinajes X1 y T1 fuertes inductores de anticuerpos de clase IgM, mientras que los sublinajes LAM y U son bajos. Existe un perfil de inmunoreactividad, el cual podría correlacionarse con la prevalencia de las cepas infectantes (EAI2/Harleem, EAI2/LAM). La diversidad genética de las cepas de *M. tuberculosis* tiene un impacto en el perfil de la respuesta inmune humoral, el cual se correlaciona con el linaje de la cepa infectante y su prevalencia en una determinada zona geográfica.

## Capítulo 1

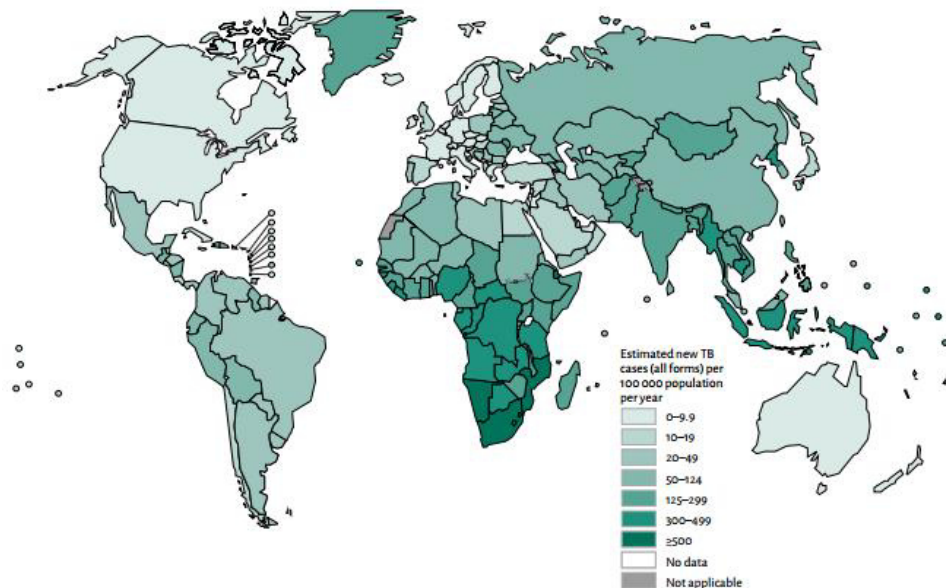
# INTRODUCCIÓN

### 1.1 Importancia de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Se estima que la tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con *M. tuberculosis*; sin embargo, de esa fracción solo aproximadamente el 10% de los individuos desarrollarán la enfermedad en su forma activa en algún momento de su vida.

De acuerdo con lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2014, 1.5 millones de personas murieron por esta enfermedad (1.1 millones de pacientes VIH positivos y 0.4 millones VIH negativos) [1]. La TB se encuentra en el puesto número 2 como causa de muerte producida por un agente infeccioso en todo el mundo, seguida del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [1]. El número estimado de muertes por VIH fue de 1.2 millones, incluyendo los 0.4 millones de casos de co-infección con TB [1]. De manera global, se reportaron 9.6 millones de enfermos de TB, el 12% corresponden a casos de individuos co-infectados con VIH [1]. El número de nuevos casos reportados fue de 6 millones, menos que el 63% del total de individuos enfermos de TB (9.6 millones) [1]. También se estima que el número de casos con cepas de *M. tuberculosis* drogo resistentes (DR) o multi drogo resistentes (MDR) asciende a 480,000 [1].

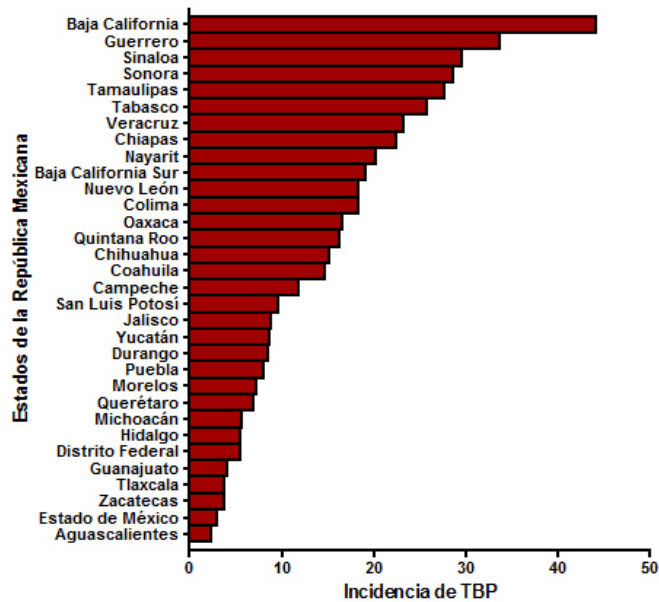
De los 9.6 millones de individuos enfermos de TB en el 2014, el 58% de los casos se localizaron en el Sur Este de Asia y las regiones del Este del Pacífico [1]. Por otro lado, el 28% corresponde al continente Africano [1]. India, Indonesia y China tuvieron un mayor número de casos: 23%, 10% y 10% del total respectivamente [1]. Los 30 países con mayor incidencia de TB son: Angola, Bangladesh, Brasil, Camboya, República Centroafricana, China, Congo, República Democrática del Congo, República Popular Democrática de Corea, Etiopía, India, Indonesia, Kenia, Lesoto, Liberia, Mozambique, Myanmar, Namibia, Nigeria, Paquistán, Papúa Nueva Guinea, Filipinas, Rusia, Sierra Leona, Sudáfrica, Tailandia, Tanzania, Vietnam, Zambia y Zimbabue [1] (Figura 1).



**Figura 1.** Tasas de incidencia de TB en el 2014. WHO. Global tuberculosis report 2015. 2015.

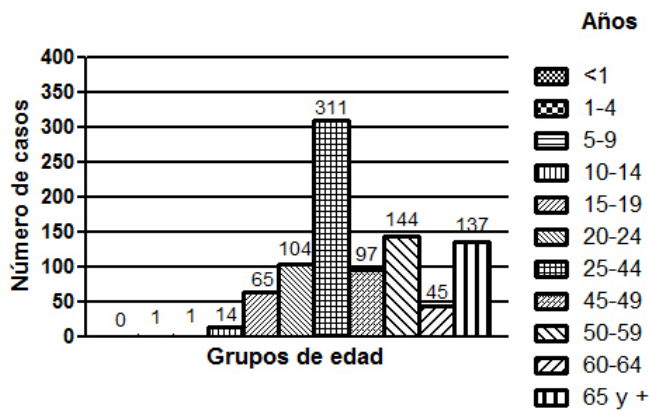
En México, la Secretaría de Salud ha reportado 16, 237 casos de tuberculosis pulmonar (TBP) en el 2014. Los estados de la República con una mayor tasa de incidencia son Baja California, Guerrero, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas [2] (Figura 2).





**Figura 2.** Incidencia de tuberculosis pulmonar (TBP) por cada 100,000 habitantes. Secretaria de Salud. Anuarios de morbilidad. 2014.

El estado de Nuevo León no se encuentra exento de TB, tan solo en el año 2014 y con una tasa de incidencia de 18.33, se presentaron 919 nuevos casos de TB, siendo el grupo de edad más afectado el de 25 a 44 años [2] (Figura 3). Hasta la semana 45 del año 2015 se han reportaron 1,068 nuevos casos en esa entidad. [3].



**Figura 3.** Casos nuevos de tuberculosis pulmonar por grupos de edad en Nuevo León. Secretaria de Salud. Anuarios de morbilidad. 2014.

Son muchos los factores que se han asociado al desarrollo de esta enfermedad, entre los cuales destacan algunas inmunodeficiencias primarias congénitas, la mala nutrición, la edad avanzada, y diversos factores socio-económicos que repercuten en el acceso a los servicios de salud [4]. El creciente aumento de casos del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) causada por el VIH, así como la aparición de cepas de *M. tuberculosis* DR o MDR, dificultan el control de esta enfermedad. Aún y con los esfuerzos internacionales para tratar de limitar la expansión de la pandemia por medio de la búsqueda de los individuos con infección activa, el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y el establecimiento del Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES), la TB sigue siendo uno de los principales problemas de salud en los países en vías de desarrollo.

## **1.2 *Mycobacterium tuberculosis***

Con base en las normas de la clasificación taxonómica, *Mycobacterium tuberculosis* pertenece al Dominio *Bacteria*, Orden *Actinomycetales*, Sub orden *Corynebacterineae*, Familia *Mycobacteriaceae*, Género *Mycobacterium* y especie *Mycobacterium tuberculosis*.

*M. tuberculosis*, junto con otras micobacterias que causan la tuberculosis en mamíferos conforman el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MtbC). Dentro de este grupo también se encuentran *Mycobacterium africanum* (subtipo I y II), *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* Bacilo Calmette Guérin (BCG), *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis* subespecie *caprae* (*M. caprae*) y *Mycobacterium tuberculosis* sub especie *canettii* (*M. canettii*) [5]. Los miembros del MtbC se encuentran muy relacionados, ya que exhiben un alto nivel de homogeneidad en su secuencia

nucleotídica, a pesar de su diferente grado de patogenicidad, distribución geográfica, características fisiológicas (morfología colonial, perfiles de resistencia y susceptibilidad a antibióticos), epidemiología y preferencia por un hospedero en particular [6].

En cuanto a su morfología microscópica, *M. tuberculosis* es un bacilo ligeramente curvo, que mide entre 1 a 4  $\mu\text{m}$  de largo por 0.3 a 0.6  $\mu\text{m}$  de ancho [7]. Requiere oxígeno de forma estricta para su desarrollo, no produce esporas y no presenta flagelos. Es un patógeno intracelular de crecimiento lento cuyo tiempo de replicación varía entre 16 - 20 horas [8]. No es posible clasificar a las micobacterias como Gram positivas o Gram negativas, ya que la tinción de Gram resulta ineficiente debido al alto contenido de lípidos y glicolípidos de su pared celular. Sin embargo, puede utilizarse la tinción diferencial de Ziehl-Neelsen para clasificarla como un “bacilo ácido alcohol resistente” al resistir la decoloración final con alcohol acidulado [7]. La propiedad de la ácido alcohol resistencia se debe al alto contenido de ácidos micólicos (de más de 60 átomos de carbono) presentes en su pared celular. Además, esta característica le confiere una mayor resistencia a los desinfectantes convencionales, la desecación y a los detergentes de carácter catiónico. Sin embargo, sigue siendo susceptible al calor y a la radiación ultravioleta [9].

Por lo que respecta a su metabolismo, *M. tuberculosis* obtiene energía a través de la oxidación de compuestos de carbono como la glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) y el glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ). Puede crecer en medios suplementados con  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , sales de amonio, sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) y fosfatos de potasio [10].

En cuanto a su morfología macroscópica, esta forma colonias rugosas no pigmentadas después de los 14 a 28 días de incubación en los medios Löwenstein-

Jensen o Middlebrook a una temperatura de 37°C y su crecimiento puede favorecerse en una atmósfera con 5 a 10% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) [11].

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* tiene un tamaño de 4,411, 532 pares de bases. Se estima que 3,959 genes codifican para proteínas (90.8%), 6 son pseudogenes (sin tomar en cuenta las secuencias de inserción), 2441 genes tienen una función atribuida, 912 solo tiene asignada una función hipotética, y de 606 productos génicos se desconoce su función. Mediante estudios de genómica comparativa se han identificado 129 genes de *Mycobacterium tuberculosis* que se encuentran ausentes en *M. bovis* BCG [12].

### **1.3 Tuberculosis pulmonar**

A pesar de que la tuberculosis puede presentarse prácticamente en cualquier tejido, los pulmones son la puerta de entrada y el sitio más afectado durante la infección. La afección pulmonar tiene lugar en cerca del 90% de todos los casos de tuberculosis [13]. La tuberculosis pulmonar se transmite de un individuo enfermo con TBP activa a uno sano a través de las vías aéreas por medio de aerosoles. Estos contienen entre 1 y 3 bacilos y tienen un diámetro de 1 a 5µm [14]. Los macrófagos alveolares fagocitan estas partículas, pero no logran eliminar al patógeno. Las células T efectoras juegan un papel relevante en la formación de granulomas para contener la infección, pero no logran la erradicación total de los microorganismos. De esta forma, se produce un balance muy dinámico entre la persistencia bacteriana y la defensa ejercida por el hospedero. Esto puede durar toda la vida, es decir, el individuo está infectado con las micobacterias pero no desarrolla la enfermedad activa (presenta tuberculosis latente). Menos del 10% de los individuos infectados desarrollarán la enfermedad en su estado activo en algún momento

de su vida, pero una vez que se establezca la enfermedad y esta no sea tratada, esta podría ser fatal en el 50% de los casos [13]. El desarrollo de la enfermedad es retardado porque el progreso de la infección es muy lento. En los adultos, la TB ocurre principalmente como el resultado de una reactivación de un foco ya existente y no como el resultado de una infección primaria [15]. Solamente en los individuos inmunocomprometidos como los co-infectados con VIH, la infección primaria se convierte de forma habitual en enfermedad. En los individuos con la enfermedad activa, se producen lesiones cavitarias, y cuando la cavitación alcanza los alveolos, el paciente se vuelve infectivo y se estima que tiene la capacidad de infectar a 15 personas anualmente de manera que el ciclo infeccioso continúa [16].

#### **1.4 Diagnóstico de tuberculosis**

Se sospecha clínicamente de tuberculosis pulmonar en aquellos individuos con tos crónica mayor a tres semanas de duración y evidencia radiológica de lesiones pulmonares localizadas principalmente en la parte apical del pulmón derecho. Después de que se hayan corroborado todos los criterios clínicos de los pacientes, se procede a realizar el diagnóstico con pruebas en el laboratorio para determinar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) [7], y la identificación de las especies infectivas en cultivo a partir de muestras de esputo [11].

La baciloscopía consiste en realizar una tinción diferencial como la de Ziehl-Neelsen para identificar BAAR. Dentro de los principales métodos de diagnóstico, este es de los más rápidos y económicos. Sin embargo, tiene una sensibilidad cercana al 60%, se requieren de 5,000 a 10,000 bacilos/mL de esputo y su especificidad es nula [17], ya que la ácido-alcohol resistencia no es una característica exclusiva de la especie *M.*

*tuberculosis*. También, se estima que hasta el 40-50% de los casos de TBP son BAAR negativos [17], por lo que muchos de los pacientes pueden terminar mal diagnosticados, convirtiéndose en transmisores de la enfermedad.

El aislamiento de micobacterias a partir del cultivo de muestras clínicas es fundamental para el diagnóstico específico de las infecciones por estos microorganismos. Además, el aislamiento del agente causal permite la identificación de la especie, los posteriores estudios de sensibilidad frente a los antimicrobianos, así como el monitoreo del tratamiento y la curación del paciente. El cultivo microbiológico es un método más sensible que la baciloscopía, ya que solo se requieren de 10 a 100 bacilos viables por muestra [17]. Aún y sin contar con el tiempo necesario para realizar las pruebas de sensibilidad contra los antimicrobianos, el diagnóstico microbiológico de tuberculosis requiere de 6 a 8 semanas, lo cual genera una demora en el inicio del tratamiento con agentes antituberculosos. Por otro lado, la prescripción de drogas sin la espera de los resultados de sensibilidad favorece la aparición de cepas resistentes o multi drogo resistentes [17].

La baciloscopía y el cultivo microbiológico son considerados los métodos de laboratorio convencionales más utilizados para el diagnóstico de laboratorio. Sin embargo, para poder llegar a la identificación a nivel especie del patógeno, estas pruebas no son suficientes. Se requieren pruebas bioquímicas complementarias, las cuales con base en la fisiología de *M. tuberculosis*, permiten diferenciarla de otras especies del MtbC. Las pruebas bioquímicas más utilizadas son: acumulación de niacina, reducción de nitratos e inhibición de la actividad de la catalasa a 68 °C [11].

La niacina, también denominada ácido nicotínico, participa en las reacciones de óxido-reducción que ocurren en el metabolismo de las micobacterias. Todas la producen,

pero *M. tuberculosis* lo hace de forma muy activa y carece de las enzimas necesarias para convertir la niacina acumulada en ribonucleótidos de niacina, por lo que se acumula en gran cantidad en el medio de cultivo. La presencia de una coloración amarilla al agregar anilina 4% y bromuro de cianógeno permite identificar la reacción como positiva para niacina [11].

La catalasa es una enzima que tienen muchos microorganismos como un factor de virulencia. Esta les confiere la capacidad de neutralizar compuestos superóxidos generados por las células del hospedador al catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Un resultado positivo para *M. tuberculosis* se identifica con el desprendimiento de burbujas al agregar peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente (25 °C). Esta reacción es negativa cuando se lleva a cabo a 68 °C, debido a que la catalasa de *M. tuberculosis* es termosensible, a diferencia de la catalasa codificada por el genoma de otras micobacterias no tuberculosas (MOTT) [11].

A pesar de que *M. tuberculosis* prefiere el amonio y la asparagina como fuente de nitrógeno, también puede utilizar nitrato y nitrito. Esto es posible debido a que tiene en su membrana celular la enzima Nitrato reductasa que le permite reducir el nitrato en nitrito. Una coloración que va del rosa al fucsia al agregar 1 gota de ácido clorhídrico (1:1 v/v), 2 de sulfanilamida 0.2% (m/v) y 2 de N-naftil etilendiamina 0.1% (m/v) permite identificar la reacción de la reducción de nitrato [11].

Existen otros métodos además de la baciloscopía y el cultivo microbiológico para el diagnóstico de tuberculosis. Entre estos se encuentran los moleculares y los serológicos. Los métodos de diagnóstico molecular se destacan por ser rápidos y muy específicos. También permiten la identificación de la especie o de la cepa responsable de la infección. Los estudios epidemiológicos se han beneficiado de la genotipificación de

cultivos de aislados clínicos, utilizando diversas herramientas de biología molecular. Sin embargo, un solo gen no permite identificar al patógeno. Para que el protocolo tenga un valor diagnóstico y se pueda llevar a cabo la identificación, como mínimo deben de amplificarse 3 o más regiones genómicas [18]. Aunado a eso, la especificidad del método disminuye cuando se trabaja directamente con muestras de expectoración en lugar de cepas aisladas por cultivo. Por lo anterior, la principal desventaja de los métodos moleculares es el costo, entre todos los protocolos de diagnóstico, la identificación de especies del MtbC por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el más costoso [19].

### **1.5 Métodos serológicos y la respuesta inmune humoral**

Los métodos serológicos que se han utilizado para el diagnóstico de *M. tuberculosis* están basados en la detección de anticuerpos en el suero de los pacientes contra antígenos de *M. tuberculosis*. Estos pueden ser de naturaleza muy variada: proteínas, lípidos o polisacáridos. Los métodos serológicos presentan muchas ventajas sobre las metodologías convencionales. Estos pueden detectar la respuesta inducida durante la infección. Además, el tipo de inmunoglobulinas detectadas IgMs e IgGs, podrían indicar si la infección es reciente. También son protocolos sencillos de realizar, baratos y no invasivos. Sin embargo, la gran desventaja que presentan es la falta de antígenos altamente sensibles y específicos en este tipo de pruebas [18].

Se han utilizado antígenos purificados de naturaleza proteica de *M. tuberculosis* como una alternativa para delimitar la reactividad cruzada que se obtiene con preparaciones complejas como el derivado proteico purificado (PPD) utilizado en la prueba de la tuberculina. Aun así, la respuesta inmune humoral de la mayoría de los



antígenos inmunodominantes es muy variable entre los pacientes con tuberculosis pulmonar, por lo que no hay ningún antígeno que sea reconocido por todos los pacientes de forma sistemática [20]. En la Tabla 1 se muestran los principales antígenos de origen proteico utilizados para el diagnóstico serológico de TB. Cada uno de estos presenta diferentes grados de sensibilidad y especificidad, la cual también se encuentra en función del grupo de estudio.

**Tabla 1.** Principales antígenos de origen proteico utilizados para el diagnóstico serológico. Palma, J. *et.al.* Arch bronconeumol. 2007.

Antígeno	Sensibilidad	Especificidad	Población de estudio
ESAT-6	27%		TB latente
CFP-10	25%	97%	TB BAAR -
16-kDa	57%		TB VIH +
30-kDa	61%	95%	TB pulmonar
38-kDa	68%	96%	TB pulmonar
	63%	90%	TB VIH +
Mtb48	44.40%	93%	TB VIH +
TB16.3	66%		TB BAAR -
	88%		TB VIH +
	98%		TB VIH -
Mtb81	70%	99%	TB VIH +
UI (21k-Da)	87.20%		TB VIH +

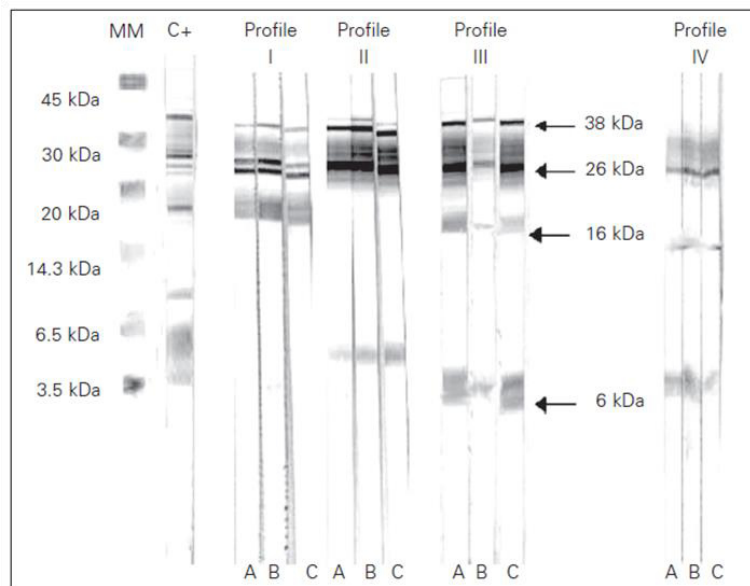
Uno de los antígenos más prometedores en el diagnóstico serológico es la proteína de 38-kDa, la cual tiene una sensibilidad cercana al 80% en pacientes con baciloscopia positiva. Sin embargo, en aquellos individuos con baciloscopia negativa, los valores de sensibilidad caen a un 15% [21]. Esto es un gran desafío, ya que es necesario un método de diagnóstico rápido para pacientes con tuberculosis pulmonar con baciloscopia negativa o con tuberculosis extrapulmonar, en donde esta prueba no es efectiva.

Ya se ha caracterizado la respuesta inmune humoral de pacientes con TB pulmonar contra antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis*. Lyashchenko y colaboradores



encontraron un reconocimiento heterogéneo de los antígenos de las micobacterias como una característica de la respuesta humoral contra *M. tuberculosis* [21].

Beck y colaboradores también caracterizaron la respuesta inmune a la infección por *M. tuberculosis* por medio de ensayos de Western Blot (WB) al determinar el perfil de reactividad del suero de pacientes con TB pulmonar como fuente de anticuerpos (IgG) contra fracciones de antígenos de bajo peso molecular de *M. tuberculosis*. El análisis por WB de las muestras de suero de los pacientes con TB pulmonar mostró cuatro perfiles de reactividad que no estaban presentes en los controles negativos, los cuales eran individuos sanos e individuos con otras enfermedades pulmonares diferentes de TB. El perfil I está compuesto de las fracciones antigénicas de 38 kDa, 26 kDa y 16 kDa; el perfil II de 38 kDa y 26 kDa; el perfil III de 38 kDa, 26 kDa, 16 kDa y 6 kDa y el perfil IV de 26 kDa, 16 kDa y 6 kDa (Figura 5)



**Figura 5.** Patrones de inmunoreactividad de pacientes con TBP en Western Blot [20].

De igual modo, sus resultados coinciden en que la respuesta inmune humoral a la infección por *M. tuberculosis* es muy heterogénea [22].

La alta variabilidad individual en la respuesta inmune humoral a *M. tuberculosis* puede deberse a dos motivos principalmente: una de las razones es la diversidad genética de los individuos infectados. Por otro lado, las cepas de *M. tuberculosis* presentan una alta variación en su genoma.

### **1.6 Diversidad genética de *M. tuberculosis***

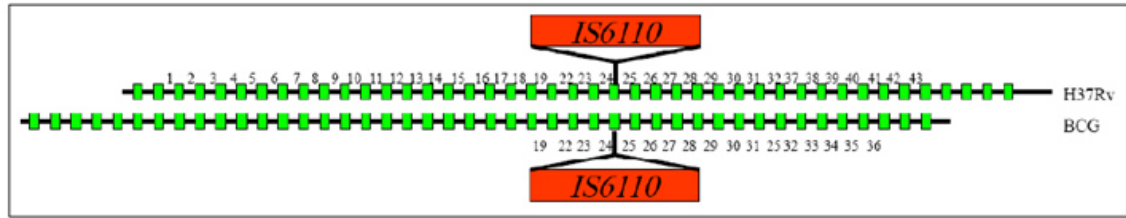
En los laboratorios de rutina, los métodos que se utilizan para la identificación a nivel especie son las pruebas bioquímicas, para poder discriminar a *M. tuberculosis* de otras especies del complejo. En años más recientes, las técnicas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la genotipificación, no solo permiten llegar a la identificación molecular a nivel especie, sino también diferenciar los aislados clínicos a nivel de genotipo y discriminar cada una de estas cepas con base en su diversidad genética. Existen muchos métodos de genotipificación, los cuales con base en una secuencia blanco en particular han demostrado la variabilidad genética de las cepas de *M. tuberculosis*.

La genotipificación por medio de los Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción de la región IS6110 (RFLP-IS6110) utiliza como blanco las variaciones en el material genético de las cepas o aislados clínicos generados por la presencia de la secuencia de inserción IS6110. Estas diferencias en el genoma pueden ser detectadas al digerir el DNA genómico con enzimas de restricción, las cuales generan diferentes patrones de digestión que permiten diferencias a las cepas y por lo tanto ser identificadas [23]. La enzima de restricción que se utiliza, *PvuII*, genera múltiples bandas, las cuales son detectadas por medio de sondas que derivan del elemento de repetición IS6110. Esta secuencia varía en el número de copias y en su distribución en el genoma de la

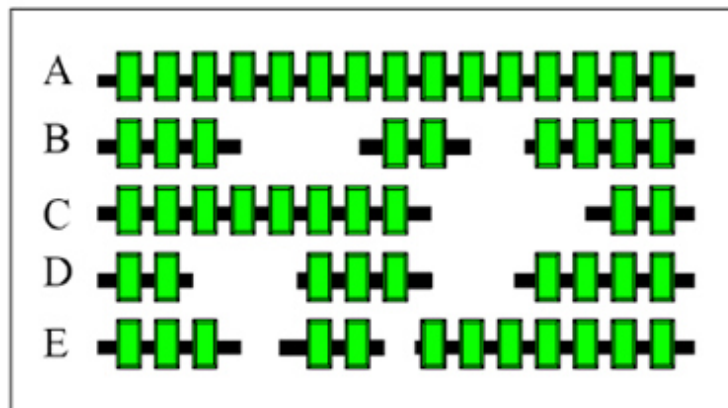
micobacteria. Debido a que *M. tuberculosis* contiene de 8 a 20 copias de esta secuencia de inserción, este método puede detectar de 16 a 40 bandas, lo cual es suficiente para diferenciar y clasificar los aislados clínicos [24].

El Número Variable de Repeticiones en Tándem de las Unidades Intercaladas Repetitivas de Micobacterias (MIRU-VNTR) es una técnica de genotipificación que utiliza como blanco 41 regiones con secuencias de repetición de 40 a 100 pares de bases en el genoma de *M. tuberculosis*. De todas estas, 12 loci son suficientemente polimórficas en cuanto a su número de copias para poder utilizarse en la discriminación de cepas de *M. tuberculosis* [25].

La Tipificación con los Oligonucleótidos Espaciadores (Spoligotyping) es una herramienta de genotipificación que utiliza como blanco el locus de Repetición Directa (DR), el cual es altamente polimórfico y solo se encuentra presente en el genoma de las bacterias que conforman el MtbC [26]. Esta región fue descrita por primera vez por Herman y colaboradores en *Mycobacterium bovis* BCG. Esta región consiste de secuencias de repetición directa (DR) conservadas de 36 pb, las cuales se encuentran intercaladas por espaciadores de DNA no conservados, cuya longitud varía de 35 a 41 pb [27]. El número de elementos DR en *Mycobacterium bovis* BCG es de 49, mientras que en otras cepas del MtbC puede variar (Figura 6). El polimorfismo del locus DR se encuentra en función del número de elementos DR y en la ausencia y/o presencia de espaciadores (Figura 7) [28].



**Figura 6.** Estructura del locus DR en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG P3. Los rectángulos en verde representan las secuencias de Repetición Directa (DR) de 36 pb. Fuente: Ocimum Biosolutions. Spoligotyping Kit User Manual.



**Figura 7.** Representación esquemática del polimorfismo en las regiones DR de diferentes cepas del complejo *M. tuberculosis*. Algunos bloques de las secuencias DR faltan cuando se comparan con otras. El orden de los espaciadores es el mismo. Fuente: Ocimum Biosolutions. Spoligotyping Kit User Manual.

Al realizar el protocolo de Spoligotyping, los productos de PCR de los aislados clínicos se hibridan con oligonucleótidos unidos covalentemente a una membrana de espaciadores de secuencia conocida. La hibridación genera un patrón característico, el cual se denomina espoligotipo. El nivel de diferenciación del Spoligotyping es menor que el de RFLP-IS6110 cuando las cepas cuentan con 5 o más copias de esta secuencia de inserción, pero su poder de discriminación aumenta cuando tienen menos de 5 copias [27].

Los métodos moleculares basados en la tecnología de PCR son capaces de identificar una amplia gama de microorganismos a nivel especie por medio de la amplificación de secuencias genómicas específicas. La secuenciación del genoma de *M.*

*tuberculosis* y las diversas comparaciones genómicas realizadas hasta el momento han permitido la identificación de la pérdida de grandes regiones de material genético (deleciones), las cuales permiten caracterizar a las diferentes especies de micobacterias. Algunas regiones de diferenciación son restrictivas del MtbC. La deleción en RD<sup>can</sup> separa a *M. canettii* del resto de las micobacterias del MtbC. La pérdida de TbD1 discrimina a las cepas de *M. tuberculosis* modernas de las ancestrales. La ausencia de RD9 permite separar a *M. tuberculosis* de *M. africanum* [29]. El método de identificación molecular desarrollado por Huard y colaboradores utiliza este principio para llevar a cabo la diferenciación a nivel especie y sub especie. En su protocolo utiliza 8 pares de iniciadores, los cuales están dirigidos para amplificar las regiones 16S rRNA, Rv0577, Rv3349c, Rv1510, Rv1970, Rv3877-Rv388, Rv2073c y Rv3120 [29]. El panel de tipificación que se genera con los patrones de amplificación permite identificar a *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum* (subtipos I y II), *M. microti*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG y discrimina a las micobacterias no tuberculosas (MNT) [30]. La identificación molecular basada en la pérdida de las regiones RD es de vital importancia. Desde el punto de vista fenotípico y sus manifestaciones clínicas, *M. canettii*, *M. tuberculosis* y *M. africanum* no presentan ninguna diferencia, para poder identificarlas es imprescindible el uso de herramientas moleculares [29].

## Capítulo 2

### ANTECEDENTES

Se han realizado una serie de estudios en donde se ha encontrado una posible asociación entre la variabilidad genética que presentan las cepas de *M. tuberculosis* y diferentes manifestaciones clínicas de la tuberculosis pulmonar; por medio de métodos de genotipificación como el Spoligotyping y los Polimorfismos de Secuencia Larga (LSP) en las Regiones de Diferenciación (RD) en el genoma de *M. tuberculosis*.

Hesseling *et.al.* encontraron que el genotipo de *M. tuberculosis* está asociado con las manifestaciones clínicas de la enfermedad en niños. Se observó que niños de Sudáfrica infectados con cepas del genotipo Beijing (OR = 2.36, 95%CI 1.21-4.60) y S (OR = 3.47, 95%CI 1.26-9.56) tenían una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad extra torácica, comparada con otros niños infectados con el genotipo LAM, en análisis ajustados por edad y resistencia a los antifímicos [31].

Gomes *et.al.* realizaron un estudio descriptivo de los genotipos de aislados clínicos de *M. tuberculosis* de linaje Beijing (MtbB) en Brasil y Mozambique, por medio de Spoligotyping, MIRU-VNTR, análisis del número de copias IS6110 en la región NTF y la búsqueda de mutaciones en los genes *mutT2*, *mutT4*, *rpoB*, *katG* y *pks 15/1*. El índice de virulencia (infectividad y necrosis) de las cepas Beijing ancestrales, evaluadas en células THP-1, fue más bajo de forma significativa que el grupo de las cepas Beijing de genotipo moderno. Estos resultados sugieren que la virulencia de MtbB está involucrada con la baja prevalencia de este genotipo en Brasil y Mozambique [32].



Millet *et.al.* determinaron por medio de clados filogenéticos basados en la técnica de Spoligotyping, que los 5 linajes mayoritarios analizados (T, LAM, Haarlem, EAI y X), los linajes X y LAM se encontraban más asociados con casos de TB drogo resistentes (DR) y multi drogo resistentes (MDR) respectivamente. También observaron que de manera particular, 4 espoligotipos correlacionaron de manera significativa con la drogo resistencia: SIT20/LAM1, SIT64/LAM6, SIT45/H1 y SIT46/sin linaje definido [33].

Chatterjee *et.al.* analizaron 833 aislados clínicos de pacientes con TB de la región Oeste de Maharashtra, India, y encontraron asociaciones entre la cepa infectante con la drogo resistencia, enfermedad cavitada y fallos en el tratamiento. Las cepas Beijing se correlacionaron con multi drogo resistencia (MDR) (OR, 3.40; 95% CI, 1.20-9.62; P = 0.02), CAS se encontró susceptible a fármacos (OR, 1.83; 95% CL, 1.03-3.24; P = 0.03) y asociado con la formación de cavitaciones (OR, 2.72; 95% CL, 1.34-5.53; P = 0.006) [34].

Anderson *et.al.* encontraron por medio de un análisis ajustado que el sub linaje RD183, asociado con la formación de clusters, tiende a causar más casos de TB secundaria que otros sub linajes del linaje principal Euro-Americano. Sus hallazgos sugieren que los factores bacterianos contribuyen a la patogénesis de la enfermedad [35].

Kong, *et.al.* realizaron un estudio en donde analizaron en un conjunto de asilamientos clínicos la delección de 5 RDs designadas como RD105, RD181, RD142, RD150 y RD239 utilizando la hibridación de microarreglos, PCR y secuenciación de DNA, para después poder evaluar la asociación entre las delecciones de RDs y las características clínicas de los pacientes por medio de un análisis de chi-cuadrada y un modelo de regresión logística multivariada. Se encontró una asociación estadísticamente

significativa entre la tuberculosis extrapulmonar con los grupos de asilados clínicos con las deleciones RD105, RD181 y RD142 (odds ratio ajustado [OR] = 3.05; 95% de intervalo de confianza [CI] = 1.58, 5.90) y el grupo con las deleciones RD105, RD181 y RD150 (OR ajustado = 11.09; 95% de CI = 4.27, 28.8). Este par de combinaciones podrían sugerir un posible uso predictivo en cuanto a la manifestación clínica en la infección de *M. tuberculosis* en humanos [36].

En un estudio, Kato-Maeda *et al.* evaluaron la patogenicidad que mostraban los conejillos de indias Hartley infectados con cada uno de los sublinajes del genotipo Beijing, los cuales corresponden a las deleciones RD207, RD181, RD150 y RD142. Todas las cepas fueron capaces de causar daño patológico en los pulmones del modelo experimental. De acuerdo con sus resultados, las cepas con la deleción RD207 fueron capaces de generar mayor daño de forma significativa respecto a los otros sublinajes. También se encontró que este genotipo fue capaz de inducir niveles elevados de marcadores asociados con las células T reguladoras y una disminución significativa de células T activadas durante el curso de la infección. Estos resultados sugieren que los diferentes sublinajes de *M. tuberculosis* podrían estar asociados a patologías y manifestaciones clínicas diferenciales [37].

Nahid *et.al.* realizaron un estudio en donde se exploró la relación que existe entre el linaje y el sublinaje de las cepas de *M. tuberculosis*, las manifestaciones clínicas y la respuesta al tratamiento que presentan los pacientes con tuberculosis activa. Se determinaron los Polimorfismos de Secuencia Larga (LSP) y los Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNP) para determinar los linajes y sublinajes de cada uno de los asilados clínicos. Por medio de análisis univariados se encontró que el linaje Euro-Americano sublinaje RD724 se asoció con una enfermedad más severa, y junto con el

linaje del Este Asiático se relacionó con una baja conversión bacteriológica después de 8 semanas de tratamiento [38].

Pheiffer *et.al.* encontraron que la expresión de proteínas de las cepas de linaje Beijing difiere de la familia 32 y de *M. tuberculosis* H37Rv. Utilizando electroforesis en dos dimensiones, espectrometría de masas y análisis por Western-Blot, se observó que la cepa Beijing mostró un incremento en la expresión de  $\alpha$ -cristalina, y un decremento en Hsp65, Pst61 y la proteína de 47 kDa, comparado con los otros genotipos. Los análisis de Western-Blot de una y dos dimensiones de los antígenos expresados por estas tres cepas, usando plasma de pacientes, confirmaron la expresión diferencial de estos antígenos [39].

López *et.al.* encontraron que existe una marcada diferencia en la patogénesis y la respuesta inmune en función de la cepa infectante. Se observó que en los ratones BALB/c infectados con cepas de linaje Beijing, la infección se caracterizó por una neumonía extensa, temprana pero efímera producción de TNF- $\alpha$  junto con iNOS, un aumento significativo de mortalidad temprana, comparado con H37Rv. Por otro lado, las cepas de genotipo Canettii indujeron neumonía de forma limitada, una expresión sostenida de TNF- $\alpha$  y de iNOS y casi el 100% de sobrevivencia. Las cepas de genotipo Somalí y Haarlem mostraron niveles de sobrevivencia menos homogéneos [40].

Todos estos antecedentes denotan la importancia de la diversidad genética de *M. tuberculosis* y su posible impacto en la respuesta inmune, tanto humoral como celular en la tuberculosis pulmonar.

## Capítulo 3

### JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico de tuberculosis pulmonar (TBP) que sean rápidos y de bajo costo, como es el caso de los métodos serológicos. Sin embargo, se ha demostrado que la respuesta humoral de los pacientes con TBP es muy heterogénea para antígenos de naturaleza proteica, lo que ha dificultado el desarrollo de un método confiable. Entre las causas probables que dan origen a la alta heterogeneidad de la respuesta humoral podría estar la amplia diversidad genética de *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo dicha correlación no ha sido investigada previamente.

## Capítulo 4

### HIPÓTESIS

Los aislamientos clínicos que pertenecen a un mismo sublinaje de *M. tuberculosis* generan perfiles de inmunoreactividad similares en pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

## Capítulo 5

### OBJETIVOS

#### 5.1 Objetivo General

Evaluar la participación que tiene la diversidad genética de *M. tuberculosis* en el perfil de la respuesta inmune humoral en pacientes diagnosticados con tuberculosis pulmonar activa.

#### 5.2 Objetivos Específicos

1) Generar un banco de DNA de aislamientos clínicos de la especie *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de casos de tuberculosis pulmonar activa.

2) Genotipificar cada uno de los aislados clínicos identificados como *M. tuberculosis*, mediante la técnica de Spoligotyping.

3) Identificar perfiles de inmunoreactividad mediante el uso de suero de cada paciente como fuente de anticuerpos contra las proteínas de filtrado de cultivo de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv.

## Capítulo 6

# MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Población de estudio

Para el presente trabajo se incluyeron pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar que acudieron para su atención médica a las instalaciones de la Jurisdicción Sanitaria No. 3 de Matamoros Tamaulipas de acuerdo a los siguientes criterios: primer diagnóstico de tuberculosis pulmonar por cultivo microbiológico, previa firma de consentimiento informado, sin presentar una co-infección con el VIH y con tratamiento farmacológico no mayor a 8 días.

### 6.2 Origen del Material Biológico

#### 6.2.1 Muestras de Expectoración

Se solicitaron de 1 a 3 muestras de expectoración a los pacientes incluidos en el estudio. Los datos personales de cada donante fueron codificados y las muestras se rotularon con un código alfanumérico consecutivo.

#### 6.2.2 Muestras de Suero

Se solicitó una muestra de sangre de 5 mL a cada paciente involucrado en el estudio. A partir de esta muestra se obtuvo el suero sanguíneo por centrifugación del paquete globular. El suero se almacenó en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los datos personales de cada donante fueron codificados y las muestras se rotularon con un código alfanumérico consecutivo.

### **6.2.3 Proteínas de Filtrado de Cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv**

En el presente trabajo se emplearon proteínas de filtrado de cultivo (CFP) de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, las cuales se obtuvieron a las 4 semanas de crecimiento en medio Sauton (fase logarítmica). Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford y fueron resuspendidas en buffer PBS a una concentración de 1.5mg/mL. Este material fue obtenido gracias a una colaboración con la Dra. C. Clara Espitia Pinzón del Instituto de Investigación Biomédica de la UNAM.

## **6.3 Metodología**

### **6.3.1 Baciloscopia**

Se realizó de acuerdo a lo señalado en la Modificación a la Norma Oficial Mexicana: “NOM-006-SSA2-1993 para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud”, y descrito en el "Manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen Baciloscópico"[41, 42]. Cada una de las muestras de los pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar se descontaminó siguiendo el método de Petroff modificado. Se tomó muestra para hacer un frotis con las siguientes dimensiones: 2 cm de largo y 1 cm de ancho. Las laminillas se fijaron con calor en una plancha a 145 °C para después realizar la tinción de Ziehl-Neelsen. Se agregó Fucsina fenicada (Analytika, Escobedo, NL, México), de manera que el colorante cubriera en su totalidad el portaobjeto. A los 15 minutos se enjuagó con agua destilada y se decoloró con Alcohol Ácido 3% (v/v) hasta que las gotas se tornaran claras. Luego se volvió a enjuagar con agua destilada, para posteriormente agregar Azul de Metileno 10% (m/v) (Analytika, Escobedo, NL, México). Se dejó con el colorante por 2 minutos, después se



enjuagó con agua destilada y se dejó secar. Finalmente se observó al microscopio a un aumento de 100X para realizar el conteo de BAAR.

### **6.3.2 Aislamiento de *M. tuberculosis* e identificación fenotípica**

Las muestras de esputo se descontaminaron siguiendo el método de Petroff modificado y parte del sedimento se sembró en medio sólido de Löwenstein-Jensen. Se realizaron las pruebas de acumulación de niacina y reducción de nitratos para la identificación bioquímica de *M. tuberculosis*, de acuerdo a los criterios publicados en el "Manual de Procedimientos de Laboratorio No.18 (TUBERCULOSIS)" [43].

#### **6.3.3.1 Extracción de DNA Genómico de Micobacterias (Lisis enzimática/CTAB)**

Se tomó una asada del cultivo de *M. tuberculosis* y se resuspendió en 1 mL de solución salina de NaCl 0.9% (m/v). La suspensión bacteriana se inactivó por calor en un baño de agua a 85 °C durante una hora. Esta se centrifugó por 5 minutos a 3,000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante. A la pastilla de micobacterias se adicionaron 200 µL de buffer de Lisis Enzimática [Tris HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, Tritón X-100 1.2% (v/v)] y 30 µL de Lisozima [20 mg/mL] (Bio Basic, Markham ON, Canadá). Después se mezcló e incubó por 30 minutos a 37 °C. La solución se llevó a un volumen final de 567 µL con buffer TE-1 X (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) y se agregó 30 µL de SDS 10 % (m/v) (Bio-Rad, Hércules CA, EUA), y 6 µL de Proteinasa K [10 mg/mL] (Bioline, Boston, MA, EUA). Luego se mezcló e incubó por una hora a 55 °C. Se adicionó 100 µL de NaCl 5 M y se mezcló de nuevo. Posteriormente se agregó 80 µL de CTAB 10% (m/v) NaCl 0.7 M, previamente atemperado a 65 °C. Después se mezcló e incubó por 10 minutos a 65 °C. Luego se adicionó el equivalente de 1 volumen de Cloroformo (Jalmek Científica, San Nicolás de los Garza, NL, México), se mezcló y

centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm y 4 °C. Posteriormente se separó y transfirió la fase acuosa a un microtubo de 1.5 mL. Se agregó el equivalente a 1 volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico 25:24:1 (v/v/v) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). Después se mezcló y dejó reposar a temperatura ambiente (25 °C) hasta que la separación de fases fuera evidente. Luego se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm y 4 °C. Se separó y transfirió la fase acuosa a un microtubo de 1.5 mL. Posteriormente se adicionó el equivalente a 0.6 de volúmenes de alcohol Isopropílico absoluto frío (4 °C) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). Luego se agregó Acetato de Sodio 3 M pH 5.3 al 10 % (v/v). Se mezcló e incubó a -20°C por 2 horas. Después se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm. Posteriormente se desechó el sobrenadante. Luego se agregó 1 mL de Etanol al 70 % (J. T. Baker Avantor, Center Valley, PA, EUA) en frío (4 °C). Después se resuspendió la pastilla de DNA g y se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm. En seguida se desechó el sobrenadante. Luego se dejó evaporar el Etanol residual a temperatura ambiente, evitando la desecación. Finalmente se resuspendió el DNAg en 50 µL de buffer TE-1 X (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM).

### **6.3.3.2 Cuantificación de DNA genómico por espectrofotometría**

El DNAg fue cuantificado mediante espectrofotometría leyendo la absorbancia de una alícuota de 2 µL de cada una de las muestras a una longitud de onda de 260 nm con el Espectrofotómetro UV-Vis Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para asegurar la integridad del DNAg se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (m/v) y la visualización de su corrimiento electroforético se puso en evidencia mediante la tinción con Bromuro de Etidio [2µg/mL] con el

fotodocumentador MultiDoc-It Imaging System UVP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). El DNAg fue almacenado hasta su uso a -20 °C.

### 6.3.4 Identificación molecular por el método de las deleciones genómicas

Se mandaron sintetizar 8 pares de iniciadores de PCR (Alpha DNA, Montreal, QC, Canadá), de acuerdo con el protocolo descrito por Huard *et.al.* (2006) [30]. Estos permiten amplificar 8 locus en el genoma de *M. tuberculosis* con el fin de diferenciar las especies y sub especies que conforman el complejo *M. tuberculosis* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Iniciadores utilizados en el método de las deleciones genómicas.

Loci	Secuencia	Tamaño (pb)
16S rRNA	Forward: 5' ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C 3' Reverse: 5' TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A 3'	543
CFP32 (Rv0577)	Forward: 5' ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA 3' Reverse: 5' CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA 3'	786
IS 1561' (Rv3349c)	Forward: 5' GCT GGG TGG GCC CTG GAA TAC GTG AAC TCT 3' Reverse: 5' AAC TGC TCA CCC TGG CCA CCA CCA TTG ACT 3'	943
RD4 (Rv1510)	Forward: 5' GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC 3' Reverse: 5' TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C 3'	1033
RD7 (Rv1970)	Forward: 5' GCG CAG CTG CCG GAT GTC AAC 3' Reverse: 5' CGC CGG CAG CCT CAC GAA ATG 3'	1116
RD1 (Rv3877-Rv388)	Forward: 5' CGA CGG GTC TGA CGG CCA AAC TCA TC 3' Reverse: 5' CTT GCT CGG TGG CCG GTT TTT CAG C 3'	999
RD9 (Rv2073c)	Forward: 5' TCG CCG CTG CCA GAT GAG TC 3' Reverse: 5' TTT GGG AGC CGC CGG TGG TGA TGA 3'	600
RD12 (Rv3120)	Forward: 5' GTC GGC GAT AGA CCA TGA GTC CGT CTC CAT 3' Reverse: 5' GCG AAA AGT GGG CGG ATG CCA GAA TAG T 3'	404

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL incluyendo 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 10 µM de cada iniciador, 0.5 U de DNA Polimerasa *Taq* y su buffer correspondiente (Bioline, Boston, MA, EUA). El programa del Termociclador T100 (Bio-Rad, Hércules CA, EUA) consistió en una fase de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguido de 28 ciclos conformados por una fase de desnaturalización a 94 °C

por 45 segundos, seguida por una de alineamiento a 63 °C por un minuto y una de extensión 72 °C por un minuto; concluyendo con una última fase de extensión a 72 °C por 5 minutos. Después los productos de la amplificación se resolvieron en un gel de agarosa a 1.5 % (Bioline, Boston, MA, EUA). Finalmente el patrón de bandas obtenido se digitalizó con el fotodocumentador MultiDoc-It Imaging System UVP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

### 6.3.5 PCR Múltiplex para la detección de la delección RD<sup>Rio</sup>

Se mandaron sintetizar 2 pares de iniciadores de PCR (Alpha DNA, Montreal, QC, Canadá), de acuerdo con el protocolo descrito por Gibson *et.al.* (2008) [44]. Estos permiten amplificar parte de la secuencia IS 1561' (530pb), la cual es una región deletada en el genotipo RD<sup>Rio</sup>; o en su defecto, flanquea el locus RD<sup>Rio</sup> Bridge y forma un puente de 1,175 pb (Tabla 3).

**Tabla 3.** Iniciadores utilizados en la PCR múltiplex de la detección de la delección RD<sup>Rio</sup>.

Locí	Secuencia	Tamaño (pb)
IS 1561' (Rv3349c)	IS1561F: 5' GAC CTG ACG CCG CTG ACA C 3' IS1561R: 5' CAC CTA CAC CGC TTC CTG CC 3'	530
RD <sup>Rio</sup> Bridge	RD <sup>Rio</sup> BrgF: 5' CAC TCC GGC TGC CAA TCT CGT C 3' RD <sup>Rio</sup> BrgR: 5' CAC CGC CAC GCT GAA TGA GAC CA 3'	1,175

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL incluyendo 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 10 µM de cada iniciador, 0.5 U de DNA Polimerasa *Taq* y su buffer correspondiente (Bioline, Boston, MA, EUA). El programa del Termociclador T100 (Bio-Rad, Hércules CA, EUA) consistió en una fase de desnaturalización a 95 °C, seguido de 30 ciclos conformados por una fase de desnaturalización a 95 °C por un minuto, seguida por una de alineamiento a 60 °C por un minuto y una de extensión a 72

°C por un minuto y 30 segundos; concluyendo con una última fase de extensión a 72 °C por 10 minutos. Después los productos de la amplificación se resolvieron en un gel de agarosa a 1.5 % (Bioline, Boston, MA, EUA). Finalmente el patrón de bandas obtenido se digitalizó con el fotodocumentador MultiDoc-It Imaging System UVP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### **6.3.6.1 Protocolo de amplificación para la genotipificación por Spoligotyping**

Se disolvieron los cebadores Dr<sub>a</sub> (biotinilado) y Dr<sub>b</sub> (Ocimum Biosolutions, Madhapur, HYD) en 1.72 mL de agua mQ libre de nucleasas (Quiagen N. V. Hilden, NRW, Alemania). Se descongelaron las muestras de DNA<sub>g</sub> de los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* [20 ng/μL], los controles de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG (Ocimum Biosolutions, Madhapur, HYD), así como el resto de los reactivos para el protocolo de amplificación. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL incluyendo 20 ng de DNA g, 20 pmol de cada iniciador, 2.5 mM de dNTPs, buffer de reacción 10 X, 25mM de MgCl<sub>2</sub> y 5 U de DNA Polimerasa *Taq* (Bioline, Boston, MA, EUA). El programa del Termociclador T100 (Bio-Rad, Hércules CA, EUA) consistió en una fase de desnaturalización a 96 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos conformados por una fase de desnaturalización a 96 °C por un minuto, seguida por una de alineamiento a 55°C por un minuto y una de extensión a 72° C por 30 segundos; concluyendo con una última fase de extensión a 72 °C por 5 minutos.

#### **6.3.6.2 Hibridación de la membrana y detección de espoligotipos**

Cada uno de los buffers SSPE (Composición) 2X utilizados en este ensayo se calentó previo al inicio del protocolo de hibridación (Tabla 4).

**Tabla 4.** Composición de los buffers utilizados en la fase de hibridación del Spoligotyping.

Buffer	SSPE 2X (mL)	SDS (m/v)	Temperatura (°C)
A	250	0.1%	60
B	500	0.5%	60
C	750	0.5%	42
D	500	0.0%	25

Se resuspendió todo el producto amplificado (50  $\mu$ L) en 350  $\mu$ L de buffer A (precalentado a 60 °C). Luego se desnaturalizaron por calor los productos de PCR por 10 minutos a 99 °C y se dejó enfriar en hielo inmediatamente. Después se lavó la membrana (Ocimum Biosolutions, Madhapur, HYD) con el buffer A por 5 minutos. Posteriormente se colocó la membrana y el cojín de soporte en el miniblotter (Ocimum Biosolutions, Madhapur, HYD) de manera que las ranuras quedaron ubicadas de forma perpendicular a la línea patrón de los oligonucleótidos. Luego se removieron los fluidos residuales de las ranuras del miniblotter por aspiración. Los carriles del miniblotter se llenaron con la dilución de los productos amplificados y se llevó a cabo la hibridación en una incubadora a 60 °C por una hora sobre una superficie horizontal. Después se removieron las muestras del miniblotter por aspiración y se retiró la membrana con pinzas de punta plana. La membrana se lavó dos veces con buffer B (precalentado a 60 °C) por 10 minutos. Posteriormente se colocó en un contenedor para dejarlo enfriar con buffer C (precalentado a 42 °C). Luego se agregó 7.5  $\mu$ L del complejo Streptavidina-Peroxidasa (KPL, Gaithersburg, MD, EUA) a 30 mL de buffer C, volumen suficiente para cubrir la membrana en el contenedor. La membrana se incubó con esta solución por una hora a 42°C. Posteriormente se lavó dos veces en el buffer C por 10 minutos. Luego se enjuagó con buffer D (temperatura ambiental, 25°C) durante 5 minutos. La membrana se incubó con 20 mL de sustrato quimioluminiscente LumiGlo (KPL, Gaithersburg, MD,

EUA) durante 2 minutos. Después se colocó entre dos acetatos translucidos, dejando exponer sobre ésta una película fotosensible (Eastman Kódak, Rochester, NY, EUA) durante 15 minutos en condiciones de oscuridad. Posterior a la exposición, la película fotosensible se reveló y se fijó con el sistema de revelado y fijación (Eastman Kódak, Rochester, NY, EUA).

### **6.3.6.3 Regeneración de la membrana de Spoligotyping**

Se hizo un lavado de la membrana 2 veces con SDS 1% (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA) y se dejó incubando a 80°C durante 30 minutos. Luego se lavó con EDTA 20mM, pH 8.0 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) durante 15 minutos. Finalmente se guardó a 4°C en un contenedor con el mismo buffer de lavado.

### **6.3.7 Confirmación de los Linajes Principales de *M. tuberculosis* por LSPs**

Se mandaron sintetizar una serie de iniciadores de PCR específicos (Alpha DNA, Montreal, QC, Canadá), de acuerdo con el protocolo descrito por Reed *et.al.* (2009) [45]. Estos amplifican Polimorfismos de Secuencia Larga (LSPs) dentro de las Regiones de Diferenciación (RDs) que permiten caracterizar los linajes principales del Este Asiático e Indo-Oceánico (Tabla 5).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, incluyendo 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 100ng de DNAg, 10 µM de cada iniciador, 5U de DNA Polimerasa *Taq* y su buffer correspondiente (Bioline, Boston, MA, EUA).

**Tabla 5.** Iniciadores utilizados en el análisis de LSPs para la identificación de los linajes principales.

Linaje	LSP	Secuencia	Tamaño (pb)			
			Intacto	Delección		
Indo-Oceánico	RD239	RD239-F: 5' CGTAGACTGCTCGCATGACC 3'	531	344		
		RD239-Rint: 5' CAGTGAGATCCCAAATGCTGC 3'				
Este Asiático	RD105	RD239-Rdel: 5' CGACGCAATCTGACCGACAG 3'	547	330		
		RD105-F: 5' GGTCATATCACGCGTTCGTG 3'				
	RD105-Rint: 5' TCGGGTCAAAGCACGCCTTG 3'					
	RD105-Rdel: 5' GGTGGCCCAGAAACCACCA 3'					
	RD207	RD207-F: 5' GTCTGACGACTGACAGGGTG 3'			516	682
		RD207-Rint: 5' CACGATGGCCACCTCCATG 3'				
RD181	RD207-Rdel: 5' CGTTGCGTGCTCGACGCTG 3'	326	537			
	RD181-F: 5' CAACAGCACAGCATCGGAC 3'					
RD150	RD181-Rint: 5' CTGCCGGTCTTAGTCTGCTC 3'	505	300			
	RD181-Rdel: 5' CTTGCTATCGGCGTCGTTGC 3'					
RD142	RD150-F: 5' CCATCCTGGCGTTGGTTGG 3'	400	577			
	RD150-Rint: 5' GCCATCGCGACGGTCAATG 3'					
	RD150-Rdel: 5' CCGAGGACCTTACTGCGTG 3'					
		RD142-F: 5' GGAGGACACATGTGCGAACAC 3'				
		RD142-Rint: 5' CGTGCAGCACGAACACCAC 3'				
		RD142-Rdel: 5' GTCGCAGCGCGAGTAGATC 3'				

El programa del Termociclador T100 (Bio-Rad, Hércules CA, EUA) consistió en una fase de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos conformados por una fase de desnaturalización a 95 °C por un minuto, seguida por una de alineamiento a 58 °C por 45 minutos y una de extensión a 72° C por 45 segundos; concluyendo con una última fase de extensión a 72 °C por 5 minutos. Después los productos de la amplificación se resolvieron en gel de agarosa a 1.5 % (Bioline, Boston, MA, EUA). Finalmente el patrón de bandas obtenido se digitalizó con el fotodocumentador MultiDoc-It Imaging System UVP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

### 6.3.8 Identificación molecular de la familia LAM por RFLPs

Se mandó sintetizar un par de iniciadores de PCR (Alpha DNA, Montreal, QC, Canadá), de acuerdo con el protocolo descrito por Mokrousov *et.al.* (2009) [46]. Estos



amplifican un fragmento de 233 pb del gen Rv3062, en el cual se localiza un SNP en la posición 1212 (*c>g*) específico para la familia LAM (Tabla 6).

**Tabla 6.** Iniciadores utilizados para la amplificación del gen Rv3062.

Locí	Secuencia	Tamaño (pb)
Rv3062	Rv3062F: 5' CAAGCCGGTGCACACACTCGACT 3' Rv3062R: 5' GCCTAAGTTGGACGACGTAGCCG 3'	530
RD <sup>Río</sup> Bridge	RD <sup>Río</sup> BrgF: 5' CAC TCC GGC TGC CAA TCT CGT C 3' RD <sup>Río</sup> BrgR: 5' CAC CGC CAC GCT GAA TGA GAC CA 3'	1,175

Este polimorfismo genera puntos de corte adicionales específicos para la enzima de restricción *Taq I*. La digestión con esta enzima genera una banda de 214 pb en las cepas de *M. tuberculosis* genotipo WT (No LAM), mientras que en las de linaje LAM dos bandas de 158 pb y 56 pb.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, incluyendo 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 100ng de DNAg, 10 µM de cada iniciador, 5U de DNA Polimerasa *Taq* y su buffer correspondiente (Bioline, Boston, MA, EUA). El programa del Termociclador T100 (Bio-Rad, Hércules CA, EUA) consistió en una fase de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos conformados por una fase de desnaturalización a 95 °C por un minuto, seguida por una de alineamiento a 58 °C por 45 minutos y una de extensión a 72° C por 45 segundos; concluyendo con una última fase de extensión a 72 °C por 5 minutos. Posteriormente los productos de la amplificación se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa a 1.5% (Bioline, Boston, MA, EUA) para comprobar la amplificación del gen blanco. Después se llevó a cabo la digestión de los amplicones con la enzima de restricción *Taq I* (Promega, Madison, WI, EUA) a 65 °C por 2 horas. Finalmente se corrió una electroforesis en gel de agarosa a 1.5%. El patrón de bandas obtenido se digitalizó con el

fotodocumentador MultiDoc-It Imaging System UVP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

### 6.3.9 Análisis de LSPs en las Regiones de Diferenciación RD115, RD182, RD183, RD193 y RD219

Se mandó sintetizar una par de iniciadores de PCR (Alpha DNA, Montreal, QC, Canadá), de acuerdo con el protocolo descrito por Gagneux *et.al.* (2009) [47]. Estos amplifican Polimorfismos de Secuencia Larga (LSPs) dentro de las Regiones de Diferenciación (RDs) que definen sub linajes dentro del linaje principal Euro-Americano (Tabla 7).

**Tabla 7.** Iniciadores utilizados en el análisis de LSPs dentro del linaje Euro-Americano.

Loci	Secuencia	Tamaño (pb)	
		Intacto	Delección
RD115	RD115F: 5' TTCGGGGGCCAGGTCGTTGAT 3' RD115R: 5' CCGCGGGAATGCCTGCTGTTAT 3'	3442	835
RD182	RD182F: 5' TGTATACGCCCTGTCGGCGGTCACCAT 3' RD182R: 5' GCGCATCCCGCCGGCGTTGGTT 3'	7292	812
RD183	RD183F: 5' CCGAACCGCCCGCATCAAG 3' RD183R: 5' ACGACGGCCGAAACCACAGGAA 3'	3965	1048
RD193	RD193F: 5' CCGACTACGCCTGGCGCTAAACC 3' RD193R: 5' GTAGGGGCCACCCGGATTGTCAC 3'	1308	807
RD219	RD219F: 5' GCGTCGGTGCCAGTTGC 3' RD219R: 5' GCGACGGCGTTTTGATGC 3'	3609	717

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L, incluyendo 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M de dNTPs, 100ng de DNAg, 10  $\mu$ M de cada iniciador, 5U de DNA Polimerasa *Taq* y su buffer correspondiente (Bioline, Boston, MA, EUA). El programa del Termociclador T100 (Bio-Rad, Hércules CA, EUA) consistió en una fase de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos conformados por una fase de desnaturalización a 95 °C por un minuto, seguida por una de alineamiento a 58 °C por 45 minutos y una de extensión a 72° C por 45 segundos; concluyendo con una

última fase de extensión a 72 °C por 5 minutos. Después los productos de la amplificación se resolvieron en un gel de agarosa a 1.5 % (Bioline, Boston, MA, EUA). para comprobar la amplificación del gen blanco. Después se llevó a cabo la digestión de los amplicones con la enzima de restricción *Taq I* (Promega, Fitchburg, WI, EUA) a 65 °C por 2 horas. Finalmente se corrió una electroforesis en gel de agarosa a 1.5%. El patrón de bandas obtenido se digitalizó con el fotodocumentador MultiDoc-It Imaging System UVP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### **6.3.10.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes**

Los reactivos utilizados fueron atemperados previo al comienzo del protocolo. Los moldes de cristal se limpiaron con Etanol al 70%. Primero se preparó el gel separador a una concentración de acrilamida al 12.5% (m/v). Después de que éste polimerizara en el molde, se vertió el gel concentrador, elaborado a una concentración de acrilamida al 5% (m/v). Inmediatamente después se colocó el peine, el cual llevaba acoplada cinta adhesiva transparente alrededor de 4 dientes, con el objeto de formar una sola muesca en el gel concentrador. Luego se colocó el molde en un casete y este se ajustó en la cámara de electroforesis, alineando las ranuras del casete con los electrodos. Posteriormente se agregó buffer de corrida [Tris Base 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1% (m/v1)] 1X hasta el límite de capacidad correspondiente. La muestra se preparó con 300 µL de buffer de carga [Tris HCl 200 mM pH 6.8, SDS 8% (m/v), Azul de bromofenol 0.4% (m/v), Glicerol 40% (v/v)] 2X, 300 µL de proteínas de filtrado del cultivo de *M. tuberculosis* [1.5 mg/mL], 60 µL de 2-Mercapto-Etanol (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) y se calentó a 100°C por 5 minutos. Luego se cargaron 150 µL en la muesca del gel concentrador. Se dejó corriendo la electroforesis durante 2 horas y media a 65 V,

antes de que el frente de elución saliera del molde. Después se desensambló el casete de la cámara de electroforesis, y se desarmó el molde. Se retiró el gel separador [12.5%] del gel concentrador [5%]. La tinción de Coomassie R250 al 0.05% (m/v) en una solución de metanol:ácido acético:agua (50:10:40 v/v/v), se llevó a cabo para la visualización de las proteínas y la verificación de su integridad. Los geles se destiñeron en una solución de Metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) hasta alcanzar el contraste adecuado.

#### **6.3.10.2 Transferencia en cámara sumergida**

Previo al inicio del protocolo, se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  1 L de buffer de transferencia en cámara sumergida [Tris HCl 48 mM pH 8.3, Glicina 39 mM, Metanol 20% (v/v), SDS 0.0375% (m/v)] 1X. Primero se recortaron un par de rectángulos (5.5 cm x 8.5 cm) de membrana de Polifluoruro de vinileno (PVDF) (GE Health Care Life Sciences, Little Chalfont, BUX, UK) y se sumergieron en un recipiente con Metanol absoluto (J. T. Baker Avantor, Center Valley, PA, EUA). Posteriormente se depositaron 2 recuadros de papel filtro con las mismas dimensiones en un contenedor con buffer de transferencia en cámara sumergida 1X. Después se colocaron los rectángulos de PVDF en recipientes con el buffer ya mencionado. Luego se vertió buffer de transferencia en cámara sumergida 1X en un recipiente, con la capacidad suficiente para cubrir el casete de la cámara de transferencia. Se abrieron los casete, quedando la base de color negro sumergida en el buffer de transferencia de cámara sumergida 1X, sobre la base se colocó la esponja, arriba de esta papel filtro, luego el gel de poliacrilamida, después la membrana de PVDF, luego el papel filtro, después la esponja y finalmente se cerró el casete. Después de armar el casete, este se ensambla dentro del sistema de transferencia, haciendo coincidir la base negra del casete con el electrodo negativo y la base blanca

con el electrodo positivo. El sistema de transferencia se colocó en la cámara de electroforesis, y se vertió 1 L de buffer de transferencia en cámara sumergida 1X. La transferencia se llevó a cabo a 4 °C, 60 V por 10 horas. Después de la transferencia, la membrana de PVDF se colocó en un recipiente con Rojo de Ponceu S al 0.5% (m/v) en Ácido Acético al 7.5% (v/v). Finalmente se pasó la membrana de PVDF a una solución con Ácido Acético al 7.5% (v/v) para corroborar la transferencia de proteínas.

### **6.3.10.3 Western Blot**

Las membranas de PVDF se bloquearon con Leche descremada (al 3% m/v) en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) 1X a 25 °C por 2 horas en un horno de hibridación (UVP, Jena, TH, Alemania). Luego se realizaron 6 lavados de 5 minutos con buffer de lavado PBST [NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, Tween 20 0.05% (v/v)] 1X. La membrana de PVDF se colocó sobre la base del miniblotter Mini Protean II Multi Screen (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA) con la cara en donde se transfirieron las proteínas hacia arriba y haciendo contacto con los carriles del miniblotter. El suero de los pacientes se diluyó 1:100 en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) 1X-BSA 0.5% (m/v). Se cargaron 650 µL de cada muestra y el miniblotter se dejó incubando a 25 °C por 2 horas. Luego se realizaron 6 lavados de 5 minutos con buffer de lavado. Los anticuerpos de conejo policlonales anti inmunoglobulinas IgM e IgG humanas acoplados a Peroxidasa (Abcam, Cambridge, CBE, UK) se diluyeron 1:400 en buffer PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) 1X-BSA 0.5% (m/v). Las membranas de PVDF se dejaron incubando con los anticuerpos secundarios por 2 horas a 25 °C en el horno de

hibridación. Luego se realizaron 6 lavados de 5 minutos con buffer de lavado. Las membranas de PVDF se extendieron sobre una superficie plana y se vertió sustrato quimioluminiscente LumiGlo (KPL, Gaithersburg, MD, EUA), durante un minuto. Posteriormente se colocaron ambas membranas entre 2 acetatos y se expuso una placa fotográfica sensible a la luz (Eastman Kódak, Rochester, NY, EUA) bajo condiciones de oscuridad. Después de un minuto de exposición, se recortó la placa fotográfica en dos partes (IgM e IgG), ambas se revelaron y fijaron con el sistema de revelado y fijación (Eastman Kódak, Rochester, NY, EUA).

### **6.3.11 Cuantificación de anticuerpos totales IgM**

Se utilizó el kit de ELISA ab137982-IgM Humano (Abcam, Cambridge, CBE, UK), para llevar a cabo la cuantificación de anticuerpos totales de clase IgG en el suero de cada uno de los pacientes involucrados en el estudio. El diluyente N 10X se diluyó a una proporción 1:10 con agua libre de nucleasas (Quiagen N. V. Hilden, NRW, Alemania). El buffer de lavado 20X se diluyó a una proporción 1:20 con agua libre de nucleasas. El anticuerpo detector IgM biotinilado 50X se diluyó en una proporción 1:50 con el diluyente N 1X. El conjugado Estreptavidina-Peroxidasa 100X se diluyó en una proporción 1:100 con el diluyente N 1X. Se reconstituyó el estándar de anticuerpo IgM con el diluyente N 1X a una concentración de 200 ng/mL. A partir de este concentrado (estándar 1), se prepararon 6 estándares por medio de diluciones seriadas (120 µL estándar IgM:120 µL diluyente N 1X). El estándar 8 corresponde al blanco (diluyente N 1X solamente). El suero de los pacientes se diluyó en una proporción 1:100,000 con el diluyente N 1X, ya que el rango óptimo de la linealidad del suero a una dilución 1:60,000 y 1:120,000 es de 97 % y 104 % respectivamente, de acuerdo con las

especificaciones del fabricante (Abcam, Cambridge, CBE, UK). Se agregaron 50  $\mu$ L de las muestras de suero (1:100,000) y de los estándares a cada uno de los pozos de la placa de ELISA, la cual estaba sensibilizada con un anticuerpo de captura anti IgM. La placa se cubrió con un plástico sellador y se dejó incubando por 2 horas a 25 °C. Luego se hicieron 5 lavados con 200  $\mu$ L de buffer de lavado 1X. Después se agregó 50 $\mu$ L de anticuerpo anti IgM biotinilado 1X a cada pozo y se dejó incubar por 1 hora a 25 °C. Posteriormente se hicieron 5 lavados con 200  $\mu$ L de buffer de lavado 1X. Luego se agregó a cada pozo 50  $\mu$ L del conjugado Estreptavidina-Peroxidasa 1X y se dejó incubando por 30 minutos a 25 °C. Después se hicieron 5 lavados con 200  $\mu$ L de buffer de lavado 1X. Posteriormente se agregó 50  $\mu$ L de Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) a cada uno de los pozos para el desarrollo de color. Se adicionaron 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 0.16 M para detener la reacción de manera simultánea en cada uno de los pozos de la placa. El color viró de azul a amarillo, y finalmente se leyeron las absorbancias en un lector de microplacas iMark (Bio-Rad, Hércules CA, EUA) a 450 nm, para la construcción de la curva de calibración y la cuantificación de los anticuerpos totales de clase IgM en el suero de los pacientes.

### **6.3.12 Cuantificación de anticuerpos totales IgG**

Se utilizó el kit de ELISA ab100547-IgG Humano (Abcam, Cambridge, CBE, UK), para llevar a cabo la cuantificación de anticuerpos totales de clase IgG en el suero de cada uno de los pacientes involucrados en el estudio. El diluyente de ensayo 5X se diluyó a una proporción 1:5 con agua libre de nucleasas (Quiagen N. V. Hilden, NRW, Alemania). El buffer de lavado 20X se diluyó a una proporción 1:20 con agua libre de nucleasas. El anticuerpo detector IgG biotinilado 80X se diluyó en una proporción 1:80

con el diluyente de ensayo 1X. El conjugado Estreptavidina-Peroxidasa 4000X se diluyó en una proporción 1:4000 con el diluyente de ensayo 1X. Se reconstituyó el estándar de anticuerpo IgG con el diluyente de ensayo 1X a una concentración de 50 ng/mL. A partir de este concentrado (estándar 1), se prepararon 6 estándares por medio de diluciones seriadas (180  $\mu$ L estándar IgG:420  $\mu$ L diluyente de ensayo 1X). El estándar 8 corresponde al blanco (diluyente de ensayo 1X solamente). El suero de los pacientes se diluyó en una proporción 1:10,000,000 con el diluyente de ensayo 1X, ya que es lo sugerido por el fabricante (Abcam, Cambridge, CBE, UK) para obtener una linealidad óptima en el suero. Se agregaron 100  $\mu$ L de las muestras de suero (1:10,000,000) y de los estándares a cada uno de los pozos de la placa de ELISA, la cual estaba sensibilizada con un anticuerpo de captura anti IgG. La placa se cubrió con un plástico sellador y se dejó incubando por 2 horas y media a 25 °C. Luego se hicieron 4 lavados con 300  $\mu$ L de buffer de lavado 1X. Después se agregó 100  $\mu$ L de anticuerpo anti IgG biotilado 1X a cada pozo y se dejó incubar por 1 hora a 25 °C. Posteriormente se hicieron 4 lavados con 300  $\mu$ L de buffer de lavado 1X. Luego se agregó a cada pozo 100  $\mu$ L del conjugado Estreptavidina-Peroxidasa 1X y se dejó incubando por 45 minutos a 25 °C. Después se hicieron 4 lavados con 300  $\mu$ L de buffer de lavado 1X. Posteriormente se agregó 100  $\mu$ L de Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA) a cada uno de los pozos para el desarrollo de color. Se adicionaron 50  $\mu$ L de ácido Sulfúrico 0.16 M para detener la reacción de manera simultánea en cada uno de los pozos de la placa. El color viró de azul a amarillo, y finalmente se leyeron las absorbancias en un lector de microplacas iMark (Bio-Rad, Hércules CA, EUA) a 450 nm, para la construcción de la curva de calibración y la cuantificación de los anticuerpos totales de clase IgM en el suero de los pacientes.



### **6.3.13 Inmunoensayo para detectar la respuesta de los anticuerpos IgM e IgG contra las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis***

Para determinar la especificidad de la respuesta humoral contra *M. tuberculosis*, se determinó la reactividad del suero de cada uno de los pacientes contra proteínas del filtrado de cultivo (CFP) mediante un ensayo de ELISA directo (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Primero se diluyeron 60  $\mu$ L de las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (0.09 mg) en 1 mL de buffer de carbonatos ( $\text{NaHCO}_3$  0.2M pH 8.2). Se depositaron 100  $\mu$ L por pozo en una placa de ELISA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Esta se dejó incubando durante toda la noche. Después se hicieron 4 lavados por 5 minutos cada uno con 200  $\mu$ L de buffer de lavado PBST [ $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, Tween 20 0.2% (v/v)] 1X. Luego se bloqueó la placa con 200  $\mu$ L de PBS ( $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM) 1X-BSA 2% (m/v) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se hicieron 4 lavados por 5 minutos cada uno con 200  $\mu$ L de buffer de lavado. Después se agregó a cada pozo 100  $\mu$ L del suero de los pacientes diluido 1:100 en PBST [ $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, Tween 20 0.1% (v/v)] 1X-BSA al 1% (m/v) y se incubó la placa durante 1 hora a 37° C. Luego se hicieron 4 lavados por 5 minutos cada uno con 200  $\mu$ L de buffer de lavado. Posteriormente se agregó a cada pozo 100  $\mu$ L de anticuerpos de conejo policlonales anti-IgM y anti-IgG humanas acoplados a Peroxidasa (Abcam, Cambridge, CBE, UK) diluidos 1:10,000 en PBS ( $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM) 1X-BSA 0.1% (m/v), cada uno de estos por separado. La placa se incubó durante 1 hora a 37 °C. Luego se hicieron 4 lavados por 5 minutos cada uno con 200  $\mu$ L de buffer de lavado. Después se

agregó a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). Posteriormente se detuvo la reacción con 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 0.16 M. El color viró de azul a amarillo. Finalmente se registraron las absorbancias en el lector de microplacas iMark (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA) a una longitud de onda de 450 nm para posteriormente realizar el análisis de la inmunreactividad obtenida.

#### **6.3.14 Titulación de anticuerpos IgM e IgG contra las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis***

Para la medición de la titulación de anticuerpos se utilizó la técnica de inmunoensayo enzimático ELISA se diluyeron 60  $\mu\text{L}$  de las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (0.09 mg) en 1 mL de buffer de carbonatos ( $\text{NaHCO}_3$  0.2M pH 8.2). Se depositaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo en una placa de ELISA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Esta se dejó incubando durante toda la noche. Después se hicieron 4 lavados por 5 minutos cada uno con 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado PBST [ $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, Tween 20 0.2% (v/v)] 1X. Luego se bloqueó la placa con 200  $\mu\text{L}$  de PBS ( $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM) 1X-BSA 2% (m/v) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se hicieron 4 lavados por 5 minutos cada uno con 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado. Después se agregó a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  del suero de los pacientes diluido 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24300 y 1:72900 en PBST [ $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, Tween 20 0.1% (v/v)] 1X-BSA al 1% (m/v) y se incubó la placa durante 1 hora a 37° C. Luego se hicieron 4 lavados por 5 minutos cada uno con 200  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado. Posteriormente se agregó a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpos de conejo policlonales anti inmunoglobulinas IgM e IgG humanas acoplados a Peroxidasa (Abcam,

Cambridge, CBE, UK) diluidos 1:10,000 en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) 1X-BSA 0.1% (m/v), cada uno de estos por separado. La placa se incubó durante una hora a 37°C. Luego se hicieron 4 lavados por 5 minutos cada uno con 200 µL de PBS-Tween 20 al 0.2% (v/v). Después se agregó a cada pozo 100 µL de TMB (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). Posteriormente se adicionó 50 µL de ácido sulfúrico 0.16 M para detener la reacción. El color viró de azul a amarillo. Finalmente se registraron las absorbancias en el lector de microplacas iMark (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA) a una longitud de onda de 450 nm para posteriormente realizar el análisis de los títulos obtenidos.

#### 6.4 Análisis estadísticos

Para el cálculo del tamaño de la muestra representativa de pacientes se utilizó la fórmula:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de los anticuerpos totales IgM e IgG, la inmunoreactividad específica contra las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv y el título de anticuerpos de las muestras de suero de pacientes infectados con diferentes genotipos, así como de los individuos controles. También se usó la comparación múltiple de Dunn para estimar la diferencia en la suma de los rangos de estos grupos como una prueba adicional.

## Capítulo 7

### RESULTADOS

#### 7.1 Banco de DNA genómico de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*

Se realizó un muestreo a 105 pacientes con sospecha de tuberculosis pulmonar que ingresaron a la Jurisdicción No. 3 de Matamoros, Tamaulipas; para conformar el banco de DNAg. Entre los pacientes incluidos en el estudio, el sexo masculino fue el de mayor prevalencia (73%), la edad media estimada fue de 40 años y el rango de edad oscila entre los 13 años como valor mínimo hasta los 83 años como edad máxima. Se reportaron 86 casos (85%) de pacientes diagnosticados por primera vez de TB y 96 pacientes (91%) fueron vacunados con *M. bovis* BCG. Hubo registro de 27 pacientes (26%) con diabetes y 4 casos (4%) de individuos coinfectados con VIH. Esta última variable se aplicó como un criterio de exclusión, por lo que las muestras de dichos pacientes no se tomaron en consideración para análisis posteriores en el presente estudio. Se realizó el cultivo microbiológico a partir de estas muestras de esputo, y un total de 101 cepas aisladas en medio de Löwenstein-Jensen, mostraron la morfología característica de *M. tuberculosis* (forma de coliflor, coloración beige, sin pigmentos), y con resultados positivo para las pruebas bioquímicas de Niacina y reducción de Nitratos, las cuales son las pruebas bioquímicas de uso rutinario para la identificación fenotípica de *M. tuberculosis* (Tabla 8).

**Tabla 8.** Características de los pacientes con TB en el estudio.

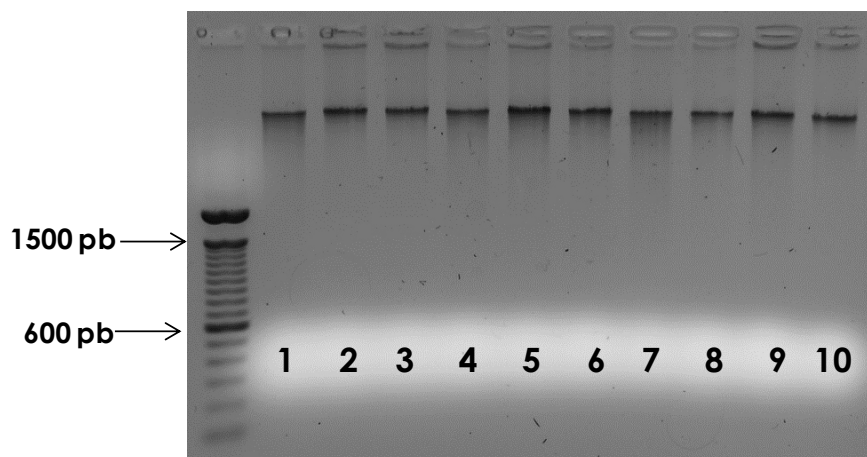
Variable	Pacientes (N= 105)
Sexo (H/M)	[77/28] (73% H/27%M)
Media edad	40
Rango edad	13-83
BCG	96/105 (91%)
TB primera vez	86/105 (82%)
Diabetes	27/105 (26%)
VIH	4/105 (4%)
<b>No. de cepas</b>	<b>101</b>

El tiempo de tratamiento con los antifímicos se aplicó como un segundo criterio de inclusión. Se registraron 42 individuos (32%) que todavía no habían iniciado el tratamiento farmacológico y 37 pacientes (28%) cuyo tratamiento llevaba como máximo 8 días de iniciado. Los 22 sujetos restantes (20%) presentaban mayor tiempo de iniciado el tratamiento, desde un mes hasta los 6 meses en algunos casos, por lo que no correspondían con el criterio de inclusión, y las cepas aisladas de sus respectivas muestras se descartaron del presente estudio (Tabla 9).

**Tabla 9.** Total de aislamientos clínicos después de aplicar los criterios de exclusión.

Inicio del tratamiento	Pacientes (n= 101)
Sin tratamiento	42/101 (32%)
Menor 8 días	37/101 (28%)
>8 días	6/101 (4%)
>30 días	11/101 (8%)
> 6 meses	5/101 (4%)
<b>Resiembra</b>	<b>76</b>

A los aislamientos clínicos seleccionados se les realizó la extracción de DNAg por el método de lisis enzimática/CTAB (Figura 8). Al final se reunieron 76 muestras de DNAg, las cuales fueron almacenadas a -70°C, hasta su uso en los análisis posteriores.



**Figura 8.** DNA genómico de *M. tuberculosis*. Gel de agarosa al 0,8% (m/v). Carriles 1-10: Aislados clínicos de *M. tuberculosis* [100ng/μL].

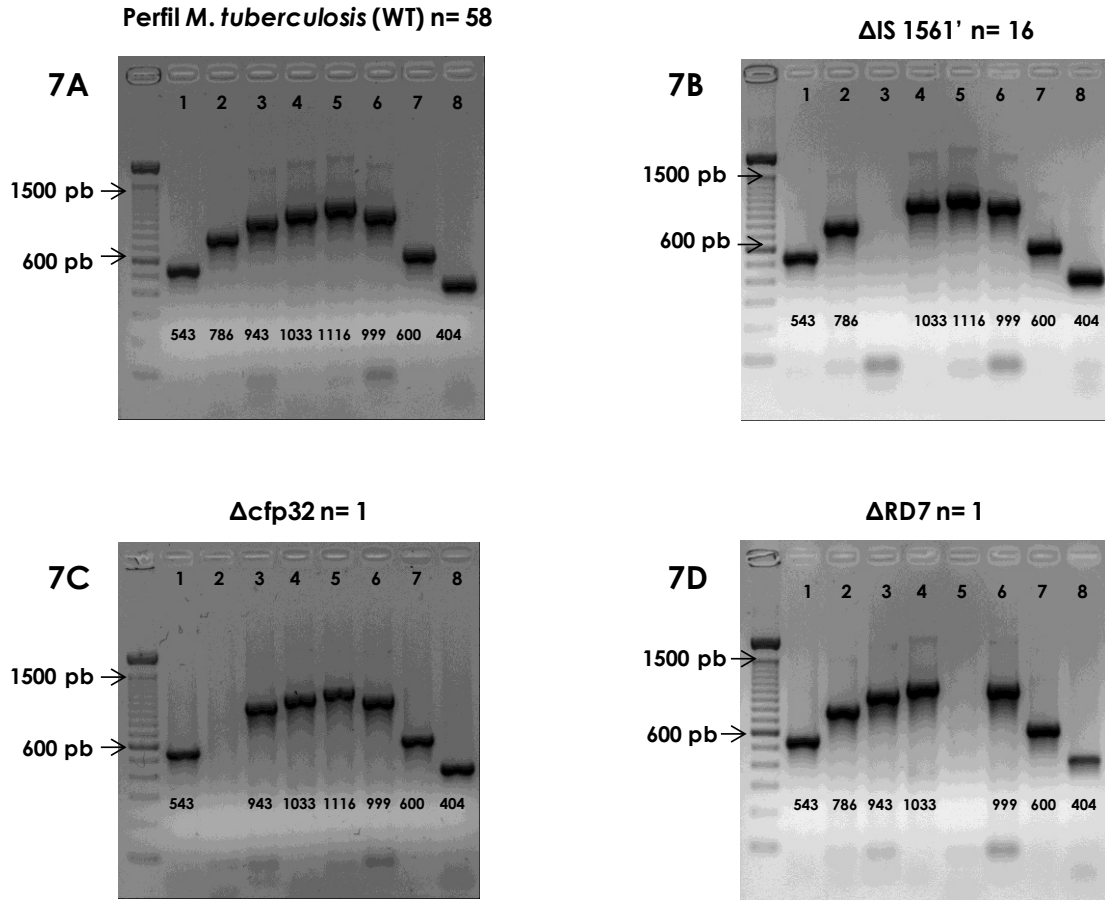
### 7.2 Identificación molecular de *M. tuberculosis*

Para corroborar la identificación previa de *M. tuberculosis* por pruebas bioquímicas, se realizó el método de las deleciones genómicas descrito por Huard, *et.al.* (2006). Este protocolo se fundamenta en el uso de la tecnología de PCR para amplificar ocho locus bien definidos en el genoma de *M. tuberculosis*. El patrón de bandas obtenido al realizar un gel de agarosa 1.5% forma un perfil, el cual se asigna para poder diferenciar las especies y sub especies que integran el complejo *M. tuberculosis*, de acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Perfiles de identificación de especies y sub especies del Complejo *M. tuberculosis* por el método de las deleciones genómicas.

Especies CMT y MNT	Perfil
<i>M. tuberculosis</i>	12345678
<i>M. canettii</i>	1234567•
<i>M. africanum</i> (sub tipo I)	123456•8
<i>M. africanum</i> (sub tipo II)	1234•6•8
<i>M. microti</i>	12•4•6•8
<i>M. caprae</i>	1234•6••
<i>M. bovis</i>	123••6••
<i>M. bovis</i> BCG	123•••••
MNT	1•••••••

De acuerdo con la identificación fenotípica, se esperaba que los 76 aislados clínicos mostraran el perfil 12345678, el cual corresponde a la especie *M. tuberculosis*. Sin embargo, este no fue el único encontrado, ya que partiendo del total de 76 cepas, solamente 58 aislamientos (76%) corresponden con el perfil 12345678 de *M. tuberculosis* (Figura 9A), siendo el de mayor prevalencia en el estudio. Un segundo grupo conformado por 16 aislamientos clínicos (21%) mostraron el perfil 12•45678 (Figura 9B), ocupando el lugar dos en cuanto a su frecuencia. Este perfil no se encuentra definido en el protocolo de Huard *et.al.* (2006) y se caracteriza por la ausencia de un amplicón de 943 pb, que corresponde al loci IS 1561'. Una cepa (1.5%) presentó el perfil 1•345678 (Figura 9C). Este perfil tampoco se encuentra registrado en el método de las deleciones genómicas, y se caracteriza por la ausencia de un producto de PCR de 786 pb, que corresponde al loci *cfp32*. Otro aislado clínico (1.5%) mostro el perfil 1234•678 (Figura 9D), que al igual que con los dos anteriores, tampoco figura dentro de los patrones de tipificación de Huard *et.al.* (2006). Este se caracteriza por la ausencia de un amplicón de 1116 pb, que corresponde al loci RD7. Al final se obtuvieron cuatro genotipos diferentes: *M. tuberculosis* WT,  $\Delta$ IS 1561',  $\Delta$ cfp32 y  $\Delta$ RD7. Estos resultados reflejan la diversidad genética existente en los aislamientos clínicos de este estudio.



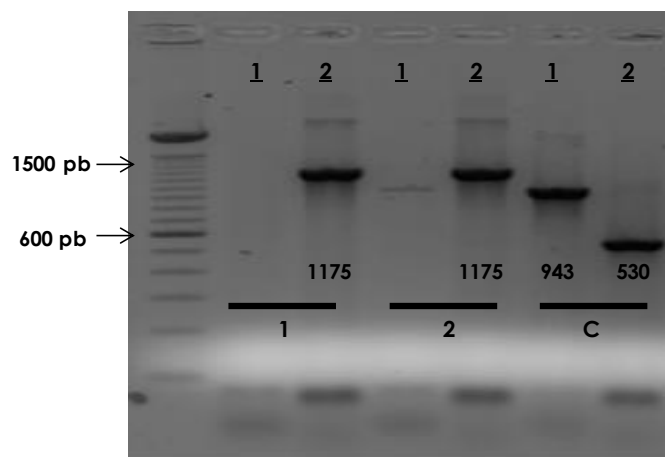
**Figura 9.** Paneles de tipificación obtenidos con el método de las deleciones genómicas. **9A:** Perfil 12345678 de la especie *M. tuberculosis*. Se encuentran todos los amplicones. **9B:** Perfil 12•45678 de  $\Delta$ IS 1561'. Ausencia del producto de PCR de 943 pb (carril 3). **9C:** Perfil 1•345678 de  $\Delta$ cfp32. Ausencia del amplicón de 786 pb (carril 2). **9D:** Perfil 1234•678 de  $\Delta$ RD7. Ausencia del producto de PCR de 1116 pb (carril 5). Geles de agarosa al 1.5% (m/v).

### 7.3 Identificación molecular de la deleción RDRío ( $\Delta$ RD<sup>Río</sup>)

El segundo genotipo de mayor prevalencia en este estudio fue el perfil 12•45678, el cual se designó como  $\Delta$ IS 1561', debido a la ausencia del amplicón de 943 pb que corresponde a este loci. Se buscaron antecedentes en donde se pudiera relacionar la pérdida de esta secuencia con algún genotipo en particular. Lazzarini *et.al.* (2007) caracterizaron un LSP que funciona como un marcador molecular o un sublinaje de la familia LAM por Spoligotyping y que genera el mayor número de los casos de TB en Río de Janeiro, Brasil; y al que se le han denominado genotipo RDRío. Las cepas que



pertenecen a este genotipo presentan una delección de 26.317 Kb. Como consecuencia de esta delección, se alteran los genes Rv3346c y Rv3355c; y se remueven en su totalidad PPE55, Rv3548, PPE56, Rv3351c, Rv3352c, Rv3353c, Rv3354, así como la secuencia blanco correspondiente a la banda número 3 en el método de Huard, la IS 1561'. Gibson *et.al.* (2008) diseñaron un protocolo de PCR múltiplex capaz de identificar esta delección. Si el producto de amplificación tiene un tamaño de 530 pb, la cepa evaluada corresponde a *M. tuberculosis* WT. Por otro lado, si el amplicón tiene un tamaño de 1175 pb, el aislado clínico pertenece al genotipo RD<sup>Río</sup>, ya que el producto amplificado correspondería al alineamiento de un par de oligonucleótidos que flanquean la delección de 26Kb. Para evaluar la delección RDRío, se realizó la PCR múltiplex en los 16 aislamientos clínicos caracterizados como ΔIS, 1561'. Como control negativo se utilizó una cepa con el genotipo *M. tuberculosis* WT. Además, se realizó el método de las deleciones genómicas a esos aislamientos clínicos y al control negativo para validar los resultados de la PCR múltiplex. En las 16 cepas analizadas se encontró un amplicón de 1175 pb (PCR múltiplex) y la ausencia del producto de amplificación de 943 pb (método de las deleciones genómicas). Por otro lado, con el control negativo con el genotipo *M. tuberculosis* WT se observó un producto de PCR de 530 pb (PCR múltiplex) y un amplicón de 943 pb (método de las deleciones genómicas) (Figura 10). Lo anterior confirma que todos los aislamientos clínicos caracterizados como ΔIS 1561' mediante el método de las deleciones genómicas, corresponden al genotipo *M. tuberculosis* RD<sup>Río</sup>.

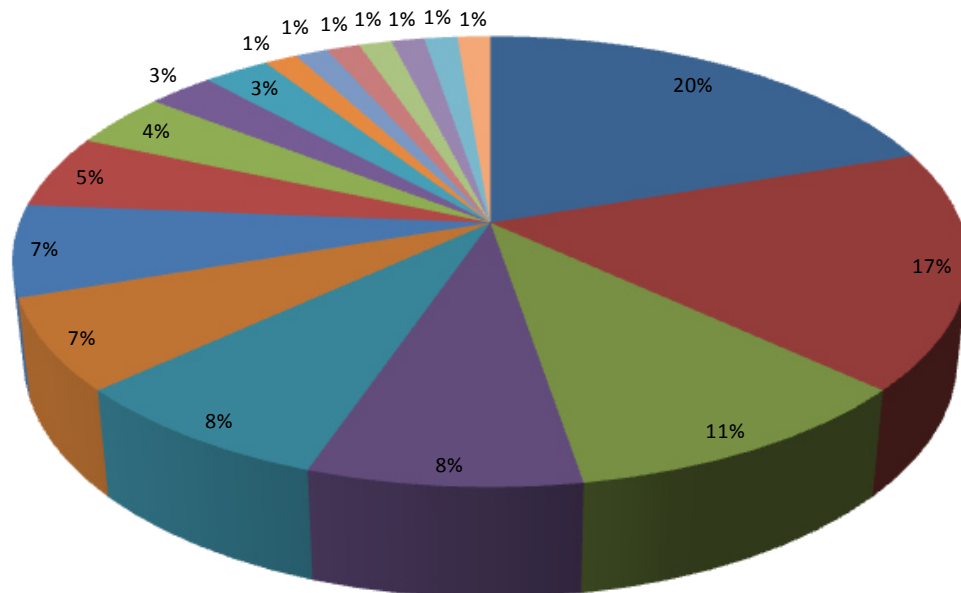
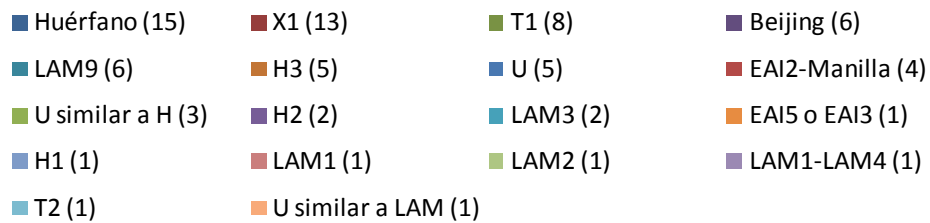


**Figura 10.** Panel de tipificación para la delección RD<sup>Rio</sup>. Gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: método de las deleciones genómicas. Carril 2: PCR múltiplex. Cepas 1 y 2: *M. tuberculosis* genotipo  $\Delta$ IS 1561'. C: control negativo de *M. tuberculosis* genotipo WT.

#### 7.4 Genotipificación de los aislamientos clínicos por *Spoligotyping*

Para evaluar la diversidad genética de las 76 cepas, se realizó la técnica de genotipificación por *Spoligotyping*. Este método utiliza como blanco el locus DR, el cual es una región altamente polimórfica. El polimorfismo se encuentra en función de la ausencia o presencia de espaciadores no conservados ya caracterizados, los cuales determinan un patrón denominado espoligotipo. Se obtuvieron 36 espoligotipos diferentes. Estos se convirtieron a un código binario, y a partir de este a código octal, con el propósito de asignarle a cada aislamiento clínico un SIT consultando la base de datos SpolDB4 [41]. Los resultados obtenidos por el *Spoligotyping* fueron los siguientes: 11 aislamientos clínicos corresponden al SIT 119 de la familia X1 (14.47%), 7 al SIT 53 de la familia T1 (9.21%), 6 al SIT 1 de la familia Beijing (7.89%), 4 al SIT 19 de la familia EAI2-Manilla, 4 al SIT 450 de la familia U (5.26%), 3 al SIT 50 de la familia H3 (3.95%), 3 al SIT 42 de la familia LAM9 (3.95%), 3 al SIT 46 de la familia U (parecida a LAM) (3.95%), 2 al SIT 2 de la familia H2 (2.63%), 2 al SIT 211 de la familia LAM3 (2.63%), 2 al SIT 163 de la familia LAM9 (2.63%), 1 al SIT 8 de la

familia EAI5 o EAI3 (1.32%), 1 al SIT 29 de la familia U (parecido a LAM) (1.32%), 1 al SIT 217 de la familia X1 (1.32%), 1 al SIT 764 de la familia H3 (1.32%), 1 al SIT 1232 de la familia T2 (1.32%), 1 al SIT 22 de la familia T1 (1.32%), 1 al SIT 336 de la familia X1 (1.32%), 1 al SIT 47 de la familia H1 (1.32%), 1 al SIT 1238 de la familia H3 (1.32%), 1 al SIT 239 de la familia U (1.32%), 1 al SIT 17 de la familia LAM2 (1.32%), 1 al SIT 1321 de la familia LAM1-LAM4 (1.32%), 1 al SIT 20 de la familia LAM1 (1.32%) y 1 al SIT 398 de la familia LAM9 (1.32%). También se obtuvieron 11 espoligotipos huérfanos (15 cepas, 19.74%), a los cuales no se les pudo asignar ningún SIT y tampoco una familia de la base de datos (Figura 11, Tabla 11).

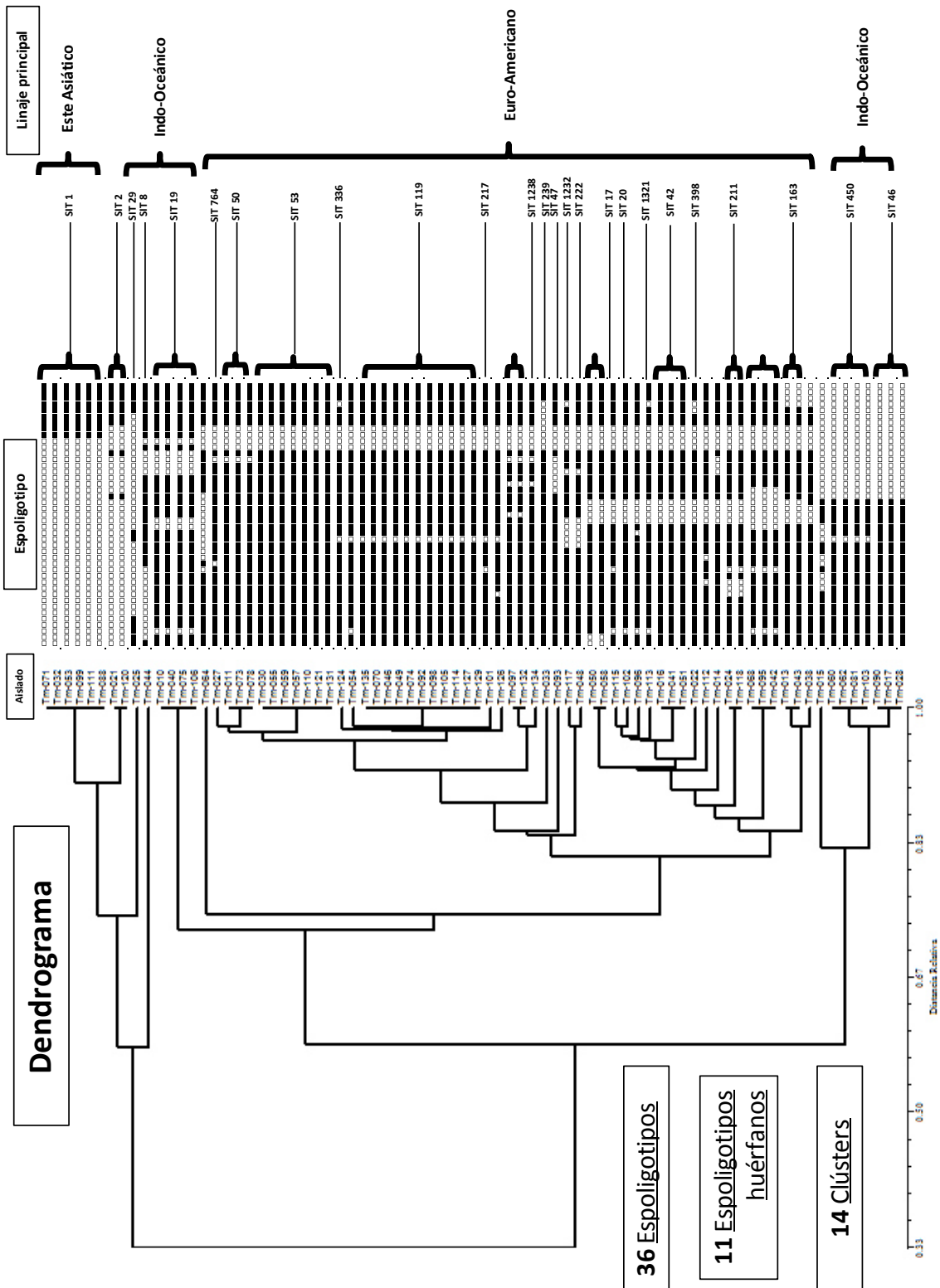


**Figura 11.** Familias encontradas por el método de Spoligotyping.

**Tabla 11.** Espoligotipos de *M. tuberculosis* encontrados en el estudio.

<b>Espoligotipo (Octal)</b>	<b>SIT (SpolDB4)</b>	<b>Linaje</b>	<b>Número de aislados</b>
000000000003771	1	Beijing	6 (7.89%)
000000004020771	2	H2	2 (2.63%)
400037777413771	8	EAI5 o EAI3	1 (1.32%)
67777477413771	19	EAI2-MANILLA	4 (5.26%)
760001400000171	29	U (parecido a LAM)	1 (1.32%)
67777677760771	Huérano	No definido	1 (1.32%)
77677677760771	Huérano	No definido	1 (1.32%)
777720003760771	Huérano	No definido	1 (1.32%)
77773677760771	217	X1	1 (1.32%)
77775777720771	764	H3	1 (1.32%)
777774077560731	1232	T2	1 (1.32%)
777774077560771	222	T1	1 (1.32%)
77777677760731	336	X1	1 (1.32%)
77777677760771	119	X1	11 (14.47%)
77777736720771	Huérano	No definido	2 (2.63%)
77777774020771	47	H1	1 (1.32%)
77777776720771	1238	H3	1 (1.32%)
7777777720771	50	H3	3 (3.95%)
77777777760031	239	U	1 (1.32%)
77777777760771	53	T1	7 (9.21%)
177777607760771	Huérano	No definido	2 (2.63%)
677737401760771	Huérano	No definido	3 (3.95%)
677737607760771	17	LAM2	1 (1.32%)
67777207760771	Huérano	No definido	1 (1.32%)
67777607760731	1321	LAM1-LAM4	1 (1.32%)
67777607760771	20	LAM1	1 (1.32%)
776137607760771	211	LAM3	2 (2.63%)
777567607760771	Huérano	No definido	1 (1.32%)
77777607420771	Huérano	No definido	1 (1.32%)
77777607760631	398	LAM9	1 (1.32%)
77777607760700	163	LAM9	2 (2.63%)
77777607760771	42	LAM9	3 (3.95%)
77777617760700	Huérano	No definido	1 (1.32%)
777046170000000	Huérano	No definido	1 (1.32%)
777776770000000	450	U	4 (5.26%)
777777700000000	46	U (parecido a H)	3 (3.95%)

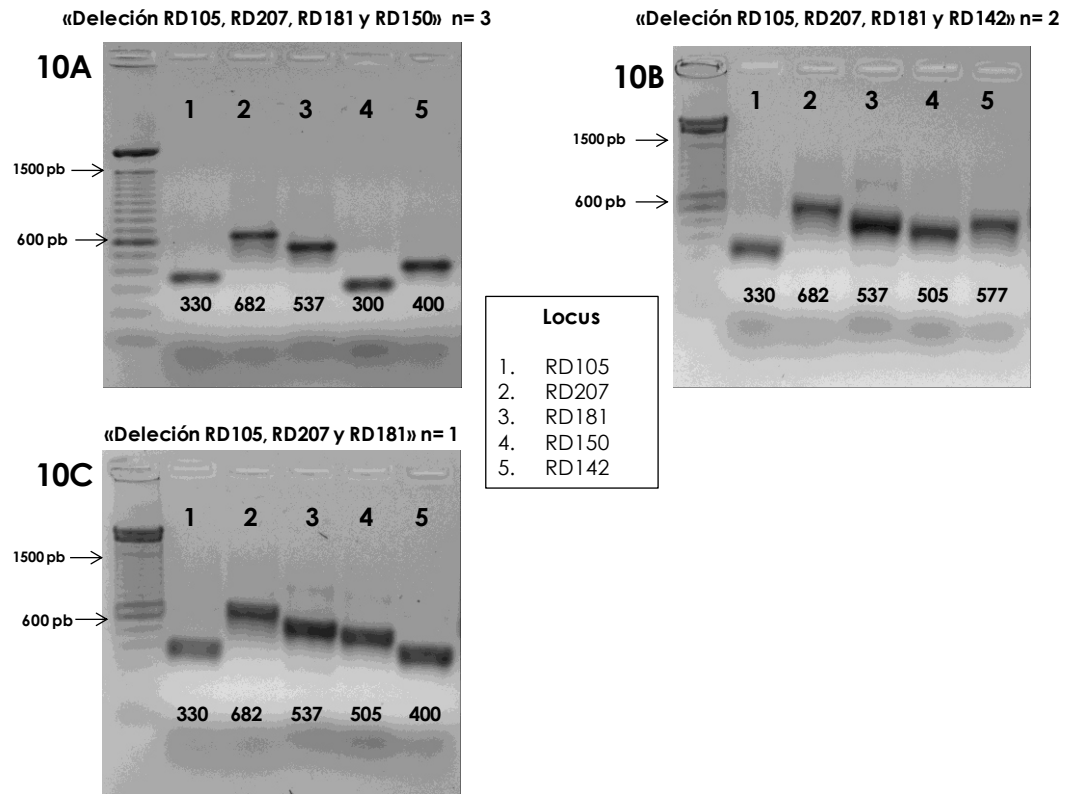
A partir del código binario obtenido se hizo un análisis de similitud con el programa computacional NTSYSpc (Exeter Software, NY, USA). Con esta herramienta se construyó un dendrograma con los coeficientes de distancia de cada una de las cepas y se encontró un total de 14 clústeres (Figura 12). En el dendrograma se agruparon los aislamientos clínicos en cuatro grupos principales. El primero se encuentra constituido por seis cepas que pertenecen al linaje principal del Este Asiático (7.89%), todas de la familia Beijing. El segundo bloque se encuentra integrado por aislados clínicos del linaje principal Indo-Oceánico (5 cepas, 6.58%) una perteneciente a la familia EAI5 o EAI3 y cuatro a la familia EAI2-Manilla. El tercer bloque también se encuentra constituido por cepas del linaje principal Indo-Oceánico (9 cepas, 11.84%), pero a diferencia del bloque 2, cuatro cepas pertenecen a la familia U, tres a la familia U (parecida a H), una a la familia U (parecida a LAM) y una con espoligotipo huérfano. Considerando el número de aislamientos clínicos clasificados como Indo-Oceánicas, se obtiene un total de 14 cepas con una prevalencia de 18.42%. El último bloque fue el que se encontró en mayor proporción en el estudio (56 cepas, 73.68%). Las cepas que conforman este grupo pertenecen al Linaje Principal Euro-Americano, el cual se ubica principalmente en Europa y América [42]. También es el bloque con una mayor variedad de familias. El cuarto bloque se encuentra integrado por dos cepas de la familia H2, trece de la familia X1, cinco de la familia H3, una de la familia T2, ocho de la familia T1, una de la familia H1, una de la familia U, una de la familia LAM2, una de la familia LAM1-LAM4, una de la familia LAM1, dos de la familia LAM3, seis de la familia LAM9 y 9 con espoligotipos huérfanos. Por medio de la genotipificación se observó que los aislados clínicos en este estudio presentaron una gran diversidad genética (Figura 12).



**Figura 12.** Dendrograma de los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* con base en el análisis de similitud de sus espoligotipos.

## 7.5 Confirmación de Linajes Principales por LSPs

Para corroborar los resultados obtenidos por la genotipificación por Spoligotyping, se realizó un análisis de los Polimorfismos de Secuencia Larga (LSP) para los aislamientos clínicos del bloque 1 del Este Asiático, el bloque 2 y el bloque 3 Indo-Oceánicos. Para los aislamientos clínicos del Linaje Principal de Este Asiático, se analizaron las siguientes regiones de diferencia: RD105, RD207, RD181, RD150 y RD142. Se encontró que las 6 cepas mostraron un amplicón de 330 pb para RD105, uno de 682 pb para RD207 y uno de 537 pb para RD181. De acuerdo con estos resultados, los 6 aislamientos clínicos presentan una delección en cada una de estas secuencias. La delección en RD105 se considera como el marcador clásico de las cepas del Este Asiático (Reed *et.al.*, 2009) por lo que se comprobó que los 6 aislamientos clínicos pertenecen a este Linaje Principal. También se observó en 3 cepas un amplicón de 300 pb y en las otras 3 uno de 505 pb. Con respecto a estos resultados, 3 aislamientos clínicos presentaron una delección en RD150, mientras que en las otras 3 se encontró intacto. En cuanto a RD142, se observó un producto de PCR de 577 pb, contrario al amplicón de 400 pb visto en las otras 4. De acuerdo con estos resultados, 2 cepas presentan una delección en RD142, mientras que en 4 aislamientos clínicos se encuentra intacto. A partir de estos análisis, se clasificó a este conjunto de cepas en 3 sub linajes: delección en RD105, RD207, RD181 y RD150 (3 cepas, 50%) (Figura 13A), delección en RD105, RD207, RD181 Y RD142 (2 cepas, 33.33%) (Figura 13B) y delección en RD105, RD207 y RD181 (1 cepa, 16.67%) (Figura 13C). Con base en estos sublinajes se puede concluir que, independientemente de que los 6 aislamientos clínicos pertenezcan al Linaje Principal del Este Asiático y compartan el SIT 1 de la familia Beijing, estos difieren genéticamente en las regiones de diferenciación RD150 y RD142 (Tabla 12).



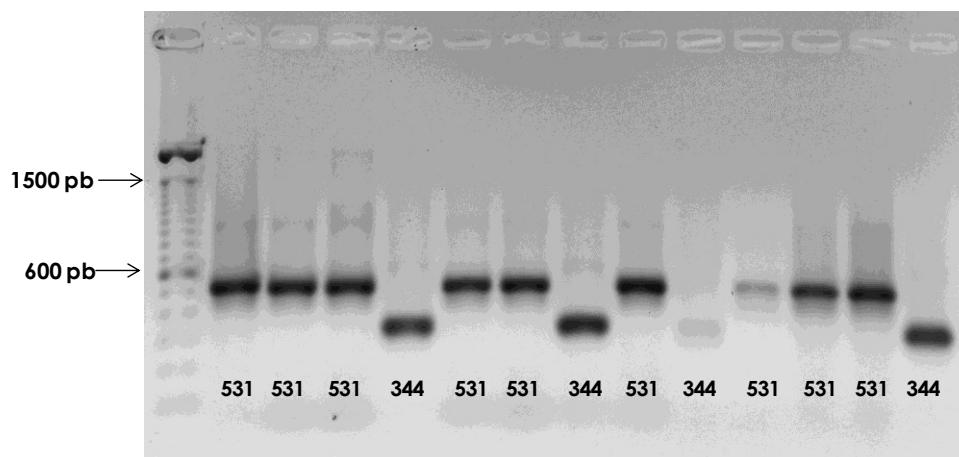
**Figura 13.** Patrones de tipificación de los sub linajes del Este Asiático. Geles de agarosa al 1.5%.

**Tabla 12.** Diversidad genética en las cepas del Linaje Principal del Este Asiático.

Aislado	SIT	LSPs Este Asiático				
		Δ RD105	Δ RD207	Δ RD181	Δ RD150	WT
Tm-071	1	Δ RD105	Δ RD207	Δ RD181	Δ RD150	WT
Tm-032	1	Δ RD105	Δ RD207	Δ RD181	Δ RD150	WT
Tm-088	1	Δ RD105	Δ RD207	Δ RD181	Δ RD150	WT
Tm-099	1	Δ RD105	Δ RD207	Δ RD181	WT	Δ RD142
Tm-111	1	Δ RD105	Δ RD207	Δ RD181	WT	Δ RD142
Tm-053	1	Δ RD105	Δ RD207	Δ RD181	WT	WT

Para los aislamientos clínicos del Linaje Principal Indo-Oceánico, se analizó la región de diferencia RD239. Se encontró que 5 cepas (35.71%) mostraron un amplicón de 344 pb y 9 (64.28%) uno de 531 pb (Figura 14).





**Figura 14.** Polimorfismos de Secuencia Larga de las cepas del Linaje Principal Indo-Oceánico. Gel de agarosa al 1.5%.

De acuerdo con estos resultados, 5 aislamientos clínicos presentan una delección en la región de diferencia RD239, la cual se considera como el marcador clásico de las cepas Indo-Oceánicas (Reed *et.al.*, 2009), por lo que solo se comprobó que 5 aislamientos clínicos (35.71%) pertenecen a este Linaje Principal siguiendo este protocolo. La genotipificación por Spoligotyping clasificó a 14 aislados clínicos como pertenecientes al Linaje Principal Indo-Oceánico, aún así, el análisis de similitud de sus espoligotipos y los separa en dos bloques. Esta diferencia se acentúa aún más con el LSP de la región de diferencia RD239. Con base en estos resultados, podemos concluir que dentro del conjunto de cepas identificadas como del Linaje Principal Indo-Oceánico por Spoligotyping, existe una amplia diversidad genética, la cual está dada por los diferentes números de SIT y por la ausencia o presencia de la delección RD239 (Figura 15). Por lo anterior, este marcador molecular clásico resultó insuficiente para designar el Linaje Principal Indo-Oceánico.

Aislado	Espoligotipo	SIT	LSP Indo-Oceánico
Tm-044		8	Δ RD239
Tm-010		19	Δ RD239
Tm-040		19	Δ RD239
Tm-075		19	Δ RD239
Tm-106		19	Δ RD239

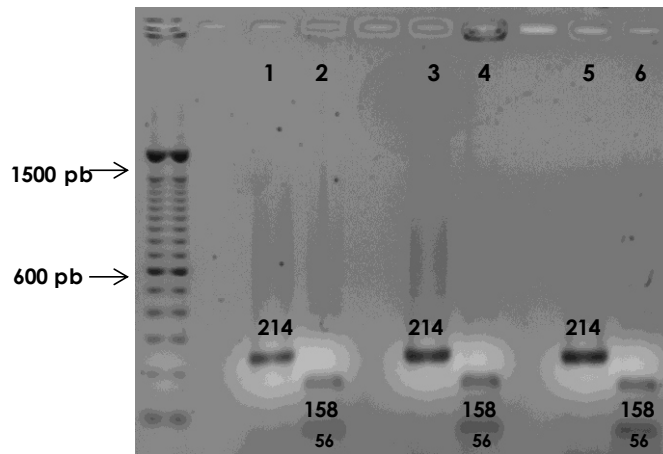
Aislado	Espoligotipo	SIT	LSP Indo-Oceánico
Tm-025		29	WT
Tm-090		46	WT
Tm-017		46	WT
Tm-028		46	WT
Tm-060		450	WT
Tm-062		450	WT
Tm-081		450	WT
Tm-103		450	WT
Tm-033		239	WT

**Figura 15.** Diversidad genética de las cepas del Linaje Principal Indo-Oceánico.

### 7.6 Confirmación de la familia LAM por RFLP

El Linaje Principal con mayor frecuencia (56 cepas, 73.68%) y con una mayor variedad de familias fue el Euro-Americano. No se realizó la confirmación de este linaje por análisis de LSPs, ya que en el momento no se contaba con los marcadores moleculares que definen a este grupo. Sin embargo, se optó por analizar el linaje LAM, una de las familias de mayor relevancia obtenidos por Spoligotyping. Para el desarrollo de este ensayo, se seleccionaron 11 aislamientos clínicos caracterizados como LAM por Spoligotyping (55%) y 9 cepas con espoligotipo huérfano y clasificadas con el genotipo RD<sup>Rio</sup> con la PCR múltiplex (Gibson *et.al.*, 2008) (45%), teniendo un total de 20 aislamientos clínicos de las 56 que conforman el Linaje Principal Euro-Americano (35.71%). Se llevó a cabo la amplificación del gen Rv3062 en todas las cepas, para posteriormente digerirlo con la enzima de restricción *Taq I*. En las 20 cepas analizadas se observó una banda de 158 pb y un amplicón de 56 pb. Se utilizaron como control negativo aislados clínicos con el genotipo *M. tuberculosis* WT y se obtuvo una banda de

214 pb (Figura 16). Con estos resultados se puede concluir que las 11 cepas identificadas como LAM por Spoligotyping y las 9 de genotipo RDRío presentan un SNP en la posición 1212 (*c>g*) en el gen Rv3062, por lo que las define como pertenecientes al linaje LAM.



**Figura 16.** Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción para la identificación de la familia LAM. Gel de agarosa al 1.5%. Carriles 1,3 y 5: digestión del gen Rv3062 en cepas con el genotipo *M. tuberculosis* WT. Carril 2: digestión del gen Rv3062 en una cepa de la familia LAM3. Carril 4: digestión del gen Rv3062 en una cepa de la familia LAM9. Carril 6: digestión del gen Rv3062 en una cepa con el genotipo RDRío.

Dentro de los 20 aislamientos clínicos definidos como LAM por RFLP, se encuentra un conjunto de 16 cepas (80%) que presentan el genotipo RDRío, siendo el sub linaje de mayor prevalencia para esta familia. El otro grupo se encuentra integrado por 4 aislamientos clínicos (20%) con el genotipo *M. tuberculosis* WT. Al contrario con lo observado con las cepas del Linaje Principal Indo-Oceánico, la delección RDRío no se correlaciona con el número de SIT. Tal es el caso del SIT 42 (figura 17), el cual se encuentra tanto en el genotipo *M. tuberculosis* WT como en el de RDRío. Se puede concluir que dentro de la familia LAM hay una gran variedad genética, la cual se encuentra en el número de SIT y en la ausencia o presencia de la delección RDRío.

Aislado	Espoligotipo	SIT	$\Delta$ RDRío
Tm-102		20	WT
Tm-051		42	WT
Tm-024		211	WT
Tm-118		211	WT

Aislado	Espoligotipo	SIT	$\Delta$ RDRío
Tm-050		Huérfano	$\Delta$ RDRío
Tm-058		Huérfano	$\Delta$ RDRío
Tm-068		Huérfano	$\Delta$ RDRío
Tm-095		Huérfano	$\Delta$ RDRío
Tm-042		Huérfano	$\Delta$ RDRío
Tm-115		Huérfano	$\Delta$ RDRío
Tm-096		Huérfano	$\Delta$ RDRío
Tm-113		1321	$\Delta$ RDRío
Tm-112		Huérfano	$\Delta$ RDRío
Tm-014		Huérfano	$\Delta$ RDRío
Tm-022		398	$\Delta$ RDRío
Tm-013		163	$\Delta$ RDRío
Tm-043		163	$\Delta$ RDRío
Tm-016		42	$\Delta$ RDRío
Tm-041		42	$\Delta$ RDRío
Tm-038		Huérfano	$\Delta$ RDRío

**Figura 17.** Diversidad genética de las cepas de la familia LAM.

### 7.7 Análisis de LSPs en las Regiones de Diferenciación RD115, RD182, RD183, RD193 y RD219

Para extender el estudio de la diversidad genética de las cepas de linaje Euro-Americano, se analizaron los LSPs en las Regiones de Diferenciación RD115, RD182, RD183, RD193 y RD219, las cuales se han reportado que se encuentran en gran parte de las cepas de este linaje principal [43]. De las 56 cepas de linaje Euro-Americano, se incluyeron las que no fueron genotipificadas como familia LAM (36, 64.28%), Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: cuatro cepas presentaron delección en RD115 (11.11%), diez en RD182 (27.78%), ninguna en RD183 (0%), doce en RD193 (33.33%) y seis en RD219 (16.67%). De los aislamientos clínicos que presentaron delección en RD115, 2 pertenecieron a la familia T1 (50%), uno a T2 (25%) y uno con espoligotipo huérfano (25%). Para el caso de RD182, cinco son de la familia H3 (50%),

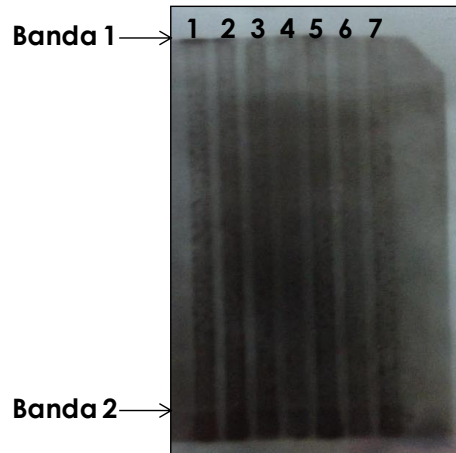
dos son H2 (20%), una es H1 (10%) y dos cepas presentaron espoligotipos huérfanos (20%). Por otro lado, con RD193 diez cepas pertenecen a la familia X1 (90.91%) y una cepa a T1 (9.09%). Para el caso de RD219, las seis cepas corresponden a la familia T1 (100%). En este estudio solo se encontró un caso en donde la cepa presenta una delección en dos regiones de diferenciación: RD115 y RD219 (2.5%). Con estos resultados se podría inferir que existe una correlación entre RD115 con la familia T (T1, T2), RD182 con la familia Harleem (H1, H2, H3), RD193 con la familia X1 y RD219 con T1. Por otro lado, se puede concluir que dentro de las cepas de linaje Euro-americano no pertenecientes a la familia LAM, también existe una gran variedad genética, la cual se correlaciona con los LSPs de las Regiones de Diferenciación (Tabla 13).

**Tabla 13.** Diversidad genética en las cepas del Linaje Principal Euro-Americano.

Aislado	SIT	Familia	LSPs Euro-Americano				
			$\Delta$ RD115	$\Delta$ RD219	$\Delta$ RD193	$\Delta$ RD182	$\Delta$ RD183
Tm-064	No aplica	Huérfano	$\Delta$ RD115	WT	WT	WT	WT
Tm-117	1232	T2	$\Delta$ RD115	WT	WT	WT	WT
Tm-048	222	T1	$\Delta$ RD115	WT	WT	WT	WT
Tm-055	53	T1	$\Delta$ RD115	$\Delta$ RD219	WT	WT	WT
Tm-057	53	T1	WT	$\Delta$ RD219	WT	WT	WT
Tm-059	53	T1	WT	$\Delta$ RD219	WT	WT	WT
Tm-110	53	T1	WT	$\Delta$ RD219	WT	WT	WT
Tm-121	53	T1	WT	$\Delta$ RD219	WT	WT	WT
Tm-131	53	T1	WT	$\Delta$ RD219	WT	WT	WT
Tm-030	53	T1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-101	217	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-046	119	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-049	119	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-070	119	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-074	119	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-092	119	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-098	119	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-105	119	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-114	119	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-127	119	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-135	119	X1	WT	WT	$\Delta$ RD193	WT	WT
Tm-097	No aplica	Huérfano	WT	WT	WT	$\Delta$ RD182	WT
Tm-132	No aplica	Huérfano	WT	WT	WT	$\Delta$ RD182	WT
Tm-093	47	H1	WT	WT	WT	$\Delta$ RD182	WT
Tm-021	2	H2	WT	WT	WT	$\Delta$ RD182	WT
Tm-120	2	H2	WT	WT	WT	$\Delta$ RD182	WT
Tm-027	764	H3	WT	WT	WT	$\Delta$ RD182	WT
Tm-134	1238	H3	WT	WT	WT	$\Delta$ RD182	WT
Tm-011	50	H3	WT	WT	WT	$\Delta$ RD182	WT
Tm-073	50	H3	WT	WT	WT	$\Delta$ RD182	WT
Tm-078	50	H3	WT	WT	WT	$\Delta$ RD182	WT
Tm-124	336	X1	WT	WT	WT	WT	WT
Tm-129	119	X1	WT	WT	WT	WT	WT
Tm-033	239	U	WT	WT	WT	WT	WT
Tm-054	No aplica	Huérfano	WT	WT	WT	WT	WT
Tm-126	No aplica	Huérfano	WT	WT	WT	WT	WT

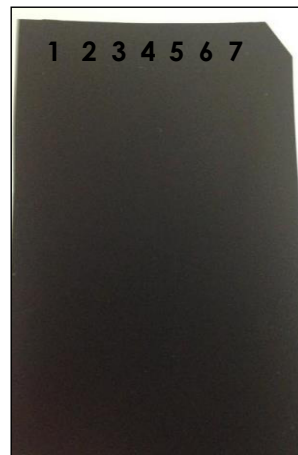
## **7.8 Western Blot contra las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv**

Considerando los mismos criterios aplicados para la selección de los aislamientos clínicos que integran el banco de DNAg, se utilizaron las muestras de suero de los pacientes con tuberculosis pulmonar activa como fuentes de anticuerpos (IgM e IgG) para determinar patrones de inmunoreactividad en Western Blot contra las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv. Para llevar a cabo este análisis, se preparó un pool de sueros con las muestras de todos los pacientes infectados con cepas del mismo linaje. Fue así como se formaron 7 grupos con base en la genotipificación por Spoligotyping: Beijing, EAI2-Manilla, U, T1, X1, LAM (genotipo RDRío) y LAM (genotipo *M. tuberculosis* WT). Se realizaron los Western-Blot, utilizando las proteínas de filtrado de cultivo de la cepa de referencia [1.5mg/mL] y el suero de los pacientes diluido a una proporción 1:100, como fuente de anticuerpos IgG e IgM en ensayos independientes. Cuando se empleó el anticuerpo secundario IgM, se logró detectar un patrón de 2 bandas, encontradas en todos los grupos analizados. No se logró precisar el peso molecular de cada una de ellas, ya que no se incluyó el marcador de peso molecular. Sin embargo, cada una de las bandas se localizó en los extremos de la placa radiográfica, por lo que se puede inferir que existe una gran diferencia en su peso molecular (Figura 18).



**Figura 18.** Western-Blot de suero de pacientes con TBP, utilizando anticuerpos secundarios de clase IgM. Carril 1: Beijing. Carril 2: EAI2-Manilla. Carril 3: U. Carril 4: T1. Carril 5: X1. Carril 6: LAM (genotipo RDRío). Carril 7: LAM (genotipo *M. tuberculosis* WT).

Por otro lado, cuando se utilizó el anticuerpo secundario IgG, no se detectó ninguna señal (Figura 19).



**Figura 19.** Western-Blot de suero de pacientes con TBP, utilizando anticuerpos secundarios de clase IgG. Carril 1: Beijing. Carril 2: EAI2-Manilla. Carril 3: U. Carril 4: T1. Carril 5: X1. Carril 6: LAM (genotipo RDRío). Carril 7: LAM (genotipo *M. tuberculosis* WT).

Lo que se esperaba encontrar en los Western-Blot eran patrones de inmunoreactividad (bandas) similares en los sueros de los pacientes con tuberculosis pulmonar activa infectados con cepas del mismo linaje, así como diferencias en los perfiles de inmunoreactividad al comparar distintos linajes de los aislamientos clínicos.

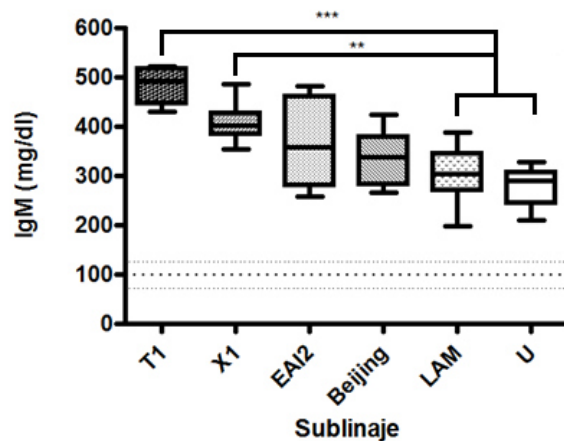


De acuerdo con estos resultados, no se encontró ningún patrón de inmunoreactividad relevante tanto en los Western-Blot con anticuerpos secundarios de la clase IgM como en los IgG. Se puede inferir que la concentración y las condiciones con las que se trabajaron los sueros no fueron las óptimas. También se podría suponer que los anticuerpos secundarios de clase IgM e IgG tienen poca sensibilidad para reconocer los anticuerpos IgM e IgG presentes en las muestras de suero. Por otro lado, es importante considerar que solo se trabajó con las proteínas de filtrado de cultivo bajo condiciones desnaturalizantes y no en su forma nativa, por lo que los sitios de reconocimiento de antígenos pudieran no haber quedado expuestos debido a algún cambio en la conformación de las proteínas durante el ensayo.

### **7.9 Cuantificación de anticuerpos totales IgM por ELISA**

A las 75 muestras de suero de los pacientes con tuberculosis pulmonar activa previamente seleccionados, se realizó la cuantificación de anticuerpos totales de la clase IgM por medio de un kit de ELISA (Abcam, Cambridge, CBE, UK). Las lecturas de densidad óptica se tomaron a una longitud de onda de 450 nm, tanto de los 75 sueros que componen el estudio como de los estándares de anticuerpo recombinante IgM incluidos en el kit. Los valores de absorbancia se graficaron para construir una curva de calibración y obtener la ecuación de la recta. De esta manera se calculó la concentración [mg/dL] de anticuerpos de clase IgM en las muestras de suero de cada paciente. Estos datos se graficaron con el programa GraphPad Prism5 (Figura 20). Se compararon los niveles séricos de los anticuerpos totales de clase IgM [mg/dL] en el suero de los pacientes con los valores normales teóricos de referencia de individuos sanos, y se formaron grupos de análisis para determinar una probable correlación entre los niveles

séricos de anticuerpos de clase IgM y el linaje de la cepa infectante en cada caso, de acuerdo a los resultados derivados del Spoligotyping (familias T1, X1, EAI2-Manilla, Beijing, LAM y U). De acuerdo con los resultados obtenidos, la concentración de anticuerpos de clase IgM se encuentra sobre los valores teóricos normales [50] en todos los casos (Figura 20). Se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de cada uno de los grupos analizados. Se encontró que existe una diferencia significativa en la concentración de anticuerpos totales de clase IgM ( $P < 0.0001$ ). Al realizar la prueba de la comparación múltiple de Dunn se observó que existe una diferencia significativa en la concentración de anticuerpos totales de clase IgM de los sueros de pacientes infectados con cepas de los linajes U/T1, LAM/T1, LAM/X1 y U/X1 (Figura 20).

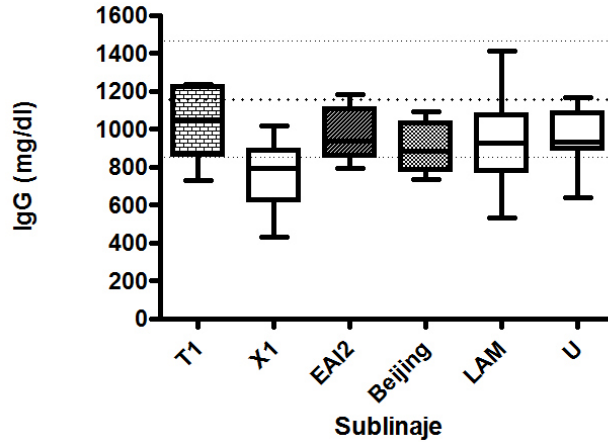


**Figura 20.** Cuantificación de anticuerpos totales de la clase IgM en sueros de pacientes con TBP infectados con cepas de *M. tuberculosis* de diferente linaje. Las líneas punteadas indican los valores normales teóricos de adultos sanos ( $99 \pm 27$  mg/dl).

Con base en estos resultados se puede concluir que los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* inducen diferencialmente una respuesta de anticuerpos de clase IgM, donde, las cepas de linaje X1 y T1 son fuertes inductores de anticuerpos de clase IgM, mientras que los linajes LAM y U son bajos.

### **7.10 Cuantificación de anticuerpos totales IgG por ELISA**

A las 75 muestras de suero de los pacientes con tuberculosis pulmonar activa previamente seleccionados, se realizó la cuantificación de anticuerpos totales de la clase IgG por medio de un kit de ELISA (Abcam, Cambridge, CBE, UK). Las lecturas de densidad óptica se tomaron a una longitud de onda de 450 nm, tanto de los 75 sueros que componen el estudio como de los estándares de anticuerpo recombinante IgG incluidos en el kit. Los valores de absorbancia se graficaron para construir una curva de calibración y obtener la ecuación de la recta. De esta manera se calculó la concentración [mg/dL] de anticuerpos de clase IgG en las muestras de suero de cada paciente. Estos datos se graficaron con el programa GraphPad Prism5 (Figura 21). Se compararon los niveles séricos de los anticuerpos totales de clase IgG [mg/dL] en el suero de los pacientes con los valores normales teóricos de referencia de individuos sanos, y se formaron grupos de análisis para determinar una probable correlación entre los niveles séricos de anticuerpos de clase IgG y el linaje de la cepa infectante en cada caso, de acuerdo a los resultados derivados del Spoligotyping (familias T1, X1, EAI2-Manilla, Beijing, LAM y U). De acuerdo con los resultados obtenidos, la concentración de anticuerpos de clase IgG de los pacientes con tuberculosis pulmonar involucrados en el estudio, se encuentra dentro de los valores teóricos normales [50]. Se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de cada uno de los grupos analizados, y se encontró que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de anticuerpos totales de clase IgG ( $P=0.0913$ ) (Figura 21).



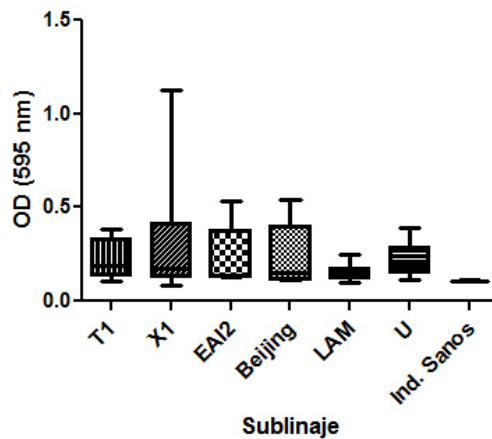
**Figura 21.** Cuantificación de anticuerpos totales de la clase IgG en sueros de pacientes con TBP infectados con cepas de *M. tuberculosis* de diferente linaje. Las líneas punteadas indican los valores normales teóricos de individuos sanos ( $1158 \pm 305$  mg/dl).

Tomando en cuenta las gráficas de las figuras 20 y 21, se puede inferir que los pacientes con tuberculosis pulmonar en este estudio se encuentran en una fase temprana de la enfermedad, ya que presentan una concentración de anticuerpos IgM sobre los niveles de los valores normales de individuos sanos, mientras que el nivel de anticuerpos IgG se encuentra dentro del rango de la concentración que refieren sujetos no infectados. Esto coincide con el tiempo en el cual se tomaron las muestras de suero y expectoración, es decir, cuando los pacientes aún no recibían tratamiento farmacológico o este no excedía los 8 días. Con base en estos resultados se puede concluir que los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* no inducen diferencialmente una respuesta de anticuerpos de clase IgG en esta fase de la infección, quedando abierta la posibilidad de que en etapas más avanzadas pudieran encontrarse resultados diferentes a los presentados.

### 7.11 Inmunoreactividad de anticuerpos IgM contra las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv

Se utilizaron las muestras de suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa como fuente de anticuerpos IgM previamente seleccionados, para encontrar perfiles de

inmunoreactividad dirigida de manera específica contra las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, por medio de un ELISA directo. Las lecturas de densidad óptica se tomaron a una longitud de onda de 450 nm, tanto de los 75 sueros que componen el estudio como de muestras de individuos sanos (N=3). Los valores de absorbancia se graficaron con el programa GraphPad Prism5 (Figura 22). Se comparó la reactividad de los anticuerpos de clase IgM en el suero de los pacientes infectados con cepas de los linajes T1 (N=9), X1 (N=12), EAI2-Manilla (N=5), Beijing (N=6), LAM (N=20) y U (N=9), así como los valores obtenidos de individuos sanos (N=3). Se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de cada uno de los grupos analizados. No se encontraron diferencias significativas en la inmunoreactividad entre las muestras de suero de los pacientes infectados con cepas de diferentes linajes, ni entre estos grupos con la reactividad que presentaron las muestras de suero de los individuos sanos (P=0.0896) (Figura 22).



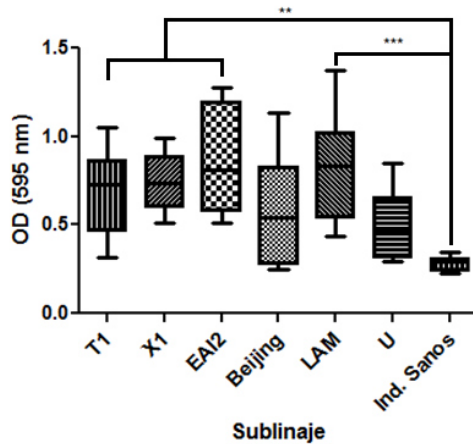
**Figura 22.** Inmunoreactividad de clase IgM contra las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv.

De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que no existe una diferencia significativa en los perfiles de inmunoreactividad de clase IgM presentes en los sueros

de pacientes infectados con cepas de diferente linaje, contra proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, por lo que se descarta que los altos niveles de anticuerpos de clase IgM detectados y diferencialmente inducidos por algunos linajes (Figura 20) vayan dirigidos contra antígenos de naturaleza proteica de *M. tuberculosis*.

### **7.12 Inmunoreactividad de anticuerpos IgG contra las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv**

Se utilizaron las muestras de suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa como fuente de anticuerpos IgG previamente seleccionados, para encontrar perfiles de inmunoreactividad dirigida de manera específica contra las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, por medio de un ELISA directo. Las lecturas de densidad óptica se tomaron a una longitud de onda de 450 nm, tanto de los 75 sueros que componen el estudio como de muestras de individuos sanos (N=3). Los valores de absorbancia se graficaron con el programa GraphPad Prism5 (Figura 23). Se comparó la reactividad de los anticuerpos de clase IgG en el suero de los pacientes infectados con cepas de los linajes T1 (N=9), X1 (N=12), EAI2-Manilla (N=5), Beijing (N=6), LAM (N=20) y U (N=9), así como los valores obtenidos de individuos sanos (N=3). Se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de cada uno de los grupos analizados. No se encontraron diferencias significativas en la inmunoreactividad entre las muestras de suero de los pacientes infectados con cepas de diferentes linajes, pero si se encontró una diferencia significativa entre los pacientes y los individuos sanos (P=0.0003) Al realizar la prueba de la comparación múltiple de Dunn se observó que existe una diferencia significativa en la inmunoreactividad de los anticuerpos de clase IgG de los sueros de pacientes infectados con cepas del linaje LAM, X1 y T1 comparándolos con los individuos sanos. (Figura 23).

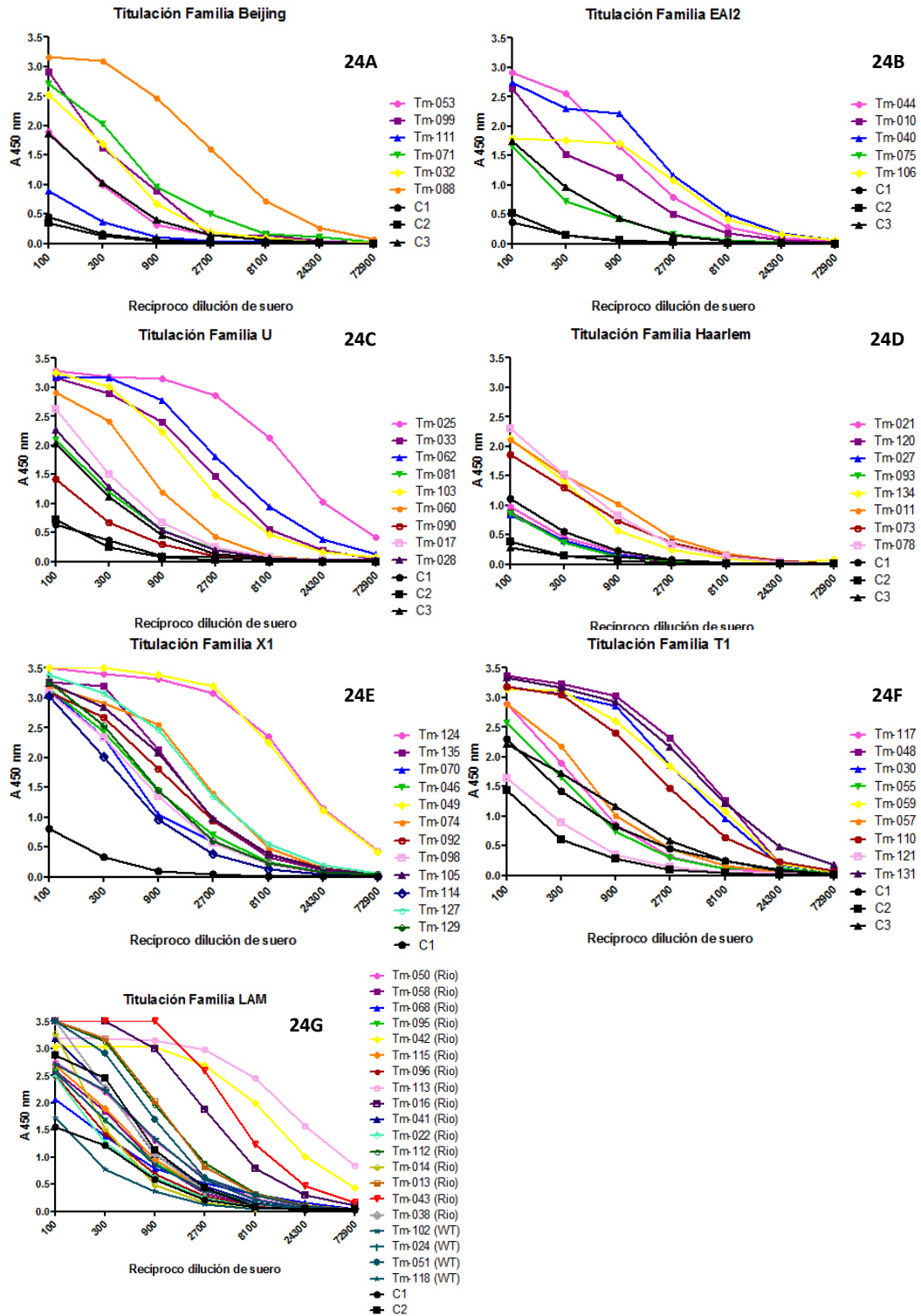


**Figura 23.** Inmunoreactividad de clase IgG contra las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv.

De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que no existe una diferencia significativa en los perfiles de inmunoreactividad de clase IgG presentes en los sueros de pacientes infectados con cepas de diferente linaje, contra proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv. A diferencia de lo observado con la clase IgM (Figura 22), los anticuerpos IgG si van dirigidos de forma específica contra antígenos de naturaleza proteica de *M. tuberculosis*.

### 7.13 Título de anticuerpos de clase IgG

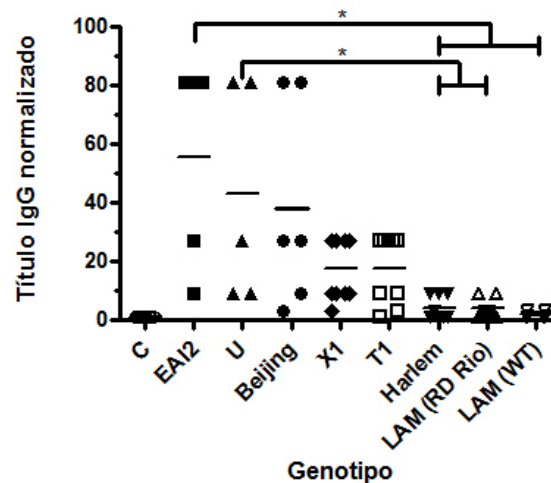
Se utilizaron las 75 muestras de suero de los pacientes con TBP activa para llevar a cabo la determinación del título de anticuerpos de clase IgG dirigido de manera específica contra *M. tuberculosis*, por medio de un ELISA directo. Las lecturas de densidad óptica se tomaron a una longitud de onda de 450 nm, tanto de los 75 sueros que componen el estudio como de muestras de individuos sanos. Los valores de absorbancia (450 nm) se graficaron con el programa GraphPad Prism5 (Figura 24).



**Figura 24.** Titulación de anticuerpos de clase IgG contra las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv. **24A:** Familia Beijing. **24B:** Familia EAI2. **24C:** Familia U. **24D:** Familia Haarlem. **24E:** FamiliaX1. **24F:** Familia T1. **24G:** Familia LAM.



Se comparó la reactividad de los anticuerpos de clase IgG en el suero de los pacientes infectados con cepas de los linajes T1, X1, EAI2-Manilla, Beijing, LAM y U. En la Figura 25 se muestra el título normalizado (título obtenido de cada uno de los pacientes/título obtenido empleando como control interensayo el suero de individuos sanos). Se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de cada uno de los grupos analizados. Se encontró que existe una diferencia significativa en el título normalizado de anticuerpos de clase IgG ( $P < 0.0001$ ) entre los diferentes grupos. Al realizar la prueba de la comparación múltiple de Dunn se observó que existe una diferencia significativa en el título normalizado de anticuerpos de clase IgG de los sueros de pacientes infectados con cepas de los linajes EAI2/Harlem, EAI2/LAM (WT), EAI2/LAM (RD<sup>Rio</sup>), U/Harlem y U/LAM (RD<sup>Rio</sup>) (Figura 25).



**Figura 25.** Incremento en el título de anticuerpos de clase IgG contra las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv normalizados con los sueros control.

De acuerdo con estos resultados, podemos concluir que existe una diferencia significativa en el título de anticuerpos de clase IgG presentes en los sueros de pacientes infectados con cepas de linaje Indo-Oceánico y Euro-Americano, contra proteínas de

filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv. Con base en esto, se puede sugerir que esta diferencia podría deberse a que los individuos del Noreste de México no han estado en contacto con las cepas de linaje Indo-Oceánico, a diferencia de las cepas de linaje Euro-Americano, las cuales tienen una mayor prevalencia en esa región, por lo que, la respuesta humoral contra los genotipos circulantes estaría atenuada (adaptación), y en cambio es exacerbada contra los genotipos de baja prevalencia.

## Capítulo 8

### DISCUSIÓN

Es evidente que existe una diversidad genética en los diferentes linajes y sub linajes de *M. tuberculosis*. Esta variabilidad en su genoma denota una gran importancia, ya que se correlaciona con el grado de patogenicidad, distribución geográfica, susceptibilidad a fármacos, epidemiología, respuesta inmune celular y humoral.

En este estudio se analizó la diversidad genética de un conjunto de 76 cepas, las cuales infectaron a individuos del Noreste de México (Matamoros, Tamaulipas). Para ello se utilizaron diferentes técnicas de genotipificación.

Se utilizó el método de las deleciones genómicas, desarrollado por Huard *et.al.*, para poder definir a las cepas utilizadas en el estudio como pertenecientes a la especie *M. tuberculosis*. Como resultado, todos los aislados clínicos corresponden a esa especie del complejo *M. tuberculosis*. Sin embargo, contrario a lo esperado, se obtuvieron cuatro genotipos diferentes: *M. tuberculosis* WT,  $\Delta$ IS 1561',  $\Delta$ cfp32 y  $\Delta$ RD7.

Se han reportado casos en donde cepas de *M. tuberculosis* no amplifican para la región de diferenciación RD7. Huard *et.al.*, mencionan que en su trabajo la cepa de *M. tuberculosis* “ancestral” CA-74 falló en la amplificación de este loci, resultando en el perfil 1234•678 [29]. En este aislado clínico se encontró una deleción de 2,964 pb ubicada dentro del locus RD7, afectando el marco de lectura desde Rv1970 hasta Rv1973 [29]. Por lo anterior, el aislado clínico que no amplificó en nuestro estudio para este loci podría presentar esa deleción genómica.

Nakajima *et.al.*, encontraron dos aislamientos clínicos, M200 y S2247, los cuales fallaron en la amplificación de *cfp32*, resultando en el perfil 1•345678 [51]. Huard *et.al.*, reportaron que existía un SNP en esta secuencia, en la posición 311 (*c>g*), por lo que Nakajima y colaboradores utilizaron los iniciadores alternativos 3'cfp32F: 5' CGAATCATTGGCACGTCTACTTTG 3' y 3'cfp32R: 5' GTGGCACCGGCGGCACCGCACACCT 3' para corroborar la presencia de ese SNP [44]. Con la cepa S2247 se obtuvo el producto de amplificación esperado (372 pb). Sin embargo, el aislamiento clínico M200 no generó esa banda. Nakajima *et.al.*, infirieron que podría tratarse de una delección de mayor tamaño en la región genómica blanco. Por lo anterior, la cepa que no amplificó en nuestro estudio para este loci podría presentar alguna de estas alteraciones genómicas.

La delección en IS 1561' es una de las características del genotipo RD<sup>Rio</sup>, el cual ya ha sido caracterizado [47].

Dalla *et.al.*, realizaron un estudio en donde encontraron que existe una correlación entre el genotipo RD<sup>Rio</sup> y la multidrogo resistencia (MDR) de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes en Rio Grande do Sul, Brasil [52]. A partir de una colección de 237 aislamientos clínicos, se encontró que este genotipo fue responsable de aproximadamente la mitad de los casos de MDR. No encontraron diferencias en cuanto a características clínicas, radiológicas o de laboratorio. Sin embargo, observaron que existe una diferencia significativa en cuanto a los casos de MDR asociados con el genotipo RD<sup>Rio</sup> (P= 0.0015) [52]. Este hallazgo resalta la importancia de los diferentes genotipos de las cepas infectantes y las diferentes manifestaciones de la TB.

La delección RD<sup>Rio</sup> de 26 Kb, involucra la eliminación de 8 genes (PPE55, Rv3548, IS 1561', PPE56, Rv3351c, Rv3352c, Rv3353c y Rv3354), y afecta de manera parcial

otros dos (Rv3346c y Rv3355c). Se han reportado en una serie de trabajos la importancia de estas deleciones genómicas y su impacto en la severidad de la tuberculosis.

Singh *et.al.*, mencionan que la proteína PPE55 es considerada como un antígeno potencial de la respuesta inmune del huésped [53]. En su trabajo, una de las proteínas que fue reconocida por los anticuerpos suscitados durante la infección sub clínica de TB en cobayas es la proteína de 309 kDa PPE55. Realizaron estudios de hibridación genómica, encontrando evidencia que el gen que codifica para PPE55 es específico para el complejo *M. tuberculosis* y estuvo presente en la mayoría de los aislamientos clínicos que se probaron. Además, detectaron anticuerpos para el fragmento C terminal de 100 kDa de PPE55 (PPE-C) en individuos VIH (-), TB (+) y VIH (+), TB (+), pero no en los controles sanos, lo que sugiere que la expresión *in vivo* de la proteína PPE55 se correlaciona con una infección activa por *M. tuberculosis*. También se detectaron anticuerpos contra PPE-C en sueros obtenidos en una etapa previa a las manifestaciones clínicas de TB en pacientes HIV (+), TB (+), lo que apoya la evidencia de que la proteína es expresada tempranamente durante la infección. Con base en lo anterior, los autores sugieren que PPE55 es altamente inmunogénica, por lo que podría ser usada para diferenciar entre una TB latente y una TB sub clínica.

Pavlicek *et.al.*, caracterizaron la mutación de Rv3351c [54]. Propusieron que el producto genómico de ese gen podría interactuar de manera exclusiva con los neumocitos. Encontraron que en las cepas de *M. tuberculosis* con una deleción en Rv3351c, la muerte de los neumocitos disminuye de forma significativa, al compararla con micobacterias control sin dicha mutación, en modelos animales de ratón y conejo [54]. Observaron que el genotipo RDRío, no produce este fenotipo en neumocitos tipo

II, en su lugar, se muestra una virulencia reducida comparada con una infección con mutantes de Rv3351 en un modelo murino. Las cepas con delección en Rv3351c se replicaron de forma más lenta y se diseminaron con una menor eficiencia en ratones, comparado con el control. Esto es lo opuesto de lo que se ha reportado con las cepas RDRío en humanos.

Danelishvili *et.al.*, realizaron un estudio enfocado a la determinación de la virulencia de *M. tuberculosis* en la modulación de la apoptosis, y encontraron que una cepa de *M. tuberculosis* con el gen Rv3354 no funcional resultó imposibilitada para suprimir el proceso de apoptosis [55]. En ese trabajo se determinó que el gen Rv3354 codifica una proteína quinasa, la cual es secretada dentro de las células fagocíticas y es indispensable para la virulencia de *M. tuberculosis*. El efector de Rv3354 tiene como blanco el dominio metalo-proteasa (JAMM), ubicado dentro de la sub unidad 5 del señalosoma COP9 (CSN5), lo que resulta en la supresión de la apoptosis y la desestabilización de la función CSN y la actividad enzimática del anillo cullin ubiquitina E3 reguladora. Las observaciones realizadas por este grupo de investigación sugieren que la alteración de la actividad de metalo-proteasa de CSN por parte de Rv3354 probablemente evita la proteólisis dependiente de ubiquitina de proteínas secretadas de *M. tuberculosis*.

En nuestro estudio, el genotipo RD<sup>Río</sup> se encontró en segundo lugar en cuanto a prevalencia (16/76, 21.05%). En México no se han realizado estudios en donde se aporten datos de su prevalencia. Gibson *et.al.*, reportan como países con una mayor frecuencia de este linaje en su estudio: Brasil (Minas Gerais) (39/105, 37%), Brasil (Río de Janeiro) (93/314, 30%), Países Bajos (22/83, 27%) y Sudáfrica (37/150, 25%) [43]. El número de aislados clínicos no es representativo de cada país. Considerando estos

datos, es necesario realizar estudios epidemiológicos en donde se rastre este genotipo, ya que este presenta una gran prevalencia en México.

Al realizar la genotipificación por Spoligotyping, las familias obtenidas con una mayor prevalencia fueron las siguientes: X1 (SIT 19, 11/76, 14.47%), T1 (SIT 53, 7/76, 9.21%), Beijing (SIT 1, 6/76, 7.89%). Bocanegra *et.al.*, realizaron un estudio en Reynosa, Tamaulipas; obteniendo los siguientes resultados: LAM9 (14/72, 19.44%), T1 (13/72, 18.06%) y Haarlem3 (9/72, 12.5%) [56]. Por otro lado, Nava y colaboradores hicieron un estudio a partir de aislamientos clínicos de pacientes de Acapulco, Guerrero, y reportaron como familias con mayor frecuencia las siguientes: EAI2-Manila (SIT 19, 70/267, 26.2%), EAI-3 (SIT 8, 31/267, 11.6%) y T1 (SIT 53, 22/267, 8.2%) [57].

Con la confirmación de los LSPs, se determinó la frecuencia de los linajes principales en nuestro estudio. El linaje principal Euro-Americano fue el de mayor prevalencia (56/76, 73.68%), seguido por el Indo-Oceánico (14/76, 18.42%) y finalmente el del Este-Asiático (6/76, 7.89%). Gagneux *et.al.*, realizaron un estudio con 875 cepas de *M. tuberculosis* de 80 países, de las cuales 50 correspondieron a México. Reportaron 47 cepas (94%) de linaje Euro-Americano, 2 (4%) Indo-Oceánicas y 1 (2%) del Este Asiático [46].

Se realizó un análisis de LSPs en las 6 cepas de la familia Beijing para las RD105, RD207, RD181, RD150 y RD142. Las deleciones en RD150 y RD142 permitieron subdividir a la familia Beijing en 3 grupos distintos. Además de las evidencias que reportan varios autores sobre la droga resistencia de este linaje, la deleción en RD150 y RD142 adquiere gran relevancia. De acuerdo con el trabajo de Kong y colaboradores, estos genotipos se encuentran relacionados con la presencia de tuberculosis extrapulmonar [35].

Por medio de la genotipificación por Spoligotyping se asignaron 14 cepas como pertenecientes al linaje principal Indo-Oceánico. Se analizó el LSP de RD239, el cuál es considerado como un marcador molecular clásico de este linaje. Sin embargo, solo 5 cepas (35%) presentaron una delección en ese loci, por lo que fue insuficiente para la asignación del linaje Indo-Oceánico. No hay reportes de otra Región de Diferenciación que pueda definir este linaje principal.

Se analizaron los LSPs de las regiones RD115, RD182, RD183, RD193 y RD219 en las 40 cepas pertenecientes al linaje principal Euro-Americano/no LAM. En nuestro trabajo, RD 193 obtuvo una mayor prevalencia (12, 30%), seguido de RD182 (10, 25%), RD219 (6, 15%), RD115 (4, 10%) y RD183 (0, 0%). Gagneux *et.al.*, realizaron un estudio con 32 cepas de *M. tuberculosis*. A diferencia de lo obtenido en este estudio, RD183 fue el sub linaje con una mayor prevalencia (8, 25%), seguido por RD182 (7, 21.88%), RD115 (6, 18.75%), RD219 (5, 18.62%) y RD193 (1, 3.12%) [46].

En la primera parte de nuestro estudio se determinó la diversidad genética de los aislados clínicos. Lyashchenko *et.al.*, caracterizaron la respuesta inmune humoral de los sueros de individuos enfermos de tuberculosis pulmonar por medio de ELISAs [19]. Por su parte, Beck y colaboradores llegaron a la misma conclusión con ensayos de Western Blot [21]. Sin embargo, ambos grupos de trabajo no realizaron una genotipificación previa de las cepas de *M. tuberculosis*. La siguiente fase de nuestro trabajo consistió en realizar ensayos de Western-Blot y ELISAs para evaluar el impacto de la diversidad genética en patrones y perfiles de la respuesta inmune humoral respectivamente.

Se realizaron ensayos de Western-Blot con muestras de suero de pacientes con tuberculosis pulmonar como fuentes de anticuerpos de clase IgM e IgG. Cuando se utilizó el anticuerpo secundario IgM, solo se pudieron visualizar dos bandas de diferente



peso molecular como patrón de inmunoreactividad en todos los pool de sueros. Este resultado podría estar relacionado con la falta de especificidad de los anticuerpos de clase IgM contra las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 22). Sin embargo, es necesario repetir el ensayo con suero de individuos sanos, para comprobar la presencia de estas 2 bandas en todos los pool de sueros (pacientes e individuos sanos).

Cuando se utilizó el anticuerpo secundario IgG en los ensayos de Western-Blot, no se detectó la presencia de ninguna banda. A diferencia de lo reportado por Beck y colaboradores, no se observó ningún patrón de inmunoreactividad. Las muestras de suero con las que trabajaron fueron tomadas de pacientes antes del tratamiento farmacológico, así como después de seis meses de la administración con antifímicos. Sin embargo, la detección de los patrones de inmunoreactividad no cambió de manera cualitativa [21]. Los ensayos de inmunoreactividad de anticuerpos de clase IgG demuestran que estos reaccionaron de manera específica contra las proteínas de filtrado de cultivo de la cepa de referencia, por lo que se descarta la falta de especificidad en la obtención de estos resultados. Las condiciones con las que se realizaron los Western-Blot no fueron las óptimas para la detección de patrones de inmunoreactividad.

Cuando se realizó el conteo de anticuerpos totales de clase IgM, se encontró que las cepas de *M. tuberculosis* inducen diferencialmente una respuesta de anticuerpos de esta clase. Con base en estos resultados se encontró que la respuesta humoral se encuentra asociada con el genotipo de la cepa infectante, siendo los sublinajes X1 y T1 fuertes inductores de anticuerpos de clase IgM, mientras que los sublinajes LAM y U son bajos.

Con base en los resultados obtenidos de la inmunoreactividad de los anticuerpos contra las proteínas de filtrado de cultivo de la cepa de referencia (Figura 23), se realizó el título de anticuerpos de clase IgG. Los valores obtenidos se normalizaron con respecto a los controles de individuos sanos. Se encontró que existe un perfil de inmunoreactividad, el cual podría correlacionarse con la prevalencia de las cepas infectantes (EAI2/Harleem, EAI2/LAM). Gomes *et.al.*, argumentan que la baja frecuencia de la cepa MtB ancestral en Brasil y Mozambique tiene un impacto en la virulencia de esta [30].

## Capítulo 9

### CONCLUSIÓN

La hipótesis planteada en este trabajo “los aislamientos clínicos que pertenecen a un mismo sublinaje de *M. tuberculosis* generan perfiles de inmuno-reactividad similares en pacientes con tuberculosis pulmonar activa” se conserva. La diversidad genética de las cepas de *M. tuberculosis* tiene un impacto en el perfil de la respuesta inmune humoral, el cual se correlaciona con el linaje de la cepa infectante y su prevalencia en una determinada zona geográfica.

## Capítulo 10

### REFERENCIAS

1. WHO. *Global Tuberculosis Report 2015*. World Health Organization, 2015.
2. SECRETARÍA DE SALUD. Anuarios de Morbilidad. Dirección General de Epidemiología. 2014.
3. SECRETARIA DE SALUD. Boletín epidemiológico No 45. Dirección General de Epidemiología. 2014.
4. BROSCHE, Roland, *et.al.* A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proceedings of the national academy of Sciences, 2002, vol. 99, no 6, p. 3684-3689.
5. FROTHINGHAM, Richard; HILLS, Harold G.; WILSON, Kenneth H. Extensive DNA sequence conservation throughout the Mycobacterium tuberculosis complex. Journal of clinical microbiology, 1994, vol. 32, no 7, p. 1639-1643.
6. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y vía técnica. Parte 1 Baciloscopía. Organización Panamericana de la Salud. 2008.
7. MEHTA, Parmod K., *et.al.* Comparison of in vitro models for the study of Mycobacterium tuberculosis invasion and intracellular replication. Infection and immunity, 1996, vol. 64, no 7, p. 2673-2679.
8. BRENNAN, Patrick J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis, 2003, vol. 83, no 1, p. 91-97.
9. EHRT, Sabine; RHEE, Kyu. Mycobacterium tuberculosis metabolism and host interaction: mysteries and paradoxes. En Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its Interaction with the Host Organism. Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 163-188.
10. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y vía técnica. Parte 2 Cultivo. Organización Panamericana de la Salud. 2008.
11. COLE, ST, *et.al.* Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature, 1998, vol. 393, no 6685, p. 537-544.
12. KAUFMANN, Stefan HE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? Nature Reviews Immunology, 2001, vol. 1, no 1, p. 20-30.
13. EDWARDS, D.; KIRKPATRICK, C. H. The immunology of mycobacterial diseases. The American review of respiratory disease, 1986, vol. 134, no 5, p. 1062-1071.
14. MANABE, Yukari C.; BISHAI, William R. Latent Mycobacterium tuberculosis-persistence, patience, and winning by waiting. Nature medicine, 2000, vol. 6, no 12, p. 1327-1329.
15. KAUFMANN, Stefan HE. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? Nature medicine, 2000, vol. 6, no 9, p. 955-960.

16. MARCHI, A. M., *et.al.* Evaluation of methods for detection and identification of *Mycobacterium* species in patients suspected of having pulmonary tuberculosis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008, vol. 39, no 4, p. 613-618.
17. PALMA-NICOLÁS, José Prisco; BOCANEGRA-GARCÍA, Virgilio. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Archivos de Bronconeumología*, 2007, vol. 43, no 4, p. 225-232.
18. INDRE. Aprovechamientos autorizados al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Baez”. 2014.
19. LYASHCHENKO, Konstantin, *et.al.* Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infection and Immunity*, 1998, vol. 66, no 8, p. 3936-3940.
20. WILKINS, E. G. L. The serodiagnosis of tuberculosis. *Clinical tuberculosis*. Chapman and Hall Medical, London, United Kingdom, 1994, p. 367-380.
21. BECK, S. T., *et.al.* Humoral response to low molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. *Brazilian journal of medical and biological research*, 2005, vol. 38, no 4, p. 587-596.
22. COLLINS, D. M.; DE LISLE, G. W. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of general microbiology*, 1984, vol. 130, no 4, p. 1019-1021.
23. VAN EMBDEN, J. D., *et.al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of clinical microbiology*, 1993, vol. 31, no 2, p. 406-409.
24. MAZARS, Edith, *et.al.* High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the national academy of Sciences*, 2001, vol. 98, no 4, p. 1901-1906.
25. HERMANS, P. W., *et.al.* Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and immunity*, 1991, vol. 59, no 8, p. 2695-2705.
26. KAMERBEEK, Judith, *et.al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of clinical microbiology*, 1997, vol. 35, no 4, p. 907-914.
27. GROENEN, Peter, *et.al.* Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular microbiology*, 1993, vol. 10, no 5, p. 1057-1065.
28. MOSTOWY, Serge, *et.al.* Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of infectious Diseases*, 2002, vol. 186, no 1, p. 74-80.
29. HUARD, Richard C., *et.al.* Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Bacteriology*, 2006, vol. 188, no 12, p. 4271-4287.
30. HESSELING, A. C., *et.al.* *Mycobacterium tuberculosis* genotype is associated with disease phenotype in children. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2010, vol. 14, no 10, p. 1252-1258.
31. GOMES, Lia Lima, *et.al.* Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Brazil and Mozambique and relation with infectivity and induction of necrosis in THP-1 cells. *Tuberculosis*, 2015.

32. MILLET, Julie, *et.al.* A Systematic Follow-Up of Mycobacterium tuberculosis Drug-Resistance and Associated Genotypic Lineages in the French Departments of the Americas over a Seventeen-Year Period. *BioMed research international*, 2014, vol. 2014.
33. CHATTERJEE, Anirvan, *et.al.* Strains of Mycobacterium tuberculosis from western Maharashtra, India, exhibit a high degree of diversity and strain-specific associations with drug resistance, cavitory disease, and treatment failure. *Journal of clinical microbiology*, 2010, vol. 48, no 10, p. 3593-3599.
34. ANDERSON, J., *et.al.* Sublineages of lineage 4 (Euro-American) Mycobacterium tuberculosis differ in genotypic clustering. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2013, vol. 17, no 7, p. 885-891.
35. KONG, Y., *et.al.* Population-based study of deletions in five different genomic regions of Mycobacterium tuberculosis and possible clinical relevance of the deletions. *Journal of clinical microbiology*, 2006, vol. 44, no 11, p. 3940-3946.
36. KATO-MAEDA, Midori, *et.al.* Beijing sublineages of Mycobacterium tuberculosis differ in pathogenicity in the guinea pig. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2012, vol. 19, no 8, p. 1227-1237.
37. NAHID, Payam, *et.al.* Influence of M. tuberculosis lineage variability within a clinical trial for pulmonary tuberculosis. 2010.
38. PHEIFFER, Carmen, *et.al.* Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Microbiology*, 2005, vol. 151, no 4, p. 1139-1150.1
39. LOPEZ, B., *et.al.* A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. *Clinical & Experimental Immunology*, 2003, vol. 133, no 1, p. 30-37.
40. A LA NORMA OFICIAL, SSA Modificación. Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. *México, DF: Diario Oficial de la Federación*, 2008, vol. 24.
41. SECRETARIA DE SALUD. Manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen Baciloscópico. 2003.
42. INDRE-SAGAR. Manual de Procedimientos de Laboratorio No. 18 (Tuberculosis). 1996.
43. GIBSON, Andrea L., *et.al.* Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean Mycobacterium tuberculosis spoligotype family. *Journal of clinical microbiology*, 2008, vol. 46, no 4, p. 1259-1267. Reed
44. REED, Michael B., *et.al.* Major Mycobacterium tuberculosis lineages associate with patient country of origin. *Journal of clinical microbiology*, 2009, vol. 47, no 4, p. 1119-1128.
45. MOKROUSOV, Igor; VYAZOVAYA, Anna; NARVSKAYA, Olga. Mycobacterium tuberculosis Latin American-Mediterranean family and its sublineages in the light of robust evolutionary markers. *Journal of bacteriology*, 2014, vol. 196, no 10, p. 1833-1841.
46. GAGNEUX, Sebastien. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, vol. 367, no 1590, p. 850-859.

47. LAZZARINI, Luiz Claudio Oliveira, *et.al.* Discovery of a novel Mycobacterium tuberculosis lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical microbiology*, 2007, vol. 45, no 12, p. 3891-3902.
48. Spol DB4 database, [http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd\\_myco.html](http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html)
49. RINDI, Laura; LARI, Nicoletta; GARZELLI, Carlo. Large Sequence Polymorphisms of the Euro-American lineage of Mycobacterium tuberculosis: a phylogenetic reconstruction and evidence for convergent evolution in the DR locus. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012, vol. 12, no 7, p. 1551-1557.
50. STIEHM, E. Richard; FUDENBERG, H. Hugh. Serum levels of immune globulins in health and disease: a survey. *Pediatrics*, 1966, vol. 37, no 5, p. 715-727.
51. NAKAJIMA, Chie, *et.al.* Identification of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Bangladesh by a species distinguishable multiplex PCR. *BMC infectious diseases*, 2010, vol. 10, no 1, p. 118.
52. DALLA COSTA, Elis Regina, *et.al.* Mycobacterium tuberculosis of the RDRio genotype is the predominant cause of tuberculosis and associated with multidrug resistance in Porto Alegre City, South Brazil. *Journal of clinical microbiology*, 2013, vol. 51, no 4, p. 1071-1077.
53. SINGH, Krishna K., *et.al.* Immunogenicity of the Mycobacterium tuberculosis PPE55 (Rv3347c) protein during incipient and clinical tuberculosis. *Infection and immunity*, 2005, vol. 73, no 8, p. 5004-5014.
54. PAVLICEK, Rebecca Lou. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis Rv3351c mutant. 2011.
55. DANELISHVILI, Lia, *et.al.* Mycobacterium tuberculosis alters the metalloprotease activity of the COP9 signalosome. *MBio*, 2014, vol. 5, no 4, p. e01278-14.
56. BOCANEGRA-GARCÍA, Virgilio, *et.al.* Molecular Assessment, Drug-Resistant Profile, and Spacer Oligonucleotide Typing (Spoligotyping) of Mycobacterium tuberculosis Strains From Tamaulipas, México. *Journal of clinical laboratory analysis*, 2014, vol. 28, no 2, p. 97-103.
57. NAVA-AGUILERA, Elizabeth, *et.al.* Clustering of Mycobacterium tuberculosis cases in Acapulco: Spoligotyping and risk factors. *Clinical and Developmental Immunology*, 2010, vol. 2011.