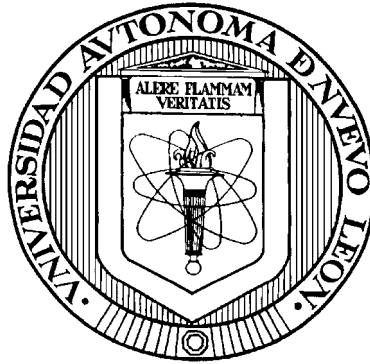


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*  
AISLADAS DE PACIENTES DEL ÁREA METROPOLITANA  
DE MONTERREY ATENDIDOS EN EL INSTITUTO  
MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**Por:**

**Q.B.P. Katia Peñuelas Urquides**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Enero 2008**

**GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*  
AISLADAS DE PACIENTES DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY  
ATENDIDOS EN EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**  
Director Interno de Tesis



---

**DR. SALVADOR LUIS SAID y FERNÁNDEZ**  
Director Externo de Tesis



---

**DR. LUCIO VERA CABRERA**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis*  
AISLADAS DE PACIENTES DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY  
ATENDIDOS EN EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**Presentado por:**

**Q.B.P. Katia Peñuelas Urquides**

El presente trabajo se realizó principalmente en los Laboratorios de Biología Celular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y de Micobacteriología de la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Además, parte de las investigaciones se realizaron en la Unidad Multidisciplinaria de Investigación en Salud de Zacatecas, IMSS y en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario “José Eleuterio González”, UANL.

Fungieron como Director interno la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez, como Director externo el Dr. Salvador Luis Said y Fernández, como Co-Director el Dr. Lucio Vera Cabrera y como colaboradores la M.C. Pola Becerril Montes y el Dr. José Antonio Enciso Moreno.

## RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Presenta: Q.B.P. Katia Peñuetas Urquides.

Título del Estudio: GENOTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* AISLADAS DE PACIENTES DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY ATENDIDOS EN EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

**Introducción:** La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En 1993 la OMS declaró a la TB como un problema reemergente, al registrarse ocho millones de casos nuevos anuales y dos y medio millones de muertes. Actualmente la genotipificación del agente causal nos permite conocer la relación epidemiológica entre cepas aisladas de pacientes con TB. Los datos obtenidos podrán utilizarse dentro del programa de prevención y control de la TB para mejorar la aplicación de recursos y a futuro, al reconocer las fuentes y vías de transmisión, un abatimiento en la aparición de casos nuevos de TB.

**Objetivo general:** Conocer la relación epidemiológica entre cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes del área metropolitana de Monterrey atendidos en el Instituto Mexicano del Seguro Social con base en su genotipo.

**Metodología:** Se analizó el polimorfismo de 120 cepas de *M. tuberculosis* con base en el análisis molecular de los siguientes elementos genéticos: regiones espaciadoras del locus DR (*spoligotyping*), elemento IS6110 en fragmentos generados por digestión enzimática específica (RFLP- IS6110), y unidades repetidas interdispersas y regiones con número variable de repeticiones en tándem (MIRU-VNTR).

**Resultados:** Mediante la genotipificación de las cepas aisladas por medio de *spoligotyping*, RFLP-IS6110 y MIRU-VNTR se logró la agrupación de 20 (16.7%) casos en ocho *clusters* con una probable relación epidemiológica, los cuales no mostraron una relación geográfica aparente y la discriminación de 100 (83.3%) de los 120 casos analizados. Estos análisis, realizados en forma secuencial nos permitieron identificar los conglomerados de cepas de *M. tuberculosis* relacionadas genéticamente (*clusters* verdaderos).

**Conclusiones:** La diversidad de genotipos representa la confluencia de cepas de diferente origen con una lenta diseminación en la población derechohabiente del IMSS, radicada en el Estado de Nuevo León y no la presencia de brotes epidemiológicos aparentes.



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez

Director Interno



Dr. Salvador Luis Said y Fernández

Director Externo



Dr. Lucio Vera Cabrera

Co-Director

## DEDICATORIA

A mis padres José Luis y Laura Elena por ser una fuente constante de apoyo e inspiración, por enseñarme a luchar para lograr mis metas y superar las adversidades, gracias a ustedes he llegado hasta aquí.

A mis hermanas Any y Elisa por su cariño, apoyo y por confiar en mi.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los Directores de tesis Dra. Herminia Martínez Rodríguez y Dr. Salvador Said Fernández por el respaldo y asesoría durante mi formación profesional.

Al Co-Director de tesis, Dr. Lucio Vera Cabrera por sus aportaciones a este proyecto.

A Pepe por todo su amor, apoyo, comprensión y paciencia a cada instante.

A mi gran familia por todo su cariño.

A la M.C. Pola Becerril Montes por su gran apoyo y por compartir sus conocimientos y experiencias.

A mis compañeros de maestría: Ale, Bryan, Anajulia y Mauricio por los momentos compartidos.

A mis compañeros del CIBIN: Gloria Molina y Victor Torres por el apoyo y motivación.

A David Said por su ayuda en el manejo de los programas computacionales.

A Carmen Molina por su capacitación y consejos sobre RFLPs.

A Ofelia y Antonio Luna por su apoyo en el tratamiento de las muestras y asilamiento de cepas.

Al Dr. José Antonio Enciso Moreno por recibirme en su laboratorio y por sus enseñanzas.

A Liz y Enrique por su apoyo y momentos amenos compartidos durante mi estancia en Zacatecas.

Al CONACYT por el apoyo económico para el estudio de la maestría.

Al FOSISS por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

# ÍNDICE

## CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.1.1 Definición de tuberculosis	1
1.1.2 Etiología	1
1.1.3 Formas clínicas de TB	2
1.1.4 Importancia epidemiológica de la TBP en el mundo	2
1.1.5 Factores que favorecen la propagación de la TB	3
1.1.6 Incidencia global y asociación con el VIH/SIDA	3
1.1.7 Importancia epidemiológica de la TBP en México	4
1.1.8 Diagnóstico	4
1.1.9 Ventajas de la genotipificación en la vigilancia epidemiológica de TB	5
1.1.10 Genotipificación	6
1.1.10.1 RFLP-IS6110	6
1.1.10.2 <i>Spoligotyping</i>	9
1.1.10.3 <i>MIRU-VNTR</i>	10
1.2 JUSTIFICACIÓN	13

## CAPITULO II

2.1 OBJETIVO GENERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14

## CAPITULO III

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1.1 EQUIPO	15
3.1.2 MATERIALES	16
3.1.3 REACTIVOS	18
3.1.4 SOLUCIONES	20
3.1.4.1 Extracción de DNA	20
3.1.4.2 <i>Spoligotyping</i>	23
3.1.4.3 RFLP-IS6110	26
3.1.4.4 <i>MIRU-VNTR</i>	30
3.1.5 Origen de las cepas	30
3.1.6 Análisis de polimorfismo	31
3.1.7 Aislamiento de DNA genómico de cepas de <i>M. tuberculosis</i>	32
3.1.7.1 Procedimiento de inactivación de cepas	32
3.1.7.2 Extracción de DNA	33
3.1.8 <i>Spoligotyping</i>	34
3.1.9 RFLP-IS6110	36

3.1.9.1 Preparación de la sonda de IS6110	38
3.1.9.2 Marcaje de las sondas	39
3.1.10 <i>MIRU-VNTR</i>	40
<b>CAPITULO IV</b>	
4.1 RESULTADOS	44
4.1.1 Patrones Obtenidos por <i>Spoligotyping</i>	44
4.1.2 RFLP-IS6110	46
4.1.3 <i>MIRU-VNTR</i>	48
4.1.4 Análisis por RFLP- IS6110	50
4.1.5 Análisis por spoligotyping en combinación con <i>MIRU-VNTR</i>	52
4.1.6 Distribución geográfica de <i>clusters</i> verdaderos	52
4.1.7 Variantes clonales en aislados clínicos	54
4.1.8 Banco de DNAs y base de datos	56
<b>CAPITULO V</b>	
5.1 DISCUSIÓN	57
<b>CAPITULO VI</b>	
6.1 CONCLUSIONES	66
<b>CONTRIBUCIÓN DE NUESTRO TRABAJO AL CAMPO DE ESTUDIO</b>	68
<b>PERSPECTIVAS</b>	72
<b>REFERENCIAS</b>	73



## LISTA DE FIGURAS

1. Estrategia general del estudio	31
2. Análisis de datos de <i>spoligotyping</i> . Conversión de código binario a código octal.	36
3. Patrón de <i>spoligotyping</i> y amplificación por PCR del locus 26 de la muestra perteneciente a la familia Beijing.	46
4. Análisis de los patrones de bandas de RFLP-IS6110	47
5. Polimorfismos en el número de copias del locus M.tub 21 en diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> .	48
6. <i>Clusters</i> formados por RFLP-IS6110	51
7. <i>Clusters</i> formados por <i>spoligotyping</i> y MIRU-VNTR	52
8. Localización geográfica de casos agrupados en <i>clusters</i> verdaderos	54
9. Polimorfismos en el número de copias del locus QUB 26 en diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i>	55
10. Patrones de RFLP-IS6110 mostrando bandas de baja intensidad en una muestra con variabilidad clonal	56

## LISTA DE TABLAS

1. Condiciones de PCR para la amplificación de la sonda de IS6110	38
2. Secuencia de iniciadores y longitud de las unidades de repetición de los 15 <i>MIRU-VNTR</i> utilizados.	41
3. Concentración de iniciadores y MgCl <sub>2</sub> y temperatura de alineamiento para cada <i>MIRU-VNTR</i> .	42
4. Representación de los códigos binario y octal de los <i>clusters</i> formados por <i>spoligotyping</i> . Se indica además el número de casos por <i>cluster</i> así como la familia a la que estos pertenecen según la base de datos SpolDB4.	45
5. Distribución geográfica según la base de datos SpolDB4 de los <i>clusters</i> formados por <i>spoligotyping</i> .	45
6. Análisis de los patrones <i>MIRU-VNTR</i> de las cepas agrupadas en <i>clusters</i> por este método	49
7. Casos agrupados en <i>cluster</i> utilizando la combinación de los 3 métodos de genotipificación ( <i>spoligotyping</i> , RFLP-IS6110 y <i>MIRU-VNTR</i> ).	50
8. Casos agrupados en <i>clusters</i> verdaderos	53
9. Patrones de <i>MIRU-VNTR</i> de las cepas que presentaron variantes clonales.	55

## ABREVIATURAS

%	Por ciento
µg	Microgramo (s)
µJ/cm <sup>2</sup>	MicroJoules por centímetro cuadrado
µl	Microlitro (s)
µm	Micras
°C	Grados centígrados
AMM	Área Metropolitana de Monterrey
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil amonio
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DR	Repetición Directa
DVR	Repeticiones Variables Directas
E.E.U.U.	Estados Unidos de América
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ETR	Exact Tandem Repeats
g	Gramo (s)
h	Hora (s)
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Agua destilada

H <sub>2</sub> O <sub>m</sub> Q	Agua milli Q
HCl	Ácido clorhídrico
L	Litro
M	Molar
<i>M. africanum</i>	<i>Mycobacterium africanum</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. canetti</i>	<i>Mycobacterium canetti</i>
<i>M. microti</i>	<i>Mycobacterium microti</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mg	Miligramo (s)
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minuto (s)
<i>MIRU</i>	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
ml	Mililitro (s)
mM	Mili Molar
MPTR	Major Polymorphic Tandem Repeats
MTB-MFR	<i>M. tuberculosis</i> multifarmacorresistentes
N.L.	Nuevo León
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
ng	Nanogramo (s)
NTM	Non tuberculosis mycobacteria
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial Hidrógeno
QUB	Queen University of Belfast
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<i>spoligotyping</i>	spacer oligotyping
TB	Tuberculosis
TBP	Tuberculosis pulmonar
U	Unidades
V	Volts
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
w/v	peso volumen

# CAPITULO I

## 1.1 INTRODUCCIÓN

### **1.1.1 Definición de tuberculosis**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa que se caracteriza por una destrucción tisular progresiva, circunscrita a las zonas infectadas (Smith, 2003), su vía de transmisión es aérea (WHO, 2007) y la forma pulmonar es la más común (CENAVE; WHO, 2006)

### **1.1.2 Etiología**

Esta enfermedad es causada por organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, formado por *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. canetti*. Aunque el principal agente causal es *M. tuberculosis*. Es importante considerar que existen otras especies de micobacterias, llamadas NTM por sus siglas en Inglés (*Non Tuberculosis Mycobacteria*), que producen síntomas que son fácilmente confundidos con TB, pero que no reaccionan favorablemente al tratamiento anti-TB convencional. Estas enfermedades se conocen como micobacteriosis (Nolte y Metchck, 1995).

*M. tuberculosis* es una bacteria de forma bacilar, inmóvil, no esporulada, de crecimiento lento con un tiempo de generación de 15 a 20 h. Mide de 2 a 4

$\mu\text{m}$  de longitud por 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Es una bacteria aerobia estricta. Esta última condición favorece su localización en los alvéolos pulmonares al inicio de la enfermedad (Todar, 2005)

### **1.1.3 Formas clínicas de TB**

La expresión clínica de la TB es muy variada y depende de ciertos factores que participan en el desarrollo de la infección, entre los cuales se encuentran la edad, el estado inmunológico y nutricional del hospedero así como otros relacionados con el microorganismo como su virulencia o preferencia por tejidos específicos (Valone y Cols., 1988). Sin embargo, sin duda la forma clínica más frecuente es la pulmonar (TBP).

### **1.1.4 Importancia epidemiológica de la TBP en el mundo**

En 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la TB como una emergencia mundial, al registrarse un repunte en la prevalencia de TB en los países industrializados; además de haberse documentado en el mundo un total de ocho millones de casos nuevos anuales y dos y medio millones de muertes (SSA, 2005). La TB afecta fundamentalmente a personas que viven en países en desarrollo, en los cuales se localizan el 95% de los casos (Corbertt y Cols., 2003).

Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con TB. Entre el 5% y el 10% de estos individuos desarrollarán la enfermedad en el

curso de su vida (WHO, 2007) con un 90% de probabilidad de que la infección permanezca latente (Cole y Cols., 2005).

### **1.1.5 Factores que favorecen la propagación de la TB**

Lejos de ser controlados, hay indicios de que los casos de TB, en términos absolutos siguen aumentando en el mundo, aunque el último informe de la OMS indica que las tasas de mortalidad e incidencia han descendido notoriamente (WHO, 2003; WHO, 2007). La propia OMS ha determinado que existen factores que favorecen la propagación de la TB. Los principales son la expansión de la pobreza, la epidemia del SIDA y la aplicación inadecuada de las medidas de control de la transmisión de la enfermedad que a su vez favorece la aparición de cepas de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes (MTB-MFR), las cuales inciden negativamente en el pronóstico clínico, prolongan el tratamiento e incrementan la probabilidad de falla terapéutica (Cole y cols., 2005).

### **1.1.6 Incidencia global y asociación con el VIH/SIDA**

La incidencia global de TB en 2004 fue de 8.9 millones de casos nuevos (140/100,000 habitantes), de los cuales 3.9 millones (62/100,000) eran bacilíferos y 741,000 se presentaron en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se estima que 1.7 millones de personas (27/100,000) murieron de TB en este mismo año, incluidos los casos de coinfección por el VIH (248 000) (WHO, 2007).



### **1.1.7 Importancia epidemiológica de la TBP en México**

En ese mismo año, México reportó a la OMS la existencia de 11,411 casos nuevos de TB pulmonar confirmados por laboratorio y 2,345 casos extrapulmonares (WHO, 2006) mientras que el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica registró 14,443 casos nuevos de TB pulmonar (TBP), de los cuales 917 corresponden al estado de Nuevo León (SSA, 2004). En el 2005 el número de casos nuevos en México fue de 15,249 de los cuales 862 corresponden a Nuevo León (SSA, 2005). En el 2006 el número de casos nuevos reportados en México fue de 13,813. En ese año Nuevo León se encontró entre los estados con mayor incidencia de TB respiratoria después de Baja California, Tamaulipas, Guerrero, Nayarit, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Colima y Veracruz con 854 casos de TB pulmonar y una tasa de 19.83 por 100,000 habitantes, superior a la media nacional de 12.85 (SSA, 2006).

### **1.1.8 Diagnóstico**

El diagnóstico presuntivo de TB se basa en imágenes radiológicas, la historia de contacto con personas enfermas de TB y métodos indirectos como la prueba de la tuberculina. El diagnóstico definitivo se establece por la confirmación de *M. tuberculosis* mediante su observación en frotis de muestras de expectoración teñidas con la técnica de Ziehl Neelsen y/o por su aislamiento en cultivo a partir de muestras de tejido, fluidos o secreciones de pacientes con sospecha de TB (NOM-006-SSA2-1993; Cole y Cols., 2005).

Recientemente se han utilizados técnicas indirectas de biología molecular para el diagnóstico de TB, las cuales han resultado rápidas, sensibles y específicas (The National Collaborating Centre for Chronic Conditions, 2006), estas técnicas moleculares también se han utilizado para la diferenciación de *M. tuberculosis* de otras micobacterias (Campbell y Bah-Sow, 2006), pero pueden generar resultados falsos negativos cuando hay un número reducido de microorganismos (The National Collaborating Centre for Chronic Conditions, 2006).

### **1.1.9 Ventajas de la genotipificación en la vigilancia epidemiológica de TB**

Para lograr un control eficiente de la TB es indispensable contar con un sistema eficiente de vigilancia epidemiológica en el ámbito mundial. Para tal propósito, la genotipificación a gran escala de *M. tuberculosis* es una herramienta muy útil porque permite identificar brotes que no pueden ser detectados mediante epidemiología tradicional. Además, la genotipificación proporciona información sobre la dinámica de diseminación de las diferentes cepas de *M. tuberculosis*, permitiendo comparar aislados de regiones en donde esta enfermedad se encuentra ampliamente diseminada, y permite analizar los cambios evolutivos del patógeno (Supply y Cols., 2001). Sin embargo, una limitación de estos métodos de epidemiología molecular es la dificultad para cultivar las micobacterias de manera rutinaria, especialmente en países en desarrollo, porque se requiere una inversión económica en infraestructura y capacidad técnica que está fuera del alcance de la mayor parte de estos países.

Afortunadamente en nuestra localidad, se cuenta con estos recursos lo cual permitió la realización del presente trabajo.

### **1.1.10 Genotipificación**

Los estudios de epidemiología molecular de la TB se han facilitado por la aplicación de marcadores genéticos específicos y con base en éstos, se han desarrollado diversos métodos, entre los cuales los más utilizados son el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (*RFLP-IS6110*), análisis de las regiones espaciadoras del locus de repetición directa (*spoligotyping*) y análisis de regiones con número variable de repeticiones en tandem (*MIRU-VNTR*), por que con ellos se obtienen resultados reproducibles que pueden ser comparados en el ámbito global.

#### **1.1.10.1 RFLP-IS6110**

El descubrimiento y estudio de transposones en *M. tuberculosis* ha revelado su gran potencial para la diferenciación entre cepas (van Embden y Cols., 1993).

Eisenach y Cols. (1988) identificaron tres elementos genéticos de *M. tuberculosis*, que por su tamaño, número de copias y su conservación entre cepas del complejo *M. tuberculosis* se caracterizaron como secuencias de inserción. Estos elementos cromosómicos fueron utilizados como sondas específicas para la detección de *M. tuberculosis*, directamente en especímenes

clínicos, y se sugirió que podrían ser utilizadas en estudios epidemiológicos como marcadores

Thierry y Cols. (1990) identificaron una secuencia repetida de 1361 nucleótidos; la cual presentaba características de los elementos IS; con repeticiones invertidas (28pb) y directas (3pb) en los extremos de sus secuencias blanco. Esta secuencia, denominada IS6110, se ha encontrado sólo en organismos correspondientes al complejo *M. tuberculosis* y no en otras micobacterias. En un estudio realizado en ese mismo año, Thierry utilizó el segmento IS6110 como sonda y obtuvo diferentes patrones de hibridación utilizando DNA de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. microti*, lo que sugirió diferencias en el número de copias y localización genómica de este elemento. Una búsqueda de la presencia de IS6110 en cepas de *M. tuberculosis* aisladas de diferentes pacientes revelaron un arreglo particular en genomas de diferentes especies

Soolingen y Cols. (1990) establecieron la utilidad de los patrones específicos de restricción para el estudio de la epidemiología de la TB, porque éstos presentaban un claro polimorfismo de DNA, generado por la secuencia de inserción IS689, la cual resultó ser idéntica a IS6110. Aunque los aislados clínicos de *M. tuberculosis* presentaron un alto grado de polimorfismo, la transposición del elemento IS resultó ser un evento raro en cepas del complejo *M. tuberculosis*. Los resultados obtenidos indicaron que en regiones donde la TB es altamente prevalente, las cepas de *M. tuberculosis* se encuentran más

relacionadas que en regiones en donde la tasa de transmisión es baja y sugirieron que en estos últimos, la mayoría de los casos de TB son resultado de reactivación de infecciones previas con *M. tuberculosis* (van Soolingen y Cols., 1991).

van Embden y Cols. (1993) propusieron el método de RFLP-*IS6110* como una técnica estandarizada para la genotipificación de *M. tuberculosis*. Este método se basa en el análisis de aislados clínicos de *M. tuberculosis* de polimorfismos generados por la variabilidad en el número de copias y la posición del elemento *IS6110* en el genoma de las micobacterias. Utilizando este criterio, se considera que las cepas aisladas de casos sin relación epidemiológica producen patrones únicos de RFLP; mientras que los casos relacionados producen patrones semejantes; formando de esta manera conglomerados o *clusters*. van Embden y Cols. (1993) postularon que el uso de esta técnica permitirá la comparación de resultados entre diferentes laboratorios en la investigación de la transmisión internacional de TB y la identificación de cepas con propiedades únicas como alta infectividad o resistencia a fármacos, lo cual ya ha sido ampliamente confirmado.

La tipificación de cepas de *M. tuberculosis* por RFLP-*IS6110* ha sido utilizada en la identificación de brotes de TB (van Embden y Cols., 1993) y se ha considerado como el estándar de oro para la tipificación de *M. tuberculosis*. Sin embargo, su utilidad se ve limitada debido a la necesidad de una cantidad

importante de microorganismos, un prolongado tiempo de estudio y el uso de un software especializado para el análisis de resultados. Otra importante limitación es que proporciona una pobre discriminación de cepas que contienen 5 o menos copias del elemento IS6110 (Frothingham, Hills y Wilson, 1998) lo cual hace necesaria una tipificación secundaria empleando un método adicional.

### **1.1.10.2 Spoligotyping**

En 1993 Groenen y Cols. investigaron la naturaleza de los polimorfismos del locus de repetición directa (DR) el cual contiene múltiples elementos de repetición directa de 36 pb altamente conservados, separados por secuencias alternas de espaciadores polimórficos de 34 a 41pb (Kamerbeek y Cols., 1997). Estos polimorfismos se deben probablemente a una recombinación homóloga entre elementos DR adyacentes o distantes y a rearrreglos dirigidos por la inserción del elemento IS6110; que generalmente está presente en el locus DR de la mayoría de las cepas del complejo *M. tuberculosis*. Con base en la naturaleza de los polimorfismos del *locus* DR, estos investigadores desarrollaron un método para la tipificación de cepas; DVR-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de repeticiones variables directas); el cual permite la diferenciación de cepas no relacionadas epidemiológicamente (Groenen y Cols., 1993). En 1997 Kamerbeek y Cols. desarrollaron el método conocido como, *spoligotyping (spacer oligotyping)*; mediante el cual, se amplifican las regiones espaciadoras entre los elementos DR del *locus* DR altamente conservado. La variabilidad de los 43 espaciadores utilizados en este método (presencia o ausencia de espaciadores particulares) se utiliza para obtener los

patrones de *spoligotyping* de las cepas analizadas. Este método es simple y rápido para detección y tipificación simultánea de *M. tuberculosis* en muestras clínicas sin necesidad de la realización de un cultivo o purificación de DNA (Kamerbeek y Cols., 1997).

### **1.1.10.3 MIRU-VNTR**

Frothingham y Cols. (1994) postularon que a pesar de que las cepas del complejo *M. tuberculosis* varían en especificidad de hospedero, virulencia y otras características fenotípicas, éstas tienen secuencias de DNA altamente conservadas.

En 1998, Frothingham y Meeker-O'Connell identificaron 11 *loci* con un número variable de repeticiones en tandem (*VNTR*) en el genoma de la cepa de referencia H37-Rv, seis de estos *loci* presentan características de repeticiones exactas en tandem (*ETR*, por sus siglas en inglés) que contienen repeticiones de 53 a 79 pb con secuencias idénticas en repeticiones adyacentes y cinco repeticiones mayores polimórficas en tandem (*MPTR*, por sus siglas en inglés), las cuales contienen repeticiones de 15 pb con variación en copias adyacentes. Comparando los productos de la amplificación por PCR de los 11 *loci* con *VNTR*, Frothingham y Meeker-O'Connell (1998) tipificaron 48 cepas, dentro de las cuales incluyeron 25 cepas silvestres de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti* y 23 cepas de *M. bovis* BCG. Los resultados sugieren que este método de tipificación tiene diversas ventajas, ya que es rápido, reproducible, permite una fácil comparación entre un gran número de cepas y

puede ser utilizado junto con el método de RFLP-IS6110 para aumentar el poder de discriminación cuando se estudian cepas con cinco o menos copias de IS6110.

A partir del trabajo de Frothingham y Meeker-O'Connell se ha descrito un gran número de VNTRs para la tipificación de *M. tuberculosis*, buscando un sistema que provea la mayor discriminación posible entre aislados de *M. tuberculosis*. Esta cualidad es necesaria para la identificación de brotes de TB.

En 2001 Supply y Cols. reportaron un análisis de 90 cepas de 30 países utilizando VNTRs de 12 elementos genéticos tipo minisatélite de *M. tuberculosis* denominados Unidades de Repetición Interdispersas Micobacterianas (MIRU, por sus siglas en inglés). Estos autores realizaron este estudio utilizando PCR multiplex con oligonucleótidos marcados con colorantes fluorescentes, lo cual permite detectar el tamaño de los fragmentos con una secuenciación capilar. Este método mostró ser reproducible, sensible y específico para tipificar organismos del complejo *M. tuberculosis* y diferenciar las cepas con 5 o menos copias de IS6110. En forma adicional, este método permite la genotipificación de un gran número de cepas en un tiempo corto, por ser considerablemente más rápido que los métodos de RFLP-IS6110 y análisis manual de los VNTRs. La tipificación mediante este sistema de 12 loci de MIRU-VNTRs en combinación con *spoligotyping* se utilizó como base para la genotipificación a gran escala de *M. tuberculosis*. Sin embargo, la combinación de estos dos métodos tiene una capacidad de discriminación menor al de RFLP-IS6110. Por



lo que, en diciembre del 2006, Supply y Cols. (2006) reportaron un sistema optimizado de 24 *MIRU-VNTR* con un poder de discriminación significativamente mayor. Quince de estos *MIRU-VNTR* presentan una mayor variabilidad asociados a procesos de cambios evolutivos recientes; por lo que proponen este sistema de 15 *loci* como el nuevo estándar para estudios epidemiológicos de rutina y el sistema de 24 *loci* como una herramienta de alta resolución para estudios filogenéticos.

En marzo de 2007 Cardoso y Cols. reportaron un estudio de epidemiología molecular de TB, en el cual utilizaron los sistemas de 15 y 24 *MIRU-VNTR* y obtuvieron valores de especificidad del 95.7% y 97.4% respectivamente. Cuando emplearon estos sistemas en combinación con *spoligotyping* lograron obtener una especificidad y una sensibilidad del 100%. Mediante el método de RFLP-IS6110 también obtuvieron una sensibilidad del 100% pero la especificidad fue del 95.8%.

De acuerdo con los hallazgos de Cardoso y Cols. (2007), el sistema de genotipificación de 15 ó 24 *MIRU-VNTR* combinado con *spoligotyping* representa el primer método basado en PCR con parámetros de especificidad y sensibilidad comparables con los del estándar de oro (RFLP-IS6110); por lo que su utilización es recomendado como el método de elección para la tipificación en estudios de transmisión de TB.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Nuevo León tiene una tasa de TB superior a la media nacional con una importante presencia de cepas con variada resistencia a los fármacos pero hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio en nuestra entidad que utilice, combinados, los tres métodos de genotipificación recomendados universalmente. Estos métodos permiten identificar brotes de TB ocasionados por una misma cepa y determinar su vía de transmisión.

El conocimiento de las vías de transmisión de *M. tuberculosis* es una herramienta epidemiológica de gran utilidad para el establecimiento de medidas de prevención y control efectivas.

La genotipificación de los microorganismos permite establecer posibles asociaciones entre cepas como base para definir su relación epidemiológica.

En este trabajo identificamos el genotipo de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con TB pulmonar en el AMM, utilizando, combinadas, las técnicas de *spoligotyping*, RFLP-IS6110 y *MIRU-VNTR* para identificar posibles asociaciones entre ellas y conocer la situación actual de la epidemiología de la TB en nuestra entidad, al utilizar los métodos para análisis epidemiológico más específicos y sensibles conocidos hasta ahora.

## CAPITULO II

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer la relación epidemiológica entre cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes del AMM, atendidos en el IMSS, con base en su genotipo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer la similitud genética entre cepas de *M. tuberculosis* mediante la técnica de *spoligo*typing.
2. Confirmar por RFLP-IS6110 el número de conglomerados identificados por *spoligo*typing.
3. Mediante la técnica de *MIRU-VNTR*, detectar los casos no relacionados epidemiológicamente, que no fueron discriminados por las dos técnicas anteriores.
4. Crear una base de datos con los resultados obtenidos y un banco de DNA de las cepas aisladas.

## **CAPITULO III**

### **3.1 MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1.1 EQUIPO**

- Campana de bioseguridad clase II B2 (NUAIRE). Stafford, Texas.E.E.U.U.
- Vortex (VX 100 Labnet). Edison, New Jersey, E.E.U.U.
- Baño de agua (Terlab M40). El arenal, Jalisco. México.
- Campana de bioseguridad clase II A (LABCONCO). Stafford, Texas.E.E.U.U.
- Incubadora (CO<sub>2</sub> Water-Jacketed Incubator NUAIRE). Stafford, Texas.E.E.U.U.
- Termoblock (Thermolyne, dri-bath). Dubuque, Iowa. E.E.U.U.
- Centrífuga (Centrifuge 5415C-ependorf). Barkhausenweg, Hamburgo. Alemania.
- Termociclador Master gradient ependorf. Barkhausenweg, Hamburgo. Alemania.
- Horno de hibridación (Hyband). Franklin, Massachussets. E.E.U.U.
- Miniblotter 45. Immunetics. Cambridge, Massachusetts. E.E.U.U.
- Baño de agua (VWR Scientific 1120). Batavia, Illinois. E.E.U.U.
- Cámara de electroforesis (Maxicell primo EC340). Holbrook, New Cork. E.E.U.U.
- Fuente de poder (Life technologies model 250). Gaithersburg, Maryland. E.E.U.U.

- Equipo de transferencia con presión negativa (BIO-RAD Model 785 Vacuum blotter). Hercules, California. E.E.U.U.
- Crosslinker (CL-1000 Ultraviolet). UVP. Upland, California, E.E.U.U.
- Cámara de electroforesis (Minicell primo EC320). Holbrook, New Cork. E.E.U.U.
- Biofotómetro (Eppendorf Biophotometer). Barkhausenweg, Hamburgo. Alemania.
- Placa térmica con agitador magnético (Fisher Stirring Hotplate, Fischer Scientific). Pittsburgh Pennsylvania. E.E.U.U.
- Termociclador (T GRADIENT Biometra). Goettingen. Alemania.
- Cámara de electroforesis (HORIZON modelo 11.14 GIBCO, BRL, Life Technologies) Los Angeles, California. E.E.U.U.
- Fuente de poder (Consort modelo E132 Life Technologies, GIBCO BRL) Los Angeles, California. E.E.U.U.

### **3.1.2 MATERIAL**

- Asas bacteriológicas, Bioloop. Newport Beach, California. E.E.U.U.
- Tubo de 13 × 100. Pyrex, Labware, Corning, New York, New York. E.E.U.U.
- Perlas de vidrio. Fischer Scientific. Pittsburgh Pennsylvania. E.E.U.U.
- Jeringa de 3 ml provista con aguja calibre 21 G y 32 mm de longitud. Plastipak. Garland, Texas. E.E.U.U.
- Tubos cónicos con tapa de 1.5 ml. Eppendorf. Barkhausenweg, Hamburgo, Alemania.

- Tubos cónicos con tapa de 2 ml. Eppendorf. Barkhausenweg, Hamburgo, Alemania.
- Tapón de plástico. Heathrow, Scientific. Vernon Hills, Illinois. E.E.U.U.
- Gradillas. Heathrow, Scientific. Vernon Hills, Illinois. E.E.U.U.
- Flotadores. Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Membrana de Nylon. Amersham, Bioscience. Buckinghamshire, Reino Unido.
- Soporte suave. Immunetics, Cambridge, Massachusetts. E.E.U.U.
- Tubo de hibridación. Hyband. Franklin, Massachusetts. E.E.U.U.
- Láminas de acetato. IBM. Guadalupe, Nuevo León, México.
- Hypercassette, Amersham, Bioscience. Buckinghamshire, Reino Unido
- Película radiográfica hyperfilm ECL Amersham, Bioscience. Buckinghamshire, Reino Unido.
- Bolsas de plástico con cremallera. Ziploc. Wisconsin, E.E.U.U.
- Sistema de purificación de columnas. Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Promega. Madison, Wisconsin. E.E.U.U.
- Película radiográfica (KODAK TMG/RA). Rochester, New York. E.E.U.U.
- Puntillas de 10  $\mu$ l. Axygen. Union city, California. E.E.U.U.
- Puntillas de 20  $\mu$ l. Raining. Oakland, California. E.E.U.U.
- Puntillas de 200  $\mu$ l. Raining. Oakland, California. E.E.U.U.
- Puntillas de 1000  $\mu$ l. Axygen. Union city, California. E.E.U.U.
- Respirador contra partículas 3M 8210. St. Paul, Minnesota. E.E.U.U.
- Batas quirúrgicas estériles. Tailandia.

### 3.1.3 REACTIVOS

- Medio Lowenstein-Jensen (base). Merck. Darmstadt, Alemania.
- Tris. Amresco. Solon, Ohio, E.E.U.U.
- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB). Calbiochem. San Diego, California .E.U.U.
- Lisozima. Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS). Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Proteínasa K. Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri.E.E.U.U.
- Cloruro de Sodio (NaCl). Promega. Madison, Wisconsin. E.E.U.U.
- Cloroformo. J.T. Baker. Estado de México. México.
- Alcohol isoamílico. Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Isopropanol. ICN. Biomedical Inc. Aurora, Ohio. E.E.U.U.
- Etanol. Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Kit de PCR (Buffer Tth, Enhancer, Tth polimerasa). Epicentre. Madison, Wisconsin. E.E.U.U.
- $MgCl_2$ . Fluka. Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Conjugado estreptavidina-peroxidasa. Indianapolis. Indiana. E.E.U.U.
- Líquido de detección ECL. Amersham, Bioscience. Buckinghamshire, Reino Unido.
- Productos GBX de KODAK. Rochester, New York. E.E.U.U.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Promega. Madison, Wisconsin. E.E.U.U.

- Endonucleasa de restricción *PvuII*. Promega Madison, Wisconsin. E.E.U.U.
- RNAsa Promega. Madison, Wisconsin. E.E.U.U.
- Buffer B 1X. Promega Madison, Wisconsin. E.E.U.U.
- Marcadores de peso molecular Lambda/*Hind* III-Phi X174/*Hae* III Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Hidróxido de sodio. Caledon. Georgetown, Ontario, Canada.
- Buffer de hibridación (ECL gold hybridization buffer). Amersham, Bioscience. Buckinghamshire, Reino Unido.
- Go Taq Green Master Mix. Promega. Madison, Wisconsin. E.E.U.U.
- Reactivo de marcaje y glutaraldehído (ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System, GE Healthcare). Amersham, Bioscience. Buckinghamshire, Reino Unido.
- Luminol. Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Ácido cumárico. Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Kit de PCR de BIOTECOSA. Biotecnologías Universitarias S.A. México. Tlalnepantla Estado de México. México.
- dNTPs. Invitrogen, Life Technologies. Carlsband. California, E.E.U.U.
- Dimetil sulfóxido (DMSO). Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Agarosa ultrapura. Invitrogen. Carlsband. California, E.E.U.U.
- Marcador de molecular de 50 pb. Promega. Madison, Wisconsin. E.E.U.U.
- Marcador de molecular de 50 pb. Biolabs, New England. Ipswich Massachusetts, E.E.U.U.



- Citrato de sodio tribásico dihidratado. Fluka. Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri. E.E.U.U.
- Iniciadores. INS 1 e INS 2. MWG BIOTECH Inc. High Point, North Carolina. E.E.U.U.
- Iniciadores. DRa y DRb. MWG BIOTECH Inc. High Point, North Carolina. E.E.U.U.

### **3.1.4 SOLUCIONES**

#### **3.1.4.1 Extracción de DNA**

##### **TE 10X (100 mM Tris/HCl, pH 8 + 10 mM EDTA) (100 ml)**

1. Preparar Tris/HCl 0.5 M pH8
  - a. Disolver 7.88g de Tris/HCl en aproximadamente 80 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
  - b. Ajustar a pH 8
  - c. Aforar a 100 ml
2. Preparar EDTA 0.5 M
  - a. Disolver 16.61g de EDTA en aproximadamente 60 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>, agregando unas perlas de NaOH para que se disuelva con mayor facilidad.
  - b. Ajustar a pH 8
  - c. Aforar a 100 ml
3. Colocar aproximadamente 50 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

4. Agregar 20 ml de Tris/HCl 0.5 M pH 8 más 2 ml EDTA 0.5 M
5. Aforar a 100 ml.

**TE 1X: (250 ml)**

1. Agregar 25 ml de TE 10X a un matraz de aforación de 250 ml estéril.
2. Aforar con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> estéril.
3. Realizar alícuotas de 50 ml y 1.5 ml en condiciones de esterilidad.
4. Almacenar a 4 °C.

**Lisozima (10mg/ml) (15 ml)**

1. Pesar 0.15g de lisozima
2. Disolver en 15 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> estéril.
3. Realizar alícuotas de 1.5 ml
4. Almacenar a -20 °C.

**Proteinasa K (10mg/ml) (5 ml)**

1. Pesar 0.05g de proteinasa K
2. Disolver en 5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> estéril.
3. Realizar alícuotas de 200 µl.
4. Almacenar a 4 °C.

### **SDS 10% (50 ml)**

1. Pesar 5g de SDS.
2. Vaciar el SDS a un matraz de aforación de 50 ml completamente seco con un embudo.
3. Agregar H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q poco a poco y disolver cuidadosamente el SDS por inversión evitando la formación de espuma, si esta se forma, eliminarla agregando H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q por goteo sobre la espuma.
4. Aforar a 50 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q.
5. Almacenar a temperatura ambiente.

### **CTAB/NaCl (50 ml)**

1. Pesar 2.05g de NaCl y 5g de CTAB.
2. Agregar el NaCl y el CTAB a un matraz de aforación de 50 ml seco.
3. Agregar H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q poco a poco y calentar la solución en un baño de agua hasta disolver o bien dejar disolver de un día para otro.
4. Aforar a 50 ml, si el volumen disminuye al enfriar la solución, volver a aforar.
5. Calentar el reactivo en un baño de agua, vaciarlo en un vaso de precipitados y realizar alícuotas vaciando directamente 1.2 ml aproximadamente.

### **Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (50 ml)**

1. Colocar en un frasco que selle herméticamente 48 ml de cloroformo

2. Agregar 2 ml de alcohol isoamílico.

### **Etanol 70% (100 ml)**

1. Colocar 70 ml de alcohol en un matraz de aforación de 100 ml
2. Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **3.1.4.2 Spoligotyping**

#### **SSPE 20X (1L)**

1. Disolver 175.3g de NaCl más 27.6g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O y 74g de EDTA en 800 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
2. Ajustar el pH a 7.4 con NaOH (aproximadamente 6.5 ml de NaOH 10N)
3. Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>
4. Esterilizar en autoclave.

#### **SDS 10% (50 ml)**

1. Pesar 5g de SDS.
2. Vaciar el SDS a un matraz de aforación de 50 ml completamente seco con un embudo.
3. Agregar H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> poco a poco y disolver cuidadosamente el SDS por inversión evitando la formación de espuma, si esta se forma eliminarla agregando H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> por goteo sobre la espuma.
4. Aforar a 50 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
5. Almacenar a temperatura por no más de una semana.

### **EDTA 0.5 M**

1. Disolver 16.61g de EDTA en aproximadamente 60 ml de en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>, agregando unas perlas de NaOH para que se disuelva con mayor facilidad.
2. Ajustar a pH8
3. Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **2XSSPE/0.1% SDS (200ml)**

1. Colocar en un frasco 100 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
2. Agregar 20 ml de SSPE 20X más 2 ml de SDS 10%.
3. Agregar 78 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
4. Mezclar perfectamente

### **2XSSPE/0.5% SDS (250ml)**

1. Colocar 100 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> en un matraz de aforación de 250 ml.
2. Agregar 25 ml de SSPE20X más 12.5 ml de SDS 10%.
3. Aforar a 250 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **2XSSPE (150ml)**

1. Colocar en un frasco 15 ml de SSPE 20X más 135 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
2. Mezclar perfectamente.

### **SDS 1%**

1. Colocar 100 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> en un matraz de aforación de 250 ml.
2. Agregar 25 ml de SDS 10%.
3. Aforar a 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **EDTA 20 mM**

1. Colocar en un matraz de aforación 200 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
2. Agregar 20 ml de EDTA 0.5M.
3. Aforar a 500 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **Estreptavidina-peroxidasa**

1. Colocar 10 ml de buffer 2X SSPE/0.5% SDS en un tubo falcon de 15 ml
2. Agregar 2.5 µl del conjugado estreptavidina-peroxidasa (500 U/ml)

### **Líquido de detección ECL (20 ml)**

1. Mezclar volúmenes iguales de los reactivos de detección 1 y 2 del kit de Amersham, Bioscience.

### **Reactivos de revelado y fijación (GBX de KODAK)**

1. Colocar 100ml del reactivo de revelado o fijación en una probeta de 500 ml y llevar a un volumen de 475 ml con agua de la llave.
2. Colocar cada una de las mezclas en un recipiente.

### **3.1.4.3 RFLP-IS6110**

#### **Buffer de hibridación (ECL gold hybridization buffer, GE Healthcare)**

1. Tomar el volumen del buffer de hibridación requerido.
2. Agregar NaCl a una concentración de 0.5 M.
3. Agregar agente bloqueador a una concentración final de 5% (w/v).
4. Mezclar inmediatamente hasta que el agente bloqueador quede libre en suspensión.
5. Continuar mezclando a temperatura ambiente por 1 h con un agitador magnético.
6. Calentar a 42 °C por 0.5 a 1 h mezclando ocasionalmente.
7. Realizar alícuotas de 10 ml en tubos falcon de 15 ml.
8. Almacenar a -20 °C hasta su uso.

#### **SSC 20X (NaCl 3M + Tri-sodium citrate dihydrate 0.3M, pH 7.0)**

1. Disolver 175.2g de NaCl más 88.23g de Tri-sodium citrate dihydrate en 700ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
2. Ajustar el pH a 7.0
3. Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

#### **NaOH 4M**

1. Disolver 80g de NaOH en aproximadamente 400 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
2. Colocar en baño de agua y en agitación debido a que se produce calor en esta reacción.

3. Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
4. Almacenar a temperatura ambiente por no más de 3 meses.

### **SDS 10%**

1. Pesar 5g de SDS.
2. Colocar el SDS a un matraz de aforación de 50 ml completamente seco con un embudo.
3. Agregar H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> poco a poco y disolver cuidadosamente el SDS por inversión evitando la formación de espuma, si esta se forma eliminarla agregando H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> por goteo sobre la espuma.
4. Aforar a 50 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **NaCl 5M**

1. Pesar 292g de NaCl (2 veces 146g en un vaso de precipitados)
2. Colocar aproximadamente 200 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> en un vaso de precipitados de 2L y agregar el NaCl poco a poco.
3. Dejar en agitación continua y seguir agregando H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> y NaCl hasta un volumen aproximado de 900 ml.
4. Si es necesario calentar un poco hasta disolver completamente.
5. Aforar a 1L.
6. Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.



### **EDTA 0.5M**

1. Disolver 16.61g de EDTA en aproximadamente 60 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>, agregando unas perlas de NaOH para que se disuelva con mayor facilidad.
2. Ajustar a pH 8
3. Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **TBE 10X**

1. Disolver 108g de Tris base en 500 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.
2. Agregar 40 ml de EDTA 0.5 M.
3. Agregar 55g de ácido bórico y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> hasta un volumen de aproximadamente 900 ml.
4. Disolver completamente en agitación.
5. Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **TBE 0.5X**

1. Colocar 1L de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> en un matraz de aforación de 2L.
2. Agregar 100 ml de TBE10X.
3. Aforar a 2L con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **Solución de desnaturalización (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)**

1. Colocar 150 ml de NaCl 5M en un matraz de aforación de 500 ml.
2. Agregar 62.5 ml de NaOH 4M.

3. Aforar a 500 ml.

### **Solución de neutralización (1.5 M NaCl, 1M Tris. pH 8)**

1. Colocar en un vaso de precipitados 250 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> más 150 ml de NaCl 5M.
2. Agregar 60.7g de Tris base.
3. Disolver perfectamente.
4. Ajustar el pH a 8 (agregar aproximadamente 30 ml de HCl concentrado)
5. Aforar a 500 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **Buffer de lavado primario (SSC 0.5X, SDS 0.4%)**

1. Colocar 300 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> en un matraz de aforación de 500 ml.
2. Agregar 12.5 ml de SSC20X más 20 ml de SDS 10%.
3. Aforar a 500 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **Buffer de lavado secundario (2X SSC)**

1. Colocar 1L de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> en un matraz de aforación de 2L.
2. Agregar 200 ml de SSC 20X.
3. Aforar a 2L con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **SSC 10X**

1. Colocar 500 ml de SSC 20X en un matraz de aforación de 1L.
2. Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>.

### **Buffer de strip (SSC 0.1X + SDS 0.1%)**

1. Colocar 400 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q en un matraz de aforación de 500 ml.
2. Agregar 2.5 ml de SSC 20X más 5 ml de SDS 10%.
3. Aforar a 500 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q.

### **3.1.4.4 MIRU-VNTR**

#### **TBE 10X**

1. Disolver 108g de Tris base en 500 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q.
2. Agregar 40 ml de EDTA 0.5 M.
3. Agregar 55g de ácido bórico y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q hasta un volumen de aproximadamente 900 ml.
4. Disolver completamente en agitación.
5. Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q.

#### **TBE 0.5X**

1. Colocar 1L de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q en un matraz de aforación de 2L.
2. Agregar 100 ml de TBE10X.
3. Aforar a 2L con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q.

### **3.1.5 Origen de las cepas**

En este estudio se incluyeron 120 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con TBP radicados en el AMM, atendidos en el IMSS durante el año 2006. Se incluyó una sola cepa aislada de cada paciente y se cuenta con una

base de datos conteniendo información clínica y socioeconómica de cada participante. Todos los participantes fueron voluntarios y firmaron una carta de consentimiento informado para participar en el presente estudio.

### 3.1.6 Análisis de polimorfismo.

Se analizó el polimorfismo de la cepas de *M. tuberculosis* incluidas en este estudio con base en el análisis molecular de los siguientes elementos genéticos: regiones espaciadoras del locus DR (*spoligo*typing), el elemento IS6110 en fragmentos generados por digestión enzimática específica (RFLP-IS6110), Unidades Repetidas Interdispersas y regiones con número variable de repeticiones en tandem (*MIRU-VNTR*). Estos análisis se realizaron en forma secuencial (figura 1).

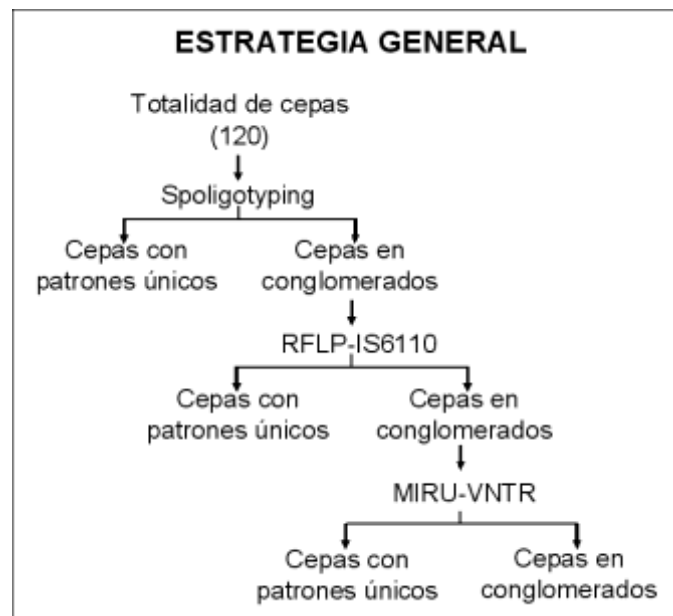


Figura 1. Estrategia general del estudio

Como una estrategia para el desarrollo de este proyecto, todas las cepas fueron analizadas mediante *spoligotyping*, pero en los análisis subsiguientes solo se incluyeron aquellas que formaron grupos de dos o más cepas con patrones iguales mediante este primer análisis. Es decir, aquellas que formaron conglomerados con posible relación genética. Se excluyeron de los análisis subsiguientes las cepas que mostraron patrones únicos.

### **3.1.7 Aislamiento de DNA genómico de cepas de *M. tuberculosis***

#### **3.1.7.1 Procedimiento de inactivación de cepas**

La primera fase de la extracción se realizó en un cuarto de contención III dentro de una campana de bioseguridad clase II B2. Se tomaron dos asadas de un cultivo fresco de *M. tuberculosis* en medio Lowenstein-Jensen (2 a 3 semanas) y se resuspendieron en 2 ml de TE 1X, dentro de un tubo de 13 × 100 que contenía de cinco a seis perlas de vidrio. La suspensión se agitó en un vortex por 4 a 5 min hasta homogeneizar 1.2 a 1.5 ml de esta suspensión se transfirieron con una jeringa provista con aguja a tubos cónicos con tapa de 1.5 ml de capacidad, y a partir de ésta, se transfirió 0.5 ml a cada uno de 2 tubos cónicos con tapa de 2 ml. Los tubos se cerraron y sellaron con un tapón de plástico para evitar que se abrieran. Se colocaron en una gradilla dentro de un baño de agua a 80 °C y se incubaron por 50 min. Los tubos se sacaron del baño, se dejaron enfriar y se inocularon cuando menos 2 suspensiones en medio de Lowenstein-Jensen para realizar una prueba de viabilidad.

### **3.1.7.2 Extracción de DNA**

Se realizó la extracción de DNA a partir de las suspensiones bacterianas inactivadas. Este proceso se efectuó dentro de una campana de bioseguridad clase II A. De acuerdo al método CTAB utilizado a cada una de las suspensiones inactivadas se les agregó 50  $\mu$ l de lisozima (10 mg/ml); se agitaron en vortex por 10 seg y se incubaron a 37°C toda la noche, transcurrido este tiempo a cada tubo se agregaron 70  $\mu$ l de SDS 10% y 6  $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml), se agitaron en vortex por 10 seg y se incubaron 10 min a 65°C en un termoblock. El paso siguiente fue agregar a cada suspensión 100  $\mu$ l de NaCl 5M y 80  $\mu$ l de CTAB/NaCl (0.274 M CTAB/0.68 M NaCl), este último precalentado a 65°C por 10 min, agitar en vortex por 10 seg, para luego incubarlos a 65°C por 10 min; a continuación se les agregó un volumen aproximadamente igual (700  $\mu$ l) de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitaron en vortex por 10 seg, se centrifugaron a temperatura ambiente por 5 min a 12,000 rpm, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se descartaron la interfase y la fase orgánica. A cada uno de los tubos con el sobrenadante se les agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol (aproximadamente 360  $\mu$ l) para precipitar los ácidos nucleicos. Se incubaron a -20°C toda la noche, se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a temperatura ambiente, se lavaron con etanol frío al 70% y se centrifugaron nuevamente a 12,000 rpm por 2 min. El sobrenadante se descartó y el DNA obtenido se dejó a temperatura ambiente para evaporar el etanol residual, el DNA se resuspendió

entonces en 20  $\mu\text{l}$  de TE 1X, se dejó a temperatura ambiente por 1 h 30 min y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización (van Soolingen, 1992).

### **3.1.8 Spoligotyping**

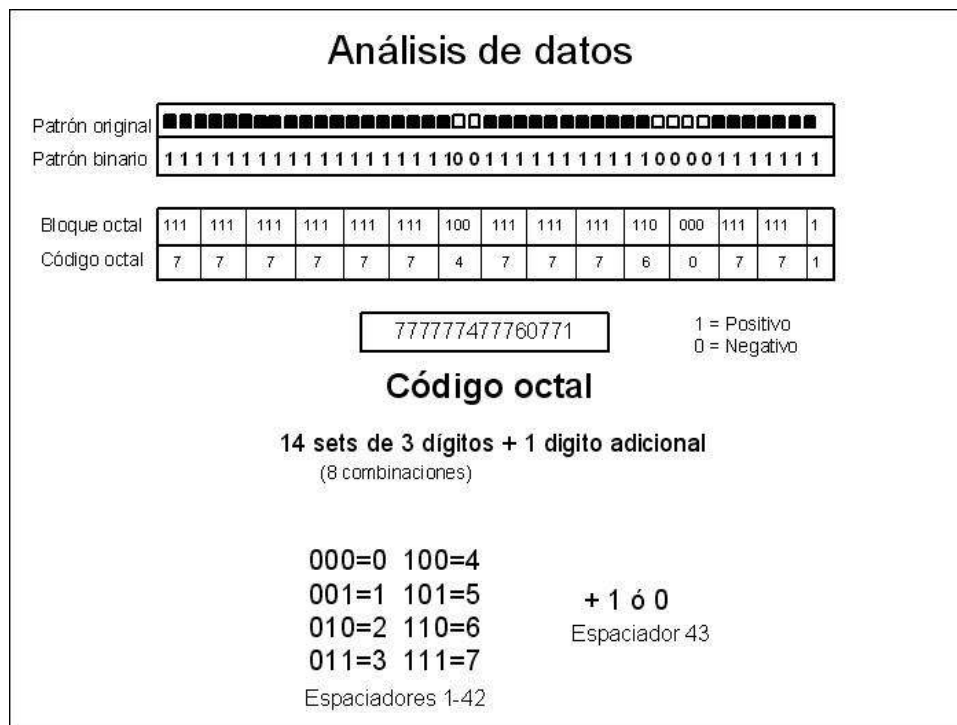
Estos ensayos fueron realizados utilizando una membrana de Nylon cargada positivamente. A partir del DNA bacteriano obtenido se realizó una amplificación por PCR del locus DR. La mezcla de PCR se preparó con las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1X de Buffer Tth, 1.5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de dNTPs, 5 pmoles de los iniciadores DRa y DRb, 10% de *enhancer*, 0.5U de Tth polimerasa ajustando con agua a un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  por reacción. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización de 4 min a  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 ciclos de 1 min a  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 min a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 seg a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  y un ciclo final de 5 min a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La prueba de PCR se realizó con un termociclador Master gradient Eppendorf.

Para la hibridación se prepararon diluciones de los DNAs en las que se depositaron 20  $\mu\text{L}$  de los productos de PCR en 150  $\mu\text{L}$  de buffer 2X SSPE/0.1% SDS, los tubos se calentaron a  $99\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min y se colocaron inmediatamente en hielo. La membrana se lavó por 5 min a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  en buffer 2 X SSPE/0.1% SDS, posteriormente se colocó sobre un soporte suave en la base de un miniblottter, se colocó la placa superior y se apretaron los tornillos. El líquido se retiró de los carriles por aspiración, empleando una bomba de vacío. Los carriles vacíos se llenaron con el producto de PCR diluido (evitando la

formación de burbujas) y el miniblotter se colocó en el horno de hibridación a 60 °C por 60 min en una posición horizontal sin agitación para permitir la hibridación. Al término de este tiempo se retiraron las muestras del miniblotter por aspiración con ayuda de una bomba de vacío y la membrana se colocó dentro de un tubo de hibridación, ésta se lavó 2 veces con 50 ml de buffer 2X SSPE/0.5 %SDS por 10 min a 60 °C. Después de cada lavado el buffer se desechó y al final la membrana se dejó enfriar dentro del tubo de hibridación para luego agregarle 10 ml de solución del conjugado estreptavidina-peroxidasa (10 ml de buffer 2X SSPE/0.5% SDS más 2.5µl del conjugado con 500U/ml) y se incubó a 42 °C por 60 min, enseguida la membrana se lavó con 50 ml de 2X SSPE/0.5% SDS a 42 °C por 10 min 2 veces y luego 2 veces más con 50 ml de 2X SSPE a 30 °C por 5 min. Para la detección de la quimioluminiscencia generada por el DNA hibridado, la membrana se incubó por 1 min en 20 ml del líquido de detección ECL. Se eliminó el exceso de solución y la membrana se colocó entre dos láminas de acetato en un hypercasete. Se colocó una película radiográfica hyperfilm ECL, sobre la membrana y se dejó exponer por 20 min. Después de la exposición la película se retiró del casete, se reveló y se fijó. Al final se enjuagó y se dejó secar al aire. Para la regeneración de la membrana, ésta se lavó con SDS 1% a 80 °C por 30 min 2 veces, luego 1 vez con EDTA 20 mM pH 8 a temperatura ambiente por 15 min y por último se almacenó en EDTA 20 mM pH8 a 4 °C en una bolsa de plástico con cremallera para evitar su deshidratación.



Los patrones obtenidos en código binario fueron convertidos a código octal siguiendo las indicaciones de Dale y Cols. (2001) (figura 2). El análisis de estos patrones se llevó a cabo mediante el programa SPSS versión 10 (Chicago, ILL., E.E.U.U.). Un *cluster* fue definido como una serie de aislados con 100% de identidad en sus patrones de *spoligotyping*. El código de cada *cluster* fue comparado con los de la base de datos internacional SpoIDB4 (Institut Pasteur de la Guadeloupe, 2006) para la identificación de la familia a la cual pertenecen.



**Figura 2.** Análisis de datos de *spoligotyping*. Conversión de código binario a código octal.

### 3.1.9 RFLP-IS6110.

Estos análisis se realizaron conforme al método descrito en 1993 por van Embden y Cols. (van Embden, 1993) para lo cual se utilizaron 2 µg de DNA de

cada una de las cepas en un volumen de 20  $\mu$ l. Estos fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *Pvu*II utilizando una concentración final de 8U, 1  $\mu$ g de RNAsa, Buffer B 1X, ajustando a un volumen final de 30  $\mu$ l con agua, la digestión se llevó a cabo a 37 °C por 4 h en un baño de agua. Transcurrido ese tiempo se verificó la acción de la enzima por una electroforesis en un gel de agarosa al 1% horizontal, se cargó 1  $\mu$ l DNA digerido más 5  $\mu$ l de una mezcla de marcadores de peso molecular Lambda/*Hind* III-Phi X174/*Hae* III (1:100). El gel se corrió por 1 hr 15 min a 90 V. Cuando se observó una digestión completa, se ajustó el volumen de las digestiones y a cada una les adicionó 5  $\mu$ l de una mezcla de marcadores de peso molecular Lambda/*Hind* III-Phi X174/*Hae* III (1:100). Los fragmentos de DNA obtenidos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio, a una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ml. Esta separación se llevó a cabo a 85 V por 10 min seguido de 17 h a 35V. El gel se lavó con 150 ml de buffer de desnaturalización (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) por 20 min en agitación constante, se enjuagó con agua y se hizo otro lavado con 150 ml de buffer de neutralización (1.5 M NaCl, 1 M Tris pH 8) por 20 min en agitación constante y se enjuagó nuevamente con agua destilada. Los fragmentos de DNA separados se transfirieron a una membrana de Nylon mediante un equipo de transferencia con presión negativa utilizando 500 ml de buffer SSC 10X. La transferencia se hizo aplicando 5" de mercurio por 2 h. Al finalizar este procedimiento, se verificó la completa transferencia de los fragmentos a la membrana en un transiluminador; y el gel se desechó. La membrana se retiró del equipo de

transferencia, se lavó por 5 min en buffer SSC 2X y se dejó secar al aire. Para fijar los fragmentos de DNA a la membrana, ésta se irradió con luz UV ( $1200 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) en un dispositivo específico para este propósito. La membrana se pasó al tubo de hibridación y se trató con 10 ml de buffer de hibridación a 42 °C por 1 h. Después de esta prehibridación se realizó una hibridación tipo *southern* por 18 h con una sonda preparada a partir de un fragmento de 245 pb (800 ng) correspondiente al brazo derecho de IS6110 o a una mezcla de los marcadores de peso molecular Lambda/*Hind* III (62.5ng) y Phi X174/*Hae* III (412.5ng).

### 3.1.9.1 Preparación de la sonda de IS6110

A partir de 100 ng de DNA total de *M. tuberculosis* H37-Rv se corrió una PCR con una concentración final de 1X de Go Taq Green Master Mix, 10 pmoles de los iniciadores INS 1 e INS 2, ajustando a un volumen final de reacción de 100  $\mu\text{l}$ .

**Tabla 1.** Condiciones de PCR para la amplificación de la sonda de IS6110

Temperatura (°C)	Tiempo	No. ciclos
96	3min	1 ciclo
95	50 seg	3 ciclos
71.7	1 min	
72	20 seg	
95	50 seg	3 ciclos
69.7	1 min	
72	20 seg	
94	1 min	25 ciclos
68.7	40 seg	
72	20 seg	
72	3 min	1 ciclo

Para verificar el tamaño de fragmento (245 pb) amplificado 5  $\mu$ l del producto se analizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Ésta se realizó a 90 V por 1.5 h, utilizando una cámara de electroforesis. El producto de PCR restante se purificó mediante un sistema de purificación de columnas.

### **3.1.9.2 Marcaje de las sondas**

Se ajustó la concentración de cada una de las sondas utilizadas en este trabajo: para detectar el elemento *IS6110* se utilizaron 800 ng del producto amplificado en un volumen de 40  $\mu$ l y para obtener la sonda de los marcadores se utilizó una mezcla de marcadores con pesos moleculares en el rango de 72 – 23,130pb (687.5ng de Lambda/Hind III y 128ng de PhiX174/Hae III) en un volumen final de 10  $\mu$ l. Las sondas se incubaron en un baño de agua a ebullición por 5 min e inmediatamente se colocaron en hielo por 5 min. A cada preparación se le agregó un volumen igual de reactivo de marcaje y glutaraldehído y se incubaron a 37 °C por 15 min en un baño de agua. Transcurrido el tiempo de la hibridación, la membrana se lavó 2 veces con 70 ml de buffer de lavado primario a 55 °C por 10 min y 2 veces más con 70 ml de buffer SSC 2X a 28 °C por 5 min. Para la detección de los fragmentos del elemento *IS6110* obtenidos y de los marcadores de peso molecular, la membrana se incubó por 2 min en 20 ml de una mezcla 1:1 de solución 1 (8.8 mg de luminol, 1.32 mg de ácido cumárico, 1M de Tris pH 8.5) y solución 2 (18 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1M de Tris pH 8.5). Se retiró el exceso de la mezcla de soluciones de la membrana y se colocó entre dos acetatos en un casete. Se

colocó una película radiográfica KODAK sobre la membrana y ésta se expuso por 5 min, se reveló utilizando los reactivos de revelado y fijación y se enjuagó y se secó al aire. Para la regeneración de la membrana, ésta se lavó con 100 ml de buffer de Strip (SSC 0.1X, SDS 0.1%) a 65 °C por 30 min, se enjuagó con SSC 2X, se dejó secar al aire y se almacenó a 4 °C.

Los patrones de bandas obtenidos fueron analizados mediante el programa Bionumerics (Applied Maths. Austin, E.E.U.U.), representados gráficamente por el método de grupos pareados usando promedios aritméticos (UPGMA) y el coeficiente Dice. La tolerancia de bandas fue ajustada al 1.9%. Un *cluster* fue definido como una serie de aislados con un 100% de similitud en los patrones de IS6110 obtenidos.

### **3.1.10 MIRU-VNTR**

La genotipificación de aislados de *M. tuberculosis* por MIRU-VNTR se desarrolló usando los oligonucleótidos correspondientes a los 15 *loci* descritos como los más polimórficos por Cardoso y Cols. en el 2007 (Tabla 2) (Cardoso, 2007).

**Tabla 2.** Secuencia de iniciadores y longitud de las unidades de repetición de los 15 *MIRU-VNTR* utilizados

<i>MIRU</i>	Iniciador	Secuencia de iniciador	Longitud de la unidad de repetición (pb)
4	A B	5'_GTCAAACAGGTCACAACGAGAGGAA 5'_CCTCCACAATCAACACACTGGTCAT	77
10	A B	5'_ACCGTCTTATCGGACTGCACTATCAA 5'_CACCTTGGTGATCAGCTACCTCGAT	53
16	A B	5'_GGTCCAGTCCAAGTACCTCAATGCT 5'_TGATTGCCCTGACCTACACCCGGTT	53
26	A B	5'_GGCGGATAGGTCTACCGTCGA 5'_GCCGTCCGGGTCATACAGCA	51
31	A B	5'_CGTCGAAGAGAGCCTCATCAATCAT 5'_AACCTGCTGACCGATGGCAATATC	53
40	A B	5'_GATTCCAACAAGACGCAGATCAAGA 5'_TCAGGTCTTTCTCTCACGCTCTCG	52
Mtub04	A B	5'_CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT 5'_GGCAGCAGAGCCCAGGATTCTTC	51
ETR C	A B	5'_CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT 5'_AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA	58
ETR A	B A	5'_AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT 5'_CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	75
QUB11b	A B	5'_CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG 5'_CGAAGTGAATGGTGGCAT	69
Mtub21	A B	5'_AGATCCCAGTTGTCGTCGTC 5'_CAACATCGCCTGGTTCTGTA	57
QUB26	B A	5'_AACGCTCAGCTGTCGGAT 5'_CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT	111
Mtub30	A B	5'_CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT 5'_ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA	58
Mtub39	A B	5'_CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC 5'_TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	58
QUB4156	A B	5'_TGACCACGGATTGCTCTAGT 5'_GCCGGCGTCCATGTT	59

La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando el kit de Taq polimerasa de BIOTECSA. La mezcla de PCR se preparó utilizando una concentración final de 1X de buffer, 0.2 mM de dNTPs, 4% de DMSO, 1.25 U de

Taq polimerasa, 3 ng de DNA de cada uno de los aislados de *M. tuberculosis* analizados, la concentración de iniciadores y MgCl<sub>2</sub> para cada *MIRU-VNTR* se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Concentración de iniciadores y MgCl<sub>2</sub> y temperatura de alineamiento para cada *MIRU-VNTR*.

<i>MIRU</i>	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Iniciadores (μM)	T °C
<i>MIRU</i> 10	1	0,4	55
<i>MIRU</i> 31	1	0,08	55
Mtub 04	1	0,4	73
ETR C	1	0,4	68,6
ETR A	1	0,4	67
QUB 11b	1	0,4	63,2
QUB 26	1	0,08	55,6
Mtub 39	1	0,4	70
<i>MIRU</i> 4	1,5	0,08	55
<i>MIRU</i> 16	1,5	0,08	57
<i>MIRU</i> 40	1,5	0,08	55
Mtub 21	1,5	0,4	68,6
<i>MIRU</i> 26	3	0,4	68
Mtub 30	3	0,4	74,5
QUB 4156	3	0,4	68,6

Las condiciones de PCR utilizadas para los *MIRU* 4, 10, 16, 26, 31, 40 fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a la temperatura de alineamiento indicada en la tabla 2 para cada uno de los *MIRU-VNTR*, 30 seg a 72 °C y 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Para los loci ETR A, ETR C, Mtub 04, Mtub 21, Mtub 30, Mtub 39, QUB 11b, QUB 26, QUB 4156 las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 15 min a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a la temperatura de alineamiento indicada en la tabla 2 para cada uno de los *MIRU-VNTR*, 30 seg a 72 °C y 1 ciclo de 10 min a 72 °C.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador T GRADIENT. Los fragmentos obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 2% (peso/Vol.). La separación de los productos amplificados se llevó a cabo a 100 V por 10 min, seguido de 2.5 h a 70 V y finalmente 10 min a 100 V. El análisis de los fragmentos obtenidos se realizó mediante el programa Gene Snap, obteniendo los valores de movilidad con base a los corrimientos de los marcadores moleculares de 50 pb utilizando el programa Gene Tools Molecular Biology Applications (Syngene, USA).

Se analizaron todas las cepas (120) tipificadas como *M. tuberculosis* y que fueron aisladas de pacientes con TBP, radicados en el AMM, atendidos en la mayor parte de las Unidades de Medicina Familiar del IMSS (70%) en el año 2006. En este estudio se incluyó una sola cepa aislada de cada paciente. Para el presente estudio y ulteriores análisis se acopió una base de datos con la información general de cada participante, y la respectiva información médica y socio-económica suficiente y pertinente.



## CAPITULO IV

### 4.1 RESULTADOS

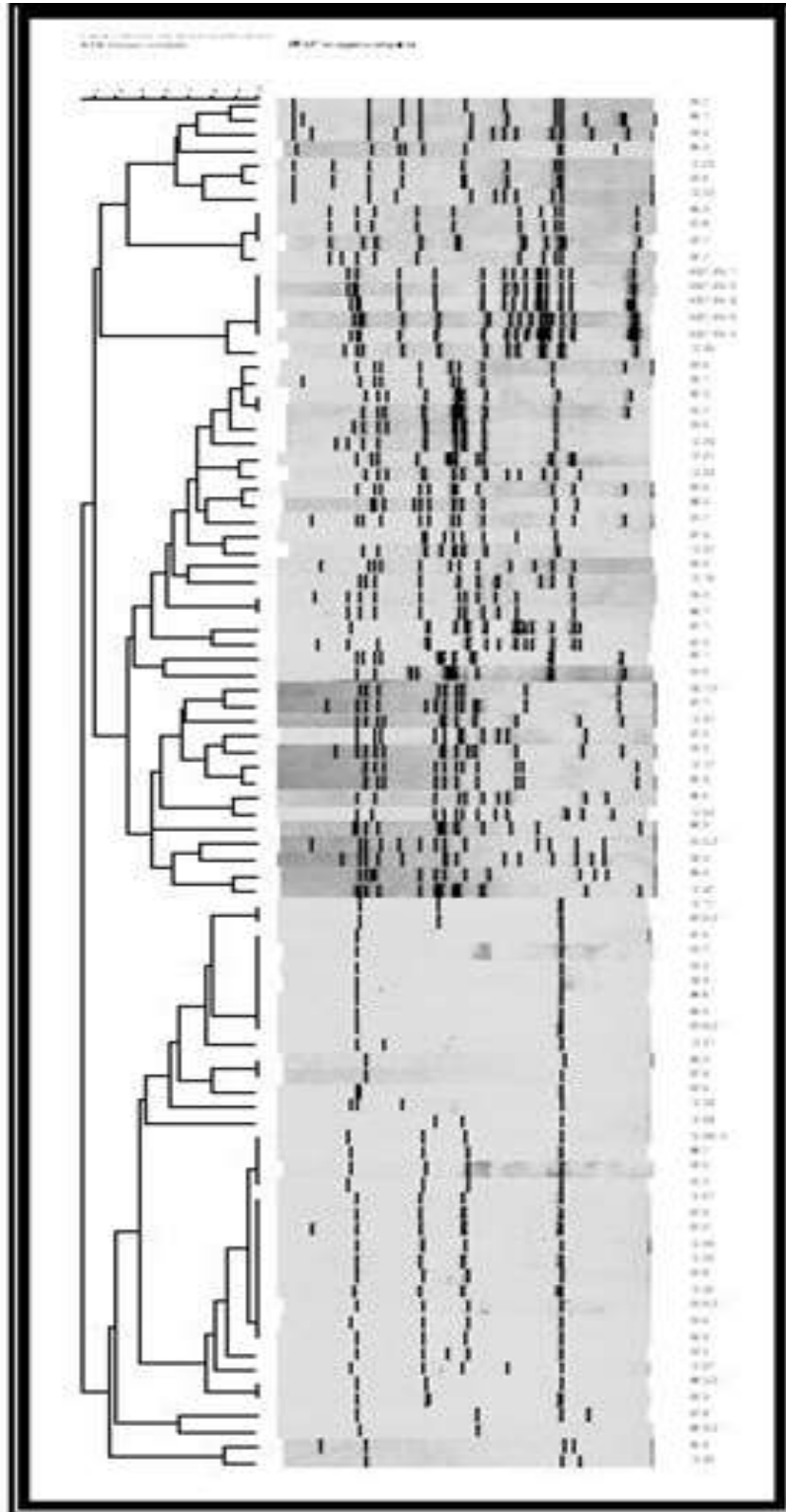
#### 4.1.1 Patrones Obtenidos por *spoligotyping*

Siguiendo la estrategia general propuesta originalmente, se analizó, mediante *spoligotyping* la totalidad de cepas recuperadas durante 2006 (120). De las 120 cepas, 84 (70%) formaron 16 *clusters* (tabla 7) y 36 (30%) mostraron patrones únicos. De los 16 *clusters* formados destacan 2 que agrupan el mayor número de casos (26 y 17), los cuales pertenecen a las familias X1 y T1 respectivamente, el resto de los *clusters* obtenidos agruparon de dos a cinco casos (Tabla 4). Las familias a las que pertenecen la mayoría de los *clusters* formados tienen una distribución mundial según la base de datos SpolDB4 (Tabla 5).

Dentro de las cepas analizadas por *spoligotyping* se obtuvo una cepa perteneciente a la familia Beijing, representada por la presencia de los últimos 9 espaciadores (35 a 43), la cual fue confirmada por la obtención de un fragmento de 641pb al realizar la amplificación por PCR del locus 26 utilizando la cepa perteneciente a esta familia según lo sugerido por Rajender Rao K. y Cols. en el 2006 (Figura 3) (Rajender, 2006).



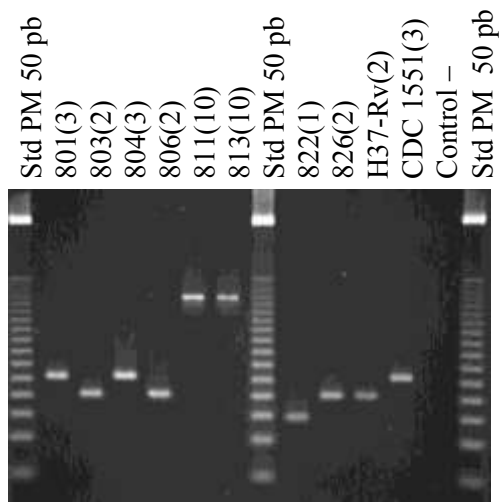




**Figura 4.** Análisis de los patrones de bandas de RFLP-IS6110 realizado con el software Bionumerics versión 2.0.

### 4.1.3 *MIRU-VNTR*

Las 31 cepas que permanecieron en *clusters* se analizaron utilizando el método de *MIRU-VNTR*, mediante el cual 15 (48%) de ellas permanecieron agrupadas en seis *clusters* y 16 (52%) presentaron patrones únicos (figura 5 y tablas 6 y 7).



**Figura 5.** Polimorfismos en el número de copias del locus *M.tub 21* en diferentes cepas de *M. tuberculosis*. Los polimorfismos corresponden a inserciones o deleciones de 57 pb. El número de repeticiones en tandem del locus *M.tub 21* para cada cepa se muestra entre paréntesis.

**Tabla 6.** Análisis de los patrones *MIRU-VNTR* de las cepas agrupadas en *clusters* por este método.

Cluster	Muestra	MIRU 4	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 26	MIRU 31	MIRU 40	Mtub 04	ETR C	ETR A	QUB 11b	Mtub 21	QUB 26	Mtub 30	Mtub 39	QUB 4156
		1	936	2 <sup>a</sup>	4	3	4	3	4	4	3	3	3	3	8	2
	1068	2 <sup>a</sup>	4	3	4	3	4	4	3	3	3	3	8	2	3	3
2	880-2	2 <sup>a</sup>	3	3	5	3	3	4	3	3	5	4	9	4	5	3
	823	2 <sup>a</sup>	3	3	5	3	3	4	3	3	5	4	9	4	5	3
3	997	2 <sup>a</sup>	3	3	5	3	3	4	3	3	5	4	9	4	3	3
	932	2 <sup>a</sup>	3	3	5	3	3	4	3	3	5	4	9	4	3	3
4	852	3	2	3	6	3	1	3	3	3	5	2	7	4	2	3
	918	3	2	3	6	3	1	3	3	3	5	2	7	4	2	3
5	803	2 <sup>a</sup>	3	4	3	3	2	2	4	2	4	2	6	2	2	2
	967	2 <sup>a</sup>	3	4	3	3	2	2	4	2	4	2	6	2	2	2
6	1061	2 <sup>a</sup>	4	3	5	3	4	4	3	3	2	3	3	4	3	3
	879	2 <sup>a</sup>	4	3	5	3	4	4	3	3	2	3	3	4	3	3
	810	2 <sup>a</sup>	4	3	5	3	4	4	3	3	2	3	3	4	3	3
	1020	2 <sup>a</sup>	4	3	5	3	4	4	3	3	2	3	3	4,2	3	3
	1040	2 <sup>a</sup>	4	3	5	3	4	4	3	3	2	3	3	4	3	3
	<b>H37 Rv</b>	3	3	2	3	3	1	2	4	3	5	2	5	2	5	2

**Tabla 7.** Casos agrupados en *cluster* utilizando la combinación de los 3 métodos de genotipificación (*spoligotyping*, RFLP-IS6110 y *MIRU-VNTR*).

(a) No. Cluster <i>Spoligotyping</i>	No. casos	(b) Clusters por RFLP-IS6110 a partir de (a)	No. casos	Clusters por MIRU-VNTR a partir de (b)	No. casos
1	26	1	2	1	2
		2	7	1	2
		3	4	1	2
		4	5		
2	2	-	-	-	-
3	17	1	2	1	2
4	2	-	-	-	-
5	5	-	-	-	-
6	3	1	2	1	2
7	4	1	2	-	-
8	4	1	2	-	-
9	2	-	-	-	-
10	2	-	-	-	-
11	2	-	-	-	-
12	3	-	-	-	-
13	2	-	-	-	-
14	3	-	-	-	-
15	5	1	5	1	5
16	2	-	-	-	-
16	84	9	31	6	15

#### 4.1.4 Análisis por RFLP- IS6110

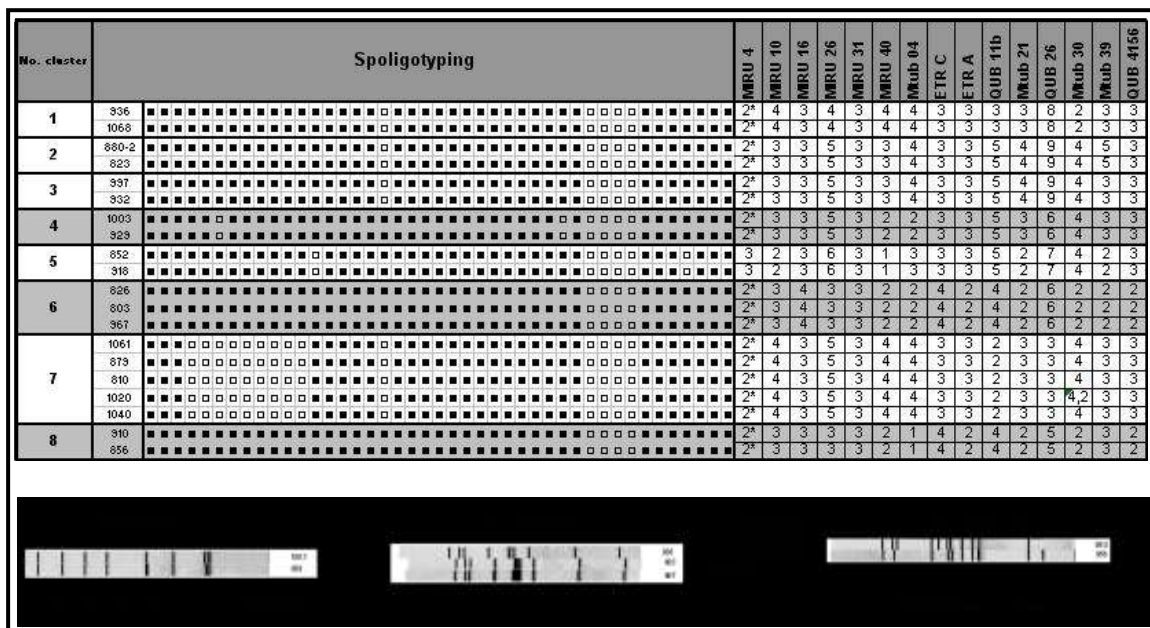
Se analizaron por RFLP-IS6110 las 84 cepas agrupadas por *spoligotyping* pero sin tomar en cuenta los *clusters* formados por este último. Se agruparon, 34 cepas en 9 *clusters*, observando que el método de RFLP-IS6110 incluye cepas con patrones de *spoligotyping* y *MIRU-VNTR* distintos. Sobre todo en cepas con cinco o menos copias de IS6110 (figura 6).





#### 4.1.5 Análisis por *spoligotyping* en combinación con *MIRU-VNTR*

Las 84 cepas agrupadas por *spoligotyping* fueron analizadas mediante la técnica de *MIRU-VNTR* como segundo método de genotipificación. Se agruparon 20 casos en ocho *clusters*. Las cepas agrupadas en cinco de estos *clusters* compartieron patrones de RFLP-IS6110 mientras que las agrupadas en los tres *clusters* restantes mostraron diferencias en el índice de similitud (cepas agrupadas en el *cluster* 4), migración (cepas agrupadas en *cluster* seis) y número de bandas (cepas agrupadas en *cluster* 8 (figura 7)).



**Figura 7.** *Clusters* formados por *spoligotyping* y *MIRU-VNTR* (arriba). Cepas agrupadas dentro de un mismo *cluster* con diferencias en los patrones de RFLP-IS6110 (abajo).

#### 4.1.6 Distribución geográfica de *clusters* verdaderos

Los casos considerados dentro *clusters* verdaderos fueron los 15 agrupados siguiendo la estrategia general de investigación (*spoligotyping*,

RFLP-IS6110 y *MIRU-VNTR*) además de los cinco casos adicionales agrupados utilizando *spoligotyping* en combinación con *MIRU-VNTR*, siendo estos un total de 20 (16.7%) casos agrupados en ocho *clusters* (Tabla 7), logrando discriminar así 100 (83.3%) de los 120 casos analizados los cuales no presentan una relación epidemiológica. Los casos agrupados en *clusters* verdaderos fueron localizados en el AMM, sin observar una relación geográfica aparente entre éstos (Figura 8).

**Tabla 8.** Casos agrupados en *clusters* verdaderos

Métodos utilizados	Cluster	No. casos
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>20</b>

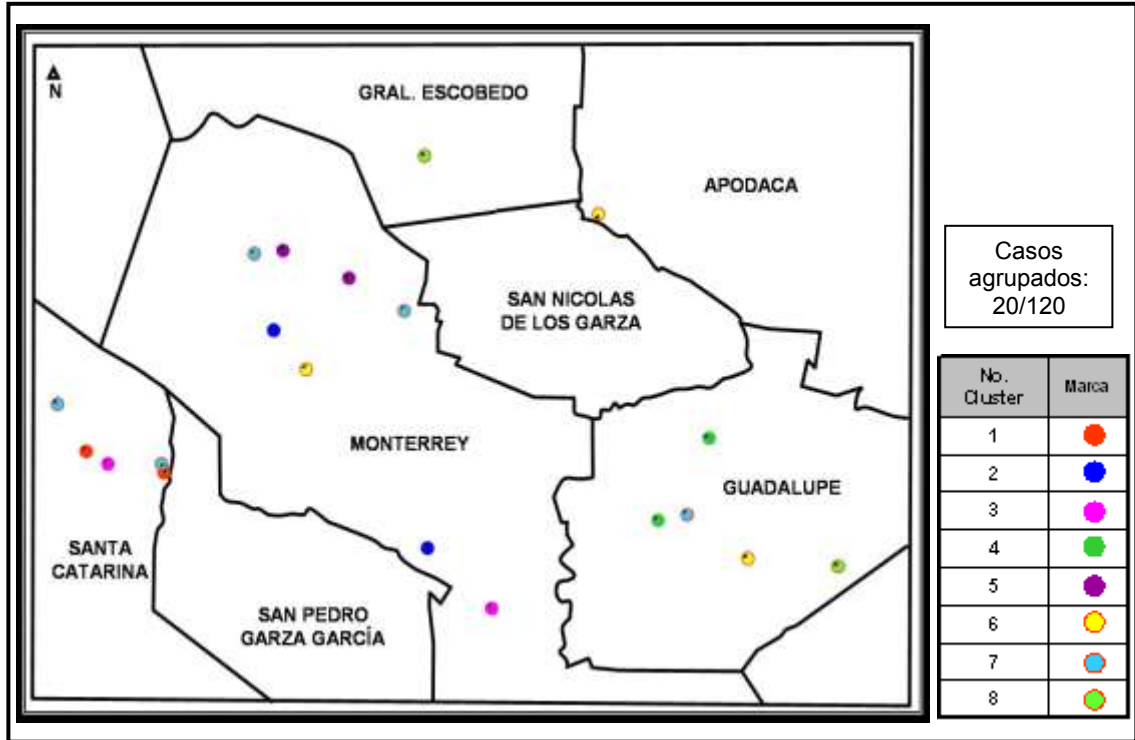
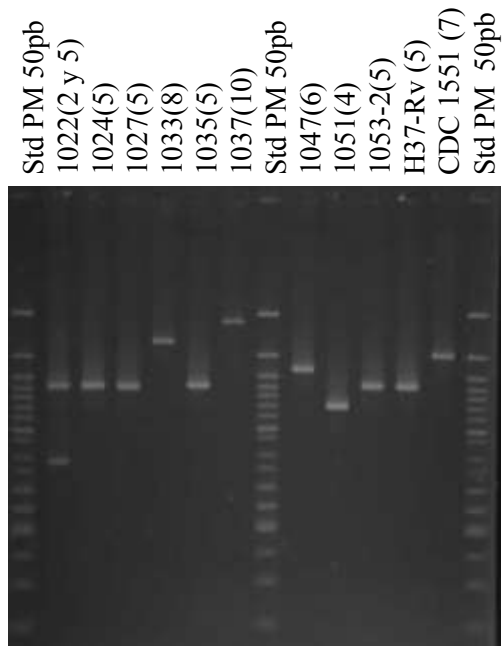


Figura 8. Localización geográfica de casos agrupados en *clusters* verdaderos.

#### 4.1.7 Variantes clonales en aislados clínicos.

Algunos aislados clínicos presentaron variantes clonales, las cuales pudieron ser visualizadas al utilizar el método de *MIRU-VNTR* y obtener más de un fragmento de amplificación en un aislado clínico al analizar un *locus* en particular. De las 84 cepas analizadas, siete presentaron dos fragmentos de amplificación para el *MIRU* 26, QUB 11b, QUB 26 (figura 9) o *Mtub* 30 y una cepa presentó tres fragmentos de amplificación distintos para el *Mtub* 39 (Tabla 9).



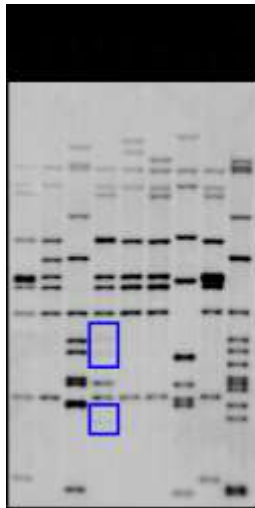
**Figura 9.** Polimorfismos en el número de copias del locus QUB 26 en diferentes cepas de *M. tuberculosis*. Los polimorfismos corresponden a inserciones o deleciones de 111 pb. El número de repeticiones en tandem del locus QUB 26 para cada cepa se muestra entre paréntesis, la cepa 1022 presenta dos fragmentos de amplificación para este locus que corresponden a dos y cinco repeticiones en tandem.

**Tabla 9.** Patrones de *MIRU-VNTR* de las cepas que presentaron variantes clonales.

No.	Muestra	MIRU 4	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 26	MIRU 31	MIRU 40	Mtub 04	ETR C	ETR A	QUB 11b	Mtub 21	QUB 26	Mtub 30	Mtub 39	QUB 4156
1	801	2*	4	2	5,4	3	1	4	2	2	4	3	4	2	1	2
2	836	2*	3	3	5	3	3	4	3	3	5,4	5	5	4	3	3
3	874	2*	3	4	5	3	2	2	3	2	3,2	2	5	2	3	2
4	1011	2*	3	3	5	3	3	4	3	3	4	3	8,6	4	3	3
5	1020	2*	4	3	5	3	4	4	3	3	2	3	3	4,2	3	3
6	1021	2*	3	2	5	3	1	1	3	3	4	4	8,5	4,2	3	3
7	1022	2*	2	4	5	3	2	2	4	2	4	2	5,2	2	3	2
8	1059	2*	3	2	5	3	4	4	3	3	3	3	8	2	6,5,4	3

Por medio del método de RFLP-IS6110, las variantes clonales se pueden distinguir mediante la presencia de bandas de baja intensidad. De las 8 muestras que presentaron variabilidad clonal por medio de *MIRU-VNTR*, solo

una mostró bandas de baja intensidad en los patrones de RFLP-IS6110 (figura 10).



**Figura 10.** Patrones de RFLP-IS6110 mostrando bandas de baja intensidad (recuadros) en una muestra con variabilidad clonal.

#### 4.1.8 Banco de DNAs y base de datos

Una vez realizados cada uno de los métodos de genotipificación se almacenaron los DNAs correspondientes a cada una de las cepas aisladas, así como a la cepa de referencia utilizada (H37-Rv) para la formación de un banco de DNAs.

Los datos y patrones obtenidos al analizar los resultados de cada uno de los métodos de genotipificación individuales y en combinación fueron respaldados para la formación de una base de datos.

## CAPITULO V

### 5.1 DISCUSIÓN

La genotipificación de *M. tuberculosis* contribuye al control de la TB al indicar posibles relaciones epidemiológicas entre casos de TB, detectar brotes de la enfermedad y contaminación cruzada en el laboratorio. Además, la genotipificación de diferentes cepas aisladas de un mismo individuo que ha sufrido recaídas permite distinguir entre cepas correspondientes a una reinfección exógena y a una reactivación endógena (Supply y Cols., 2006).

La técnica de *Spoligotyping* es el método más sencillo y económico de todos los empleados actualmente. Además, produce resultados claros y relativamente fáciles de analizar. El método de *spoligotyping* resulta simple al utilizar un *kit* comercial y requiere de poco tiempo para el análisis de resultados que pueden ser comparados con una base de datos internacional existente (SpolDB4). Sin embargo *spoligotyping* tiene un pobre poder de discriminación; entre otras razones, porque no permite detectar cambios recientes en las cepas aisladas, pero nos permite distinguir en un primer análisis las cepas que no tienen una relación epidemiológica. Se ha recomendado que *spoligotyping* se combine con otro método de genotipificación con un mayor poder de discriminación (Cowan y Cols. 2005).

El método de RFLP-*IS6110* es considerado el estándar de oro para la genotipificación de *M. tuberculosis*. Posiblemente porque es uno de los más utilizados en el mundo y porque se cuenta con bases de datos que pueden ser compartidas por diversos laboratorios para trazar las rutas de transmisión de determinadas cepas a través de regiones de un mismo país, de un continente o incluso del mundo entero. Sin embargo, este método es muy laborioso, requiere de un tiempo prolongado para cultivo de los aislados clínicos y una cantidad importante de DNA de buena calidad. Además es necesario utilizar para su análisis un *software* costoso y difícil de utilizar y son frecuentes los problemas de reproducibilidad e interpretación de resultados cuando se obtienen patrones de bandas muy complejos. Además, este método tiene un bajo poder de discriminación en cepas con cinco o menos copias del elemento *IS6110* (Supply y Cols., 2006; Cowan y Cols., 2005).

El método de *MIRU-VNTR* posee una especificidad mayor que el método de RFLP-*IS6110*; permite detectar la presencia de más de una cepa de *M. tuberculosis* en la misma muestra, y obtener resultados reproducibles fáciles de interpretar y de analizar. Existen dos formas de analizar *MIRU-VNTR*, mediante la utilización de geles de agarosa o mediante electroforesis capilar. El primer método es relativamente económico, pero es extremadamente laborioso. En el enfoque de análisis por medio de electroforesis capilar, es posible la realización de amplificaciones de las regiones de interés mediante PCR multiplex pero requiere un equipo muy costoso, que no es accesible a la mayor parte de los laboratorios de países en desarrollo.

En conclusión, ninguna de las técnicas arriba discutidas, y ninguna otra de las utilizadas actualmente para genotipificación ofrece un poder de discriminación del 100% confiable por sí sola. Considerando las debilidades y fortalezas de cada método, arriba discutidas, nosotros incluimos en nuestro estudio *spoligotyping*, RFLP-IS6110 y *MIRU-VNTR*, en ese orden.

Mediante *spoligotyping* identificamos dos grupos grandes, de 26 y 17 casos cada uno. Al comparar sus códigos binario y octal con los de la base de datos SpolDB4 observamos que estos pertenecen a las familias X1 y T1 respectivamente, las cuales se encuentran distribuidas entre los países con una mayor incidencia de TB reportada (WHO, 2007). Además, identificamos un nuevo genotipo el cual no ha sido reportado en la base de datos SpolDB4, por lo que es importante investigar si este proviene de otro lugar del mundo o bien es debido a la generación de una nueva familia aquí en México, lo cual tendría implicaciones epidemiológicas importantes, porque sería indicio de que las cepas de *M. tuberculosis* han seguido en México su propio camino evolutivo.

Entre las cepas analizadas mediante *spoligotyping* identificamos 36 (de 120) que presentaron patrones únicos. Por lo tanto éstas ya no fueron incluidas en los análisis subsecuentes. Cabe destacar que dentro estas cepas una de ellas presentó el patrón característico de la familia Beijing. Esta familia está asociada a multifármacorresistencia y a una alta mortalidad. La cepa Beijing



identificada en este estudio presenta resistencia a estreptomycin, uno de los fármacos de primera línea en el tratamiento de TB.

Los patrones característicos de la familia Beijing presentan únicamente los últimos 9 espaciadores (35 a 43). Esta familia resulta de gran importancia ya que ha sido asociada a una alta mortalidad y resistencia a fármacos y existe una gran preocupación de que esta familia pudiera estarse diseminando rápidamente alrededor del mundo debido a la alta movilización de personas y a la pandemia del VIH. Recientemente se ha reportado esta familia en diversas regiones alrededor del mundo (Glynn y Cols., 2002). Sin embargo, en muchos países de África, Asia y Latino América entre ellos México esta familia no ha sido descrita. Esto puede deberse a que en muchos laboratorios la técnica de *spoligotyping* no se realiza, a pesar de que esta técnica es considerada como el estándar de oro para la identificación de esta familia. Rajender y Cols. (2006) propusieron la amplificación por PCR del *locus* 26 como un método simple para la detección rápida de cepas de la familia Beijing. Este método amplifica específicamente un fragmento de 641 pb que representa siete copias de 51 pb más la secuencia que flanquea estas repeticiones al utilizar oligonucleótidos específicos para el locus 26 en el genoma de *M. tuberculosis* (Rajender y Cols., 2006). Nosotros realizamos la amplificación de este *locus* a la cepa Beijing identificada en el presente trabajo y obtuvimos el fragmento característico de esta familia, de 641 pb; lo cual confirma nuestro hallazgo.

Hasta donde nosotros sabemos, no se ha realizado en México un estudio tan completo de epidemiología de la TB basado en la genotipificación de *M. tuberculosis* como el que aquí se presenta. Los reportes han sido escasos y en ninguno de estos trabajos se incluyeron los tres métodos de genotipificación que nosotros usamos. Entre estos estudios se encuentra uno realizado por Yang y Cols. en Monterrey, N.L. (2001), en el que informaron que 47 de las 166 cepas analizadas presentaron cinco o menos copias de *IS6110* (Yang y Cols., 2001) y otro más realizado en la frontera de Estados Unidos con México por Quitugua y Cols. (2002) en el cual se utilizaron como métodos de genotipificación RFLP-*IS6110* y *spoligotyping*. Se reportó que 413 (45%) de los 919 casos estudiados se agruparon en 105 *clusters*; distribuidos en ambos lados de la frontera; lo que indica que la diseminación de cepas de *M. tuberculosis* ocurrió en ambos sentidos, de México hacia Estados Unidos y viceversa (Quitugua y Cols., 2002).

Diversos autores han propuesto que además de RFLP-*IS6110*, los métodos de *spoligotyping* y de *MIRU-VNTR* se requieren para lograr el mayor poder de discriminación, (Cowan y Cols., 2005; Cardoso y Cols., 2007). Acorde con esto, el análisis de *MIRU-VNTR* (*set* de 15 *loci*) que utilizamos en este trabajo como tercer método de genotipificación de las cepas que permanecieron agrupadas por los dos métodos anteriores (*spoligotyping* y RFLP-*IS6110*) permitió una agrupación más confiable de las 23 cepas con cinco o menos copias del elemento *IS6110* que originalmente agrupamos mediante RFLP-*IS6110*. De esta manera solo 11 cepas siguieron agrupadas en cuatro *clusters*.

Dos de las seis cepas con seis o más copias del elemento IS6110, que originalmente fueron agrupadas en tres *clusters* pudieron ser discriminadas por *MIRU-VNTR* y solo cuatro de ellas quedaron finalmente agrupadas en dos *clusters*.

Los métodos de *spoligotyping* y *MIRU-VNTR* por si solos no proveen un alto poder de discriminación; pero al combinarlos su poder de discriminación es similar al de RFLP-IS6110 (Cowan y Cols., 2005). Cardoso y Cols. (2007) refieren que al utilizar el método de *spoligotyping* en combinación con *MIRU-VNTR* (*set* de 15 *loci*) obtuvieron una sensibilidad y una especificidad del 100% en comparación con el método de RFLP-IS6110; el cual mostró una sensibilidad del 100% pero una especificidad del 95.8%. Por tales motivos, en este trabajo se realizó el análisis por medio de *spoligotyping* y *MIRU-VNTR* de las 84 cepas agrupadas inicialmente por *spoligotyping*, obteniendo dos *clusters* adicionales. Uno de ellos estaba formado por dos cepas con patrones similares de RFLP-IS6110 y que mostraban una diferencia entre sí de tres bandas. El segundo *cluster* también estaba formado por dos cepas que tenían el mismo número de bandas, pero con un índice de similitud de 93.3% entre sí. Además, se observó la adición de un caso más a un *cluster* que inicialmente agrupó dos cepas. Esta cepa adicional presentó el mismo número de bandas que las otras dos pero con un retraso en la migración de las mismas, por lo que su índice de similitud fue de 90.3% y 93.3% al ser comparadas con los patrones de RFLP-IS6110 de las cepas de ese *cluster*. Este hecho podría deberse a que los patrones de *spoligotyping* y *MIRU-VNTR* son más estables que los de RFLP-IS6110 (Cowan

y Cols., 2005; Mazars y Cols., 2001); ya que estos últimos presentan una estabilidad de aproximadamente dos a cuatro años (Cave y Cols., 1994; Niemann y Cols., 2000), mientras que los patrones de *MIRU-VNTR* presentan una estabilidad de aproximadamente seis años (Savine y Cols., 2002). Por otro lado, no se conoce con exactitud la estabilidad de los patrones de *spoligotyping*, aunque se ha propuesto que para que ocurra un cambio en estos patrones debe transcurrir un tiempo prolongado (Niemann y Cols., 1999; van Embden y Cols., 2000; de la Salmonie're y Cols., 1997). Por tal motivo al considerar patrones idénticos de RFLP-IS6110 como único criterio de inclusión de aislados en el mismo *cluster*, algunos aislados relacionados epidemiológicamente podrían ser erróneamente excluidos (Savine y Cols., 2002; Cowan y Cols., 2005).

En nuestro estudio logramos agrupar 15 casos en seis *clusters* por los tres métodos de genotipificación utilizados como estrategia general (*spoligotyping*, RFLP-IS6110 y *MIRU-VNTR*). El número de casos por *cluster* varía de dos a cinco y al utilizar solamente *spoligotyping* y *MIRU-VNTR* se lograron agrupar cinco casos más y dos *clusters* adicionales, siendo éstos un total de 20 casos agrupados en 8 *clusters*.

La agrupación en ocho *clusters* de solamente 20 de los 120 casos analizados indica una ausencia de grandes cadenas de transmisión de la TBP entre la población derechohabiente del IMSS radicada en la ciudad de Monterrey, N.L. y su área metropolitana.

Los casos agrupados en *clusters* fueron localizados geográficamente observado que estos no presentan una relación geográfica aparente, sin embargo, es necesario la realización de un estudio de campo para descartar o encontrar posible asociaciones entre estos.

En el presente estudio identificamos ocho cepas que presentaron diversos fragmentos de amplificación al analizar un *locus* en particular por *MIRU-VNTR*; lo cual indica la presencia de casos de infección con diferentes cepas. García y Cols. (2005) postularon que el análisis de *MIRU-VNTR* es un método rápido, simple y sensible para describir la complejidad clonal de cultivos de *M. tuberculosis*, porque este enfoque permite detectar mezclas de variantes clonales cuando éstas se encuentran en proporciones similares; o incluso cuando una de éstas se encuentra representando solamente el 1% de la población. En cambio, en el método de RFLP-*IS6110* la presencia de más de una variante en una mezcla se observa mediante bandas cuya intensidad depende de la proporción en que se encuentran estas variantes pero esto solamente ocurre cuando la clona en menor cantidad constituye del 10 al 30% de la población total (de Boer y Cols., 2000). De las ocho cepas que exhibieron variantes clonales en este trabajo, y que nosotros identificamos mediante el análisis de *MIRU-VNTR* solo una mostró algunas bandas de baja intensidad al analizar los patrones de RFLP-*IS6110*, las cuales pueden estar representando la variante de menor concentración. En cambio, por medio de *spoligotyping* no fue posible la identificación de policlonalidad, Esto fue debido a que la presencia

de ciertos espaciadores en unas cepas enmascara a las que carecen de éstos (García y Cols., 2005).

La presencia de variantes clonales en un mismo paciente puede deberse a las situaciones complejas encontradas en TB como recurrencias causadas por reinfecciones exógenas (Bandera y Cols., 2001; García y Cols., 2002) coinfección simultanea por más de una cepa de *M. tuberculosis* compartimentalización de la infección con diferentes cepas infectando diferentes tejidos y fenómenos de microevolución generando la aparición de variantes clonales dentro de un mismo hospedero (de Boer y Cols., 2000; García y Cols., 2004; García,2005).

La existencia de un banco de DNAs con cada una de las cepas analizadas nos permitirá la realización de estudios futuros sin la necesidad de aislar nuevamente estas cepas, permitiéndonos de esta manera optimizar el tiempo de los nuevos estudios.

La base de datos realizada al analizar nuestros resultados es un elemento muy valioso ya que nos permitirá ampliar nuestros estudios dentro de nuestra región y de nuestro país al permitirnos comparar resultados con los grupos de otras regiones del mundo.

## CAPITULO VI

### 6.1 CONCLUSIONES

- Los resultados de *spoligotyping* indican la existencia de dos grandes grupos pertenecientes a las familias X1 y T1 las cuales se encuentran distribuidas entre los países con una mayor incidencia de TB reportada.
- *Spoligotyping* nos permitió detectar la presencia de una cepa perteneciente a la familia Beijing entre la población derechohabiente del IMSS en el área metropolitana de Monterrey; lo cual nosotros confirmamos utilizando criterios adicionales, independientes de *spoligotyping*. La presencia en México de cepas Beijing no había sido reportada.
- Entre la población estudiada detectamos, mediante *spoligotyping* un genotipo nuevo no reportado en la base de datos SpolDB4.
- La combinación de tres métodos de genotipificación (*spoligotyping*, RFLP-IS6110 y *MIRU-VNTR*) permitió la agrupación de 15 cepas con una probable relación epidemiológica.
- El análisis con *spoligotyping* en combinación con *MIRU-VNTR* agrupó cinco casos adicionales no agrupados por RFLP-IS6110 al presentar patrones

similares pero con diferencias en la migración y número de bandas (índice de similitud menor al 100%)

- Los tres métodos de genotipificación utilizados en este trabajo (*spoligotyping*, RFLP-IS6110 y *MIRU-VNTR*) permitieron discriminar 100 de los 120 (83.3%) casos estudiados: Estos 100 casos, por tener patrones únicos con al menos uno de los tres métodos de genotipificación utilizados no presentan, por definición una relación genética, y por lo tanto tampoco epidemiológica.
- No existe una relación geográfica aparente entre los casos agrupados en *clusters*.
- Los resultados sugieren que la diversidad de genotipos representa la confluencia de cepas de diferente origen con una lenta diseminación en la población del estado y no brotes epidemiológicos aparentes.



## CONTRIBUCIÓN DE NUESTRO TRABAJO AL CAMPO DE ESTUDIO

### I. Modificación de la estrategia general de genotipificación, basada en nuestros resultados

Nuestros resultados indican que para realizar estudios de epidemiología molecular de TB debe utilizarse *spoligotyping* como primer método de tamizaje para identificar, en un solo paso, el mayor porcentaje posible de cepas de *M. tuberculosis* no relacionadas genotípicamente, por tener éstas patrones únicos.

Pensamos que *spoligotyping* debe ocupar el primer lugar en estudios de genotipificación porque es el método mas sencillo y rápido entre los disponibles actualmente y porque permite analizar los patrones más estables conocidos hasta la fecha, lo cual es una ventaja para analizar la evolución de las cepas, cuando se combina con otros métodos y porque ofrece la oportunidad de identificar cepas pertenecientes a la familia Beijing y de identificar nuevas familias.

En segunda instancia debe ser colocado el análisis de *MIRU-VNTR* y no el de RFLP-IS6110, como muchos otros autores han sugerido por las siguientes razones:

- 1) Los patrones de *MIRU-VNTR* son varios años más estables que los de RFLP-IS6110 pero menos que los de *spoligotyping* lo cual

constituye una herramienta muy útil para combinarla con los otros dos métodos de genotipificación para hacer estudios de evolución.

- 2) El análisis de *MIRU-VNTR* es relativamente más sencillo que el análisis de *RFLP-IS6110* y permite identificar otro porcentaje importante de cepas no relacionadas genéticamente.
  
- 3) El análisis de *MIRU-VNTR* es el mejor método para identificar la presencia de más de una cepa en un solo individuo, lo cual permite descartar ambigüedades al analizar los resultados obtenidos mediante *RFLP-IS6110*.

*RFLP-IS6110* debe utilizarse en tercer lugar, a pesar de estar considerado actualmente como el estándar de oro.

Las razones son las siguientes:

- 1) Es el método más laborioso y caro entre los tres mencionados aquí. Además, se requiere utilizar un *software* costoso y difícil de operar. Por lo tanto, mientras más reducido sea el número de cepas analizadas, más fácil, rápido y económico será el estudio. De esta manera solo deberán analizarse las cepas no discriminadas por los dos métodos anteriores.

- 2) En este mismo orden de ideas, *spoligotyping* y *MIRU-VNTR* tienen el poder de discriminar patrones únicos de cepas con cinco o menos bandas del elemento IS6110.
  
- 3) Por otro lado, los patrones de RFLP-IS6110 son los menos estables, por lo que ofrecen información muy valiosa sobre transmisiones relativamente recientes (ocurridas 4 años o menos antes de su aislamiento). Con estos resultados, combinados con los de *spoligotyping* y *MIRU-VNTR* puede realizarse un estudio muy completo e interesante sobre la evolución de las cepas. Tomando en cuenta que el criterio de “patrones únicos” obtenidos con cualquiera de los métodos aquí mencionados depende del porcentaje de divergencia entre cepas, pero evidentemente hay una relación epidemiológica si las cepas comparten los mismos patrones de *spoligotyping* y/o de *MIRU-VNTR*, lo cual sugiere que una población dada descende de una misma familia clasificada por *spoligotyping* y que las cepas divergieron con el paso del tiempo, lo cual puede manifestarse primero por poseer diferentes patrones de *MIRU-VNTR* y luego por divergir en los patrones del elemento IS6110.

Por último, sugerimos que se comparen los resultados obtenidos con los tres métodos de genotipificación utilizados de manera secuencial (*spoligotyping*, RFLP-IS6110 y *MIRU-VNTR*) con los casos agrupados utilizando la combinación

de *spoligotyping* y *MIRU-VNTR* porque nosotros encontramos que de esta manera pueden identificarse *clusters* verdaderos que incluyen casos que pudieron haberse perdido usando la secuencia de análisis clásica.

## **II. Ventajas que representa la existencia de la base de datos y el banco de DNA.**

1. Contar con una base de datos relativa a los resultados de *spoligotyping*, *RFLP-IS610* y *MIRU-VNTR* es muy valioso para ampliar nuestros estudios dentro de nuestra región y de nuestro país ya que nos permitirán comparar resultados con los grupos de otras regiones del mundo.

El banco de DNA de las aislados permitirá hacer numerosos estudios en el futuro relacionados con fámacorresistencia y otras características de las cepas circulantes en nuestra región.

## **PERSPECTIVAS**

1. Debido a que este proyecto es parte de un proyecto mayor denominado “Epidemiología molecular de la Tuberculosis en el AMM”, se pretende aumentar el número de casos en estudio.
2. Realizar el estudio de campo para confirmar la relación epidemiológica de los casos agrupados mediante una encuesta.

## REFERENCIAS

- Bandera A., A. Gori, L. Catozzi, A. Degli Esposti, G. Marchetti, C. Molteni, G. Ferrario, L. Codecasa, V. Penati, A. Matteelli and F. Franzetti.** 2001. Molecular Epidemiology Study of Exogenous Reinfection in an Area with Low Incidence of Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 39(6):2213-2218.
- Cardoso M., R. Diel, V. Vatin, W. Haas, S. Rush-Gerdes, C. Locht, S. Niemann and P. Supply.** 2007. Assessment of an Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing System Combined with Spoligotyping for Population-Based J. Clin. Microbiol. 45(3):691-697.
- Cave M. D., Eisenach K. D., G. Templeton, M. Salfinger, G. Mazurek, J. H. Bates, J. T. Crawford.** 1994. Stability of DNA Fingerprint Pattern Produced with IS6110 in Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 32(1):262-266.
- CENAVE** <http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/english/default.asp?id=info>
- Cole S., K. D. Eisenach, D. N. McMurray, W. R. Jacobs.** 2005. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. ASM PRESS.
- Corbett E. L., C. J. Watt, N. Walker, D. Maher, B. G. Williams, M. C. Raviglione and C. Dye.** 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch. Inter. Med.* 163:1009-1021.
- Cowan, L. S., L. Diem, T. Monson, P. Wand, D. Temporado, T.V. Oeming and J. T. Crawford.** 2005. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 43(2):688-695.
- Dale J. W., D. Brittain, A. A. Cataldi, D. Cousins, J. T. Crawford, J. Driscoll, H. Heersma, T. Lillebaek, T. Quitugua, N. Rastogi, R. A. Skuce, C. Sola, D. Van Soolingen, V. Vincent.** 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5(3):216-219.
- de Boer A. S., K. Kremer, M. W. Borgdorff, P. E. W. de Haas, H. F. Heersma and D. van Soolingen.** 2000. Genetic Heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Reflected in IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns as Low-Intensity Bands. *J. Clin. Microbiol.* 38(12):4478-4484.

- de la Salmonie're Y., H. Minh Li, G. Torrea, A. Bunschoten, J. van Embden and B. Gicquel.** 1997. Evaluation of Spoligotyping in a Study of the Transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 35(9):2210-2014.
- Eisenach K., J. Crawford, J. Bates.** 1988. Repetitive DNA Sequences as Probes for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 26(11):2240-2245.
- Frothingham R., H. G. Hills, and K. H. Wilson.** 1994. Extensive DNA Sequence Conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. J. Clin. Microbiol. 32(7):1639-1643.
- Frothingham R., W. Meeker-O'Connell.** 1998. Genetic Diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable number of tandem DNA repeats. Microbiol. 144:1189-1196.
- García de Viedma D., M. Marín, M. J. Ruiz and E. Bouza.** 2004. Analysis of Clonal Composition of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Primary Infections in Children. J. Clin. Microbiol. 42(8):3415-3418.
- García de Viedma D., M. Marín, S. Hernangómez, M. Díaz, M. J. Ruiz Serrano, L. Alcalá and E. Bouza.** 2002. Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection. Arch. Intern. Med. 162:1873-1879.
- García de Viedma D., N. Alonso Rodríguez, S. Andrés, M. J. Ruiz Serrano and E. Bouza.** 2005. Characterization of Clonal Complexity in tuberculosis by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing. J. Clin. Microbiol. 43(11):5660-5664.
- Glynn J. R, J. Whiteley, P. J. Bifani, K. Kremer, D. van Soolingen.** 2002 Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis. 8(8):843-9.
- Groenen P. M., A. E. Bunschoten, D. van Soolingen, J. D. A. van Embden.** 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. Mol. Microbiol. 10(5):1057-65.
- Campbell I. A. and O. Bah-Sow.** Pulmonary tuberculosis: diagnosis and treatment. *BMJ* 2006. 332. 1194-1197
- Institut Pasteur de la Guadeloupe.** 2006.  
<http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/spolddb4/spolddb4.pdf>

- Kamerbeek J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. J. Goyal, J. D. A. van Embden.** 1997. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35(4):907-914.
- Mazars E., S. Lesjean, A. L. Banuls, M. le Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Locht and P. Supply.** 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *PNAS.* 98(4):1901-1906.
- Niemann S., E. Richter and S. Ruschgerdes.** 1999. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism patterns and Spoligotypes Determined by Analyzing Serial Isolates from Patients with Drug-Resistant Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 37(2):409-412.
- Niemann S., E. Richter and S. Ruschgerdes.** 1999. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns and Spoligotypes Determined by Analyzing Serial Isolates from Patients with Drug-Resistant Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 37(2):409-412.
- Niemann S., S. Ruschgerdes, E. Richter, H. Thielen, H. Heykes-Uden and R. Diel.** 2000. Stability of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns of *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Actual Chains of Transmission. *J. Clin. Microbiol.* 38(7):2563-2567.
- Nolte F. S. y B. Metchck.** *Mycobacterium.* Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. ASM Press, Washington D.C. 1995 pp. 400-437.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993** para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud.
- Quitugua T. N., B. J. Seaworth, S. E. Weis, J. P. Taylor, J. S Gillette, I. I. Rosas, K. C. Jost, J., D. M. Magee and R. Cox.** 2002. Transmission of Drug-Resistant tuberculosis in Texas and Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 40(8):2716-2724.
- Rajender Rao K., N. Ahmed, S. Srinivas, L. A. Sechi and S. E. Hasnain.** 2006. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotypes on the basis of the *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Locus 26* Signature. *J. Clin. Microbiol.* 44(1):274-277.
- Savine E., R. M. Warren, G. D. van der Spuy, N. Beyers, P. D. van Helden, C. Locht, P. Supply.** 2002. Stability of Variable-Number Tandem Repeats of *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* from 12 Loci in Serial Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40(12):4561-4566.



**Secretaría de Salud.** 2005 Comunicado de prensa No 126. 15 de Marzo de 2005. <http://www.salud.gob.mx/>

**Secretaría de Salud.** Dirección General de Epidemiología. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. 2004 [www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx) Anuarios de morbilidad.

**Secretaría de Salud.** Dirección General de Epidemiología. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. 2006. [www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx) Anuarios de morbilidad.

**Secretaría de Salud.** <http://www.salud.gob.mx/>

**Secretaría de Salud.** Sistema Dirección General de Epidemiología Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. 2005. [www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx) Anuarios de morbilidad.

**Smith I.** *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. 2003. Clin. Microbiol. Reviews. 16(3):463-493.

**Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M. Fauville, Stefan Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht and D. van Soolingen.** 2006. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 44(12):4498-4510

**Supply, P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht.** 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J. Clin. Microbiol. 39:3563-3571.

The National Collaborating Centre for Chronic Conditions. 2006. Tuberculosis Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control.

**Thierry D., A. Brisson-Noël, V. Vincent-Lévy-Frédault, S. Nguyen, J. L. Guesdon J. L., Gicquel B.** 1990. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis Insertion Sequence, IS6110, and its Application in Diagnosis. J. Clin. Microbiol. 28(12):2668-2673.

**Thierry D., M. D. Cave, J. T. Eisenach, J. T. Crawford, J. H. Bates, B. Gicquel, J. L. Guesdon.** 1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nucleic Acids Research 18(1):188.

Todar's Online Textbook of Bacteriology. © 2005 Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology

**Valone S. E., E. A. Rich, R. S. Wallis, J. J. Ellner.** 1988. Expression of tumor necrosis factor in vitro by human mononuclear phagocytes stimulated with whole *Mycobacterium tuberculosis*, BCG, and mycobacterial antigens. *Infect. Immun* 56:3313-3315.

**van Embden J.D.A., M. Donald Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, P. M. Small.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized Methodology. *J. of Clin. Microbiol.* 31(2): 406-409.

**van Embden J. D. A., T. van Gorkom, K. Kremer, R. Cansen, B.A.M. van der Zeijst and L. M. Schouls.** 2000. Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria. *J. Bact.* 182(9):2393-2401.

**van Soolingen D., P. Hermans, P. de Haas, D. Soll, J. D. A. van Emden.** 1991. Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29(11):2578-2586.

**van Soolingen D., P. E. W. de Haas, P. W. M. Hermans and J. D. A. van Embden.** 1992. RFLP analysis of mycobacteria. Protocols MMB, National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven. Netherlands.

**WHO, 2006.** Global Combating HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria.2006

**WHO, 2006.** Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. World Health Organization, 2006.

**WHO, 2007.** Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. World Health Organization. 2007.

**WHO.**2003

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr25/es/index.htm>

**WHO.**2007 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.html>

**WHO.**2007 <http://www.who.int/tb/en/>

**WHO.2007.**

[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2007/pdf/key\\_findings.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/pdf/key_findings.pdf)

**Yang Z. H., A. Rendón, A. Flores, R. Medina, K. Ijaz, J. Llaca, K. D. Eisenach, J. H. Bates, A. Villarreal, M. D. Cave.** 2001. A clinical-based molecular epidemiologist study of tuberculosis in Monterrey, México. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5(4):313-320.