

115



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## USO DEL METODO DE "SPOLIGOTYPING" PARA GENOTIPIFICAR AISLADOS DEL COMPLEJO M. tuberculosis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

MARIA DOLORES SORIANO MUÑOZ

282493



IMSS

MEXICO, D. F.



INGENIEROS PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE	PROF. RAÚL GARZA VELASCO
VOCAL	PROF. MAITE ASTIGARRAGA ZAVALA
SECRETARIO	PROF. JOSÉ ANTONIO ENCISO MORENO
1er SUPLENTE	PROF. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ
2do SUPLENTE	PROF. MARÍA DE LOS ANGELES GRANADOS SILVESTRE

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Hospital de Pediatría. Laboratorio de Biología Molecular. Centro Médico Nacional Siglo XXI.

ASESOR DEL TEMA:  
DR. JOSÉ ANTONIO ENCISO MORENO



---

SUSTENTANTE:  
MARÍA DOLORES SORIANO MUÑOZ



---

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo que es el principio de muchos logros, a mis padres.*

*A ti papito:*

*Por amar a tu familia, porque tu amor me ha hecho fuerte, porque tú jamás me has fallado, por las noches de desvelo que pasamos juntos, por que siempre te has preocupado por mí, por ser el mejor padre del mundo, por haber tenido la fuerza y voluntad de superar la enfermedad y por que te amo mucho.*

*A ti mami:*

*Por creer en mí, por tu manera inteligente de orientarme, por apoyarme, por la tenacidad que pusiste para que yo terminara mi carrera, por hacerme ver cuando me equivoco, por estar junto a mí cuando te necesito, por todos los momentos que has compartido conmigo, porque te amo.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis otros papás Gabriel, Paco y Daniel:*

*Gracias por su apoyo, por sus consejos, por buscar que me supere, por enseñarme lo importante que es la familia, por preocuparse por mí, por cuidarme, por enseñarme a luchar por lo que quiero, por corregirme cuando me equivoco, por creer en mí. Los quiero y los admiro mucho.*

*A mis hermanas Carmen, Lupita y Angel:*

*Gracias por escucharme, por todo lo que han compartido conmigo, por estar siempre pendiente de mí, por enseñarme tantas cosas, por apoyarme, por transmitirme sus experiencias, las quiero mucho.*

*A mis cuñados Miguel y Ricardo:*

*Gracias por apoyarme, por preocuparse por la familia y por estar pendiente de mí.*

*Gracias a los traviesos:*

*Mariel, Jessy, Alex, Eduardo, Damián, Fernando y Martha Fernanda por sus sonrisas, sus gritos, sus juegos, sus travesuras y su inocencia.*

*A Victor:*

*Gracias por haber compartido conmigo esos años tan importantes de mi carrera, por que en esos años me hiciste feliz.*

*Gracias por haber estado siempre a mi lado cuando te necesité, por el amor y la confianza que me diste, por haber creído en mí, por haberme apoyado en la escuela, en la casa, con mi familia, con mis problemas, por haberme dejado ser una parte importante en tu vida.*

*Al Dr. José Antonio Enciso Moreno:*

*Gracias por el tiempo que dedicaste a este trabajo que es de ambos, por haberme enseñado no solo a realizar experimentos y ha escribir resultados, sino también la necesidad de amar las cosas que hago. Gracias por haber ido más allá de ser un asesor y ser un amigo, por todos tus consejos, por tus regaños, por el interés que pusiste en mi trabajo y en mi carrera.*

*A mis amigos de la escuela.*

*José Luis, Salomón, Anselmo, Gaby, Marisela, Julio Cesar y Javier por su compañía, por brindarme una amistad sincera, por su apoyo en la escuela y por los buenos momentos que hemos pasado.*

*A mis amigos:*

*Jorge y Norma por considerarme su amiga, por los buenos momentos que hemos pasado, por estar siempre al pendiente de mis problemas y por ser siempre tan alegres.*

*A mis compañeros de laboratorio:*

*Hilda, Mónica, Nancy, Norma, Laura y Reyna gracias por todo lo que me enseñaron, por su apoyo y por los momentos que compartieron conmigo.*

*Gracias al Q. F. B. Hugo Telléz:*

*Por haberme incluido en tu grupo de trabajo, por todo el apoyo que me has dado, por todo lo que me has enseñado, por hacerme reír siempre y por tu amistad. Te admiro mucho.*

*Al Dr. Victor Banda:*

*Gracias por la gran ayuda que me prestó durante la realización de este trabajo.*

*Al profesor Raúl Garza:*

*Por el interés que demostró en la revisión de mi tesis, por sus consejos y sugerencias, Por impartir la materia de Bacteriología con vocación y de manera excelente.*

*A la profesora Maite Astigarraga:*

*Por el tiempo dedicado en la revisión de mi tesis y sus aportaciones.*

*Al profesor Luciano Hernández por la amabilidad con que aceptó ser parte de mi jurado.*

*A la profesora: María de los Angeles Granados, por la amistad que me brindaste cuando realice mi servicio social y por aceptar ser parte de mi jurado.*

*Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo otorgado a través del proyecto No. 0796P-M9506*

*Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por haberme permitido realizar mi carrera y por ser una de las mejores universidades del país.*

## ÍNDICE

	PÁGINAS
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE GRÁFICAS	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	5
2.1 Clasificación de <i>M. tuberculosis</i>	5
2.2 Características del género <i>Mycobacterium</i>	5
2.3 Aspectos clínicos de la enfermedad	7
2.4 Epidemiología de la tuberculosis en el Mundo	10
2.5 Epidemiología de la tuberculosis en México	14
2.6 Multidrogorresistencia en cepas de <i>M. tuberculosis</i>	16
2.7 Inmunología de la tuberculosis	20
2.8 Métodos de diagnóstico e identificación	21
2.8.1 Métodos bacteriológicos	21
2.8.2 Identificación de micobacterias	22
2.9 Aplicación de técnicas moleculares a la epidemiología de la tuberculosis	24
2.9.1 Análisis de regiones polimórficas arregladas en "tandem" (MPTR)	25
2.9.2 Análisis de la secuencia polimórfica repetitiva rica en G-C (PGRS)	25
2.9.3 Análisis del DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR)	26
2.9.4 Análisis del polimorfismo de los patrones de restricción usando como sonda el <i>IS6110</i> (RFLP- <i>IS6110</i> )	28
2.9.5 Análisis del polimorfismo de los patrones de restricción usando como sonda la secuencia de repetición directa (RFLP-DR)	30
2.9.6 Análisis de tipificación utilizando oligonucleótidos espaciadores ("Spoligotyping").	31
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo general	36
4.2 Objetivos particulares	36

	PÁGINAS
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1 Muestras biológicas	37
5.2 Tratamiento de las muestras	37
5.3 Descontaminación de las muestras de pacientes con tuberculosis pulmonar	37
5.4 Cultivo de <i>M. tuberculosis</i>	38
5.4.1 Método radiométrico para el cultivo de <i>M. tuberculosis</i>	39
5.5 Extracción de DNA	40
5.6 Cuantificación de DNA	41
5.7 Amplificación de la región del locus DR por PCR	43
5.8 Electroforesis en gel de agarosa	45
5.9 Hibridación en fase reversa	46
5.10 Análisis de los patrones de hibridación	48
5.11 Análisis estadístico	48
6. RESULTADOS	53
6.1 Características de las cepas estudiadas	53
6.2 Amplificación por PCR	55
6.3 Hibridación en fase reversa	56
6.4 Análisis estadístico	57
6.5 Comparación entre el método de "Spoligotyping" y el método de RFLP- <i>IS6110</i>	58
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
8. CONCLUSIONES	78
9. RESUMEN	79
10. ABREVIATURAS	81
11. APÉNDICE	83
12. GLOSARIO	89
13. BIBLIOGRAFÍA	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINAS
Figura 1. Casos de tuberculosis en el mundo, acumulados en el período de 1990 a 1999.	11
Figura 2. Muertes de tuberculosis en el mundo acumuladas en el período de 1990 a 1999.	12
Figura 3. Estructura del locus DR en el genoma de <i>M. tuberculosis</i> y principio de su amplificación por PCR.	33
Figura 4. Estrategia experimental utilizada en el método de "Spoligotyping".	51
Figura 5. Representación esquemática de la hibridación en fase y revelado por quimioluminiscencia en ensayos de "Spoligotyping".	52
Figura 6. Productos de amplificación del locus DR de diferentes cepas del complejo <i>M. tuberculosis</i> .	60
Figura 7. Patrones de hibridación obtenidos por "Spoligotyping" a partir de cepas de <i>M. tuberculosis</i> .	61
Figura 8. Representación esquemática de los patrones de "Spoligotyping" obtenidos de 58 cepas de <i>M. tuberculosis</i> .	62
Figura 9. Dendrograma obtenido a partir de los patrones de "Spoligotyping" con el programa "SPSS".	63
Figura 10. Dendrograma obtenido de los patrones de RFLP con el programa "Gel Manager".	64
Figura 11. Estrategia experimental propuesta para genotipificar cepas del complejo <i>M. tuberculosis</i> .	77

## ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINAS
Tabla 1. Casos de tuberculosis en todas sus formas en México, acumulados hasta julio de 1999.	17
Tabla 2. Casos de tuberculosis en México por grupos de edad y localización, acumulados hasta julio de 1999.	18
Tabla 3. Curva patrón utilizada para la cuantificación de DNA.	42
Tabla 4. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación del locus DR.	43
Tabla 5. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción de PCR.	44
Tabla 6. Secuencia de los 43 oligonucleótidos espaciadores utilizados en la hibridación en fase reversa.	50
PÁGINAS	
Tabla 7. Principales características de las muestras analizadas	54

Tabla 8. Análisis de las 58 cepas de <i>M. tuberculosis</i> estudiadas, utilizando los métodos "Spoligotyping" y RFLP.	59
--	----

### ÍNDICE DE GRÁFICAS

	PÁGINAS
Gráfica 1. Proporción de casos de tuberculosis asociados al VIH, acumulados en el período de 1990 a 1999.	13
Gráfica 2. Métodos utilizados para el diagnóstico de tuberculosis en México en julio de 1999.	19

## 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa producida por el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>34, 60</sup>. El pulmón es el principal órgano afectado por esta micobacteria. La enfermedad se caracteriza por la formación de cavernas tuberculosas y produce daño irreversible a las vías respiratorias. Generalmente, la tuberculosis es transmitida de persona a persona por vía respiratoria<sup>26</sup> y son las personas con mayor probabilidad de contraer la enfermedad aquellas mal nutridas, alcohólicas e inmunodeprimidas<sup>3, 22</sup>.

La tuberculosis es considerada en la actualidad como una enfermedad emergente en todo el mundo<sup>61</sup>. Dentro de las principales razones del aumento en su incidencia están: el abandono del tratamiento, la aparición de cepas multidrogorresistentes (MDR) y el advenimiento del SIDA<sup>7, 62</sup>.

Datos recientes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), indican que en el mundo una persona se infecta cada segundo y que un tercio de la población mundial esta infectada, también se sabe que el 10% de las personas infectadas desarrollan la enfermedad<sup>63</sup>. La OMS estima que en la próxima década, 300 millones de personas estarán infectadas, 90 millones desarrollarán la enfermedad y 30 millones morirán a causa de la tuberculosis. En México, la tuberculosis ocupa el lugar número 15 como causa de mortalidad<sup>7, 25</sup>.

En la mayoría de los casos, el diagnóstico de tuberculosis se realiza por métodos que permiten la detección de bacilos ácido alcohol resistente (BAAR), como la técnica de Ziehl Neelsen. También se usa el cultivo del espécimen en

medios como el de Lowenstein Jensen <sup>32</sup>, y mediante los auxiliares en el diagnóstico de la tuberculosis tales como: historia clínica, radiografía del tórax y prueba de la tuberculina <sup>18</sup>. Sin embargo, el prolongado período de generación de *M. tuberculosis* hace que el diagnóstico sea lento, ya que depende del crecimiento del bacilo, obteniendo los resultados hasta 3 a 8 semanas después del diagnóstico clínico <sup>65</sup>.

Actualmente, se utilizan otros recursos diagnósticos como el método radiométrico BACTEC, para determinar el crecimiento de las micobacterias pertenecientes al complejo tuberculosis en tiempos más cortos que los cultivos tradicionales. Este método permite evaluar la sensibilidad a diversos antibióticos de primera línea. Por el método de BACTEC, los resultados de las pruebas de susceptibilidad a las drogas son obtenidos en 4 a 6 días, mientras que por los métodos convencionales, son necesarias de 2-4 semanas <sup>17</sup>. Otra alternativa de diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual caracteriza únicamente micobacterias del complejo, reconoce género y especie con gran sensibilidad y especificidad, aunque presenta el inconveniente de dar falsos positivos por problemas inherentes a la contaminación de las muestras clínicas, ya que en estas existe generalmente DNA (ácido desoxirribonucleico) de otras células o de las células del hospedador. El ensayo de PCR más usado detecta una secuencia de 123 pares de bases, localizada dentro de la secuencia de inserción *IS6110*, la cual se encuentra repetida en el genoma de *M. tuberculosis*.<sup>23</sup> Las ventajas de este método se resumen en que es confiable y rápido, por lo que se puede incorporar a la rutina de los laboratorios clínicos. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Grosset y Mouton<sup>30</sup>, se demostró que el ensayo de PCR proporciona un 97% de especificidad y entre un 80 a un 60% de sensibilidad con respecto a los

cultivos. La desventaja de este método, es el hecho de que puede existir contaminación en el laboratorio con DNA amplificado de PCRs previos<sup>44</sup>. Otras posibles fuentes de error en ensayos por PCR son debidas a: presencia de inhibidores en el espécimen, terapia antituberculosa e hibridación no específica<sup>12</sup>. Por otro lado, la identificación de antígenos de *M. tuberculosis* ó de anticuerpos contra estas micobacterias en fluidos biológicos por ELISA (ensayo inmunoenzimático en placa sólida), puede ser útil en el diagnóstico temprano de tuberculosis extrapulmonar en muestras de líquido cefalorraquídeo o de ascitis, pero tiene limitado uso en muestras de expectoración y nula eficiencia y especificidad en muestras de suero<sup>7</sup>.

Otra forma para caracterizar a las micobacterias es la genotipificación de aislados. Entre los métodos conocidos para tipificar se encuentran: el RFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), que utiliza como sonda la secuencia de inserción *IS6110*, el análisis de PGRS (Polimorfismo en la secuencia repetitiva rica en GC), el análisis por RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar) y el "Spoligotyping" (tipificación por oligonucleótidos espaciadores)<sup>35, 45, 75, 76</sup>.

El método más ampliamente utilizado es el RFLP, ya que ha demostrado tener un alto poder discriminatorio para diferenciar cepas de *M. tuberculosis*<sup>1, 27, 35, 40, 69, 75</sup>. Aunque el método es reproducible y ha llegado a establecerse como un método estándar para la tipificación de cepas de *M. tuberculosis* en muchos laboratorios, existen cepas de *M. tuberculosis* que tienen un bajo número de copias del fragmento *IS6110*. En estos casos, no es posible hacer una adecuada tipificación. Además, es costoso y su proceso requiere de habilidad técnica y recursos regularmente no disponibles en un laboratorio clínico tradicional<sup>1, 16, 35, 75, 76</sup>.

Como una alternativa para la genotipificación de cepas se encuentra el método de "Spoligotyping". Este método permite diferenciar cepas con bajo número de copias del fragmento *IS6110*, además de que puede distinguir las especies de *M. bovis* y de *M. tuberculosis*.<sup>33, 35, 41</sup> Este método se ha caracterizado por ser rápido, sencillo y económico, además de que requiere mínimas cantidades de DNA. A pesar de sus bondades, el método de "Spoligotyping" requiere ser evaluado en comparación con el método de RFLP, ya que en el "Spoligotyping" solo se analiza el polimorfismo del locus DR, mientras que en el RFLP se analiza la localización del *IS6110* en todo el genoma de la micobacteria. Hayward y Watson<sup>35</sup>, hicieron un análisis acerca de la interpretación de los resultados por "Spoligotyping", determinando que cuando se observan cepas con diferentes patrones de "Spoligotyping", se puede asumir que representan diferentes genotipos. Aunque los grupos de cepas con patrones indistinguibles por "Spoligotyping" pueden representar grupos de cepas de reciente transmisión, también puede ocurrir que las similitudes genéticas ocurran porque las cepas comparten un antecesor común distante. Es por ello que el "Spoligotyping" requiere ser analizado más profundamente para conocer su potencial para genotipificar. Así, es necesario que el "Spoligotyping" sea aplicado a un mayor número de cepas de *M. tuberculosis* de distintas regiones geográficas.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 Clasificación de *M. tuberculosis*

La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa, crónica, de duración muy larga que ataca al hombre <sup>34</sup>. Esta enfermedad es producida por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* que incluye las especies de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*. <sup>7</sup>.

La tuberculosis se caracteriza por la formación de granulomas en los tejidos infectados y por producir hipersensibilidad mediada por células, por la acumulación de un gran número de macrófagos activados en la zona de lesión primaria <sup>34</sup>.

En su forma sistémica activa, la tuberculosis afecta diversos órganos y tejidos, por lo que puede ocurrir una afección linfática, meníngea, genitourinaria, arterial, también puede producir osteomielitis, diseminación hiliar e infecciones en peritoneo y pleura. Sin embargo, la enfermedad pulmonar es la presentación clínica más frecuente <sup>18</sup>.

### 2.2 Características del género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* pertenece al orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae*. Las especies principales de este género son: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. leprae* y *M. smegmatis* <sup>24</sup>. Las micobacterias son procariotes cuya pared celular está compuesta esencialmente por dos tipos de polímeros, el arábino galactano micolato y el peptidoglicano <sup>81</sup>. Aproximadamente, del 20 al 40% del peso seco de las micobacterias son lípidos de la pared celular, principalmente constituidos por ácidos micólicos, ácidos

grasos ramificados hidroxilados de cadena larga, glucolípidos, triglicéridos, sulfolípidos y lipoproteínas<sup>7, 24, 34</sup>.

La composición química de la pared celular de las micobacterias, determina que sean extremadamente resistentes a la desecación y a la acción de los ácidos, álcalis y oxidantes diluidos. Además, esta composición compleja influye en que se desarrollen lentamente, que requieran nutrimentos especiales, que no se tiñan fácilmente con las tinciones simples como la de gram y que resistan a la decoloración con alcohol ácido<sup>24, 81</sup>. Esta última característica permite identificar a las micobacterias por medio de las tinciones de Ziehl Neelsen, auramina-rodamina y Kinyoun<sup>11, 51</sup>. No obstante, la ácido resistencia también la presentan otras especies distintas a las micobacterias como son las especies de *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Legionella micdadei* y los protozoos *Isospora* y *Cryptosporidium*<sup>34, 47</sup>, por lo que este método no es totalmente confiable.

Las micobacterias son bacilos delgados, rectos o ligeramente curvos, que miden de 1-4  $\mu$  de largo por 0.3-0.6  $\mu$  de ancho, se presentan solos o en pequeños agregados. Son bacilos no esporulados, no capsulados e inmóviles<sup>20, 51</sup>. Sus colonias son de 2-5 mm de diámetro, de color amarillo mate, con bordes irregulares y aspecto granular<sup>24</sup>.

Para su crecimiento, las micobacterias requieren una concentración de CO<sub>2</sub> del 5-10%, esta concentración de CO<sub>2</sub> les proporciona un ambiente húmedo que les permite sintetizar sus lípidos. Son aerobias estrictas, su temperatura óptima de crecimiento es de 35 °C, su pH óptimo de crecimiento es de 7 y un cultivo tarda en crecer entre los 15 y 25 días<sup>24</sup>. El tiempo de duplicación de los bacilos es de 15 a 20 horas en condiciones de cultivo y este es también el tiempo de generación en vivo calculado a partir de animales experimentales

infectados <sup>81</sup>. Entre los modelos animales que se han usado para el estudio de la infección de tuberculosis se encuentran: el ratón, el cobayo y el conejo. Otros animales mamíferos también se han utilizado como modelos de infección, como son monos, borregos, cabras, cerdos, embriones de pollo, elefantes, búfalos, perros y gatos, pero por razones de costo y manejo no se usan habitualmente<sup>9</sup>.

60.

Los medios más adecuados para lograr un buen crecimiento de las micobacterias con morfología colonial reproducible, desarrollo de características y una baja relación de contaminación, incluyen los medios sólidos Middlebrook 7H10 y 7H11, medios sólidos con base de huevo como el Lowenstein Jensen, el Wallenstein y medios líquidos como el medio BACTEC 12B y Caldo Middlebrook 12B <sup>11</sup>.

### **2.3 Aspectos clínicos de la enfermedad**

Gutierrez y López<sup>32</sup>, describen que la primoinfección o infección primaria, puede pasar inadvertida o confundirse con un cuadro respiratorio y acompañarse de un proceso meningítico de difícil tratamiento. Por otro lado, la infección secundaria produce generalmente pérdida de peso, fatiga, anorexia y febrícula vespertina. Este cuadro puede acompañarse de cierta disnea y tos acompañada en ocasiones de esputo hemoptísico. Cuando la enfermedad se ha establecido en el pulmón, se produce un granuloma tuberculoso que puede calcificar o en el peor de los casos, cuando la necrosis caseosa se extiende, puede producir supuración. El aparato urinario puede presentar cuadros de esterilidad, tumoración palpable, síntomas urinarios, etc. En el esqueleto, la tuberculosis produce lesiones destructivas que tienden a fistulizarse. En el sistema nervioso usualmente aparece como una meningitis basal y ataca a los

pares craneales y puede producir ceguera.

La transmisión de *M. tuberculosis* es de persona a persona por vía respiratoria a través de las secreciones respiratorias. En estas secreciones, los bacilos tuberculosos forman los núcleos de las gotitas de líquidos expulsados al toser, estornudar o hablar. Los aerosoles expulsados se evaporan a poca distancia de la boca y seguidamente, los bacilos desecados persisten viables en el aire por largo tiempo infectando a otros individuos <sup>26</sup>.

Gutiérrez y López<sup>32</sup>, afirman que la vía de entrada más frecuente de las micobacterias es el aparato respiratorio y que la infección inicial se localiza en el pulmón. Sin embargo, estos autores indican otras vías de entrada poco frecuentes, como la orina o las heces fecales, a través de alguna pequeña lesión de la piel y por medio de objetos contaminados con el bacilo. La tuberculosis puede también adquirirse por vía digestiva, cuando se ingiere leche de vacas infectadas con *M. bovis* <sup>34, 81</sup>, aunque esta micobacteria está más relacionada con infección en personas inmunocompetentes.

El período de incubación de este bacilo varía de 1 a 3 meses pero puede ser mayor. Clínicamente los signos de la enfermedad aparecen en los primeros 6 a 12 meses después de la infección y la mayoría de los enfermos dejan de ser contagiosos a los 15 días de iniciar la quimioterapia apropiada, ya que generalmente disminuye la tos y por lo tanto el número de microorganismos expulsados de pacientes en los que funciona el tratamiento <sup>14</sup>.

Zinsser<sup>81</sup>, numeró a los factores de riesgo para el desarrollo de tuberculosis luego de la infección directa de persona a persona. Así incluyó edad, sexo, hábito corporal y susceptibilidad genética, que son características intrínsecas del individuo. El mismo afirma que la infección tuberculosa aparece con mayor frecuencia en las clases socioeconómicas bajas, siendo

característica de la pobreza, la desnutrición, la aglomeración humana y las malas condiciones de higiene.

Generalmente, los grupos más afectados son aquellos con desnutrición, inmunodepresión, alcoholismo, drogadicción, diabetes mellitus tipo I, carcinoma de la cabeza y el cuello, VIH positivos y las personas en los extremos de la vida (menores de 5 años y mayores de 60 años), otros grupos comúnmente afectados son médicos, personal de hospitales y aquellos que están expuestos a la inhalación de polvo de sílice <sup>3, 20, 39, 63</sup>. Sin embargo, debido a problemas de tratamiento inadecuado o incompleto, la enfermedad trae consigo la selección de formas multirresistentes, aumentando la probabilidad de contagio de individuos inmunocompetentes. En particular, la frecuencia de la enfermedad ha aumentado en las personas que laboran en el área de la salud (médicos, enfermeras, personal de laboratorio y anfiteatro) <sup>59</sup>.

A la fecha no se ha identificado un antígeno, una toxina, una endotoxina o algún mecanismo que pueda explicar la virulencia de la micobacteria <sup>20, 81</sup>. Sin embargo, se han observado características que se asocian con la capacidad de la bacteria de producir enfermedad. Por ejemplo, los lípidos de la pared celular de la micobacteria pueden ejercer una función de virulencia de la cepa infectante y también pueden influir en la respuesta inmunológica. Así, el glucolípido denominado "factor cordón" se ha involucrado con la virulencia. Este compuesto es tóxico por sí solo, *in vitro* inhibe la migración de leucocitos polimorfonucleares, y aunque no contribuye directamente al proceso infeccioso, aumenta el efecto tóxico de los sulfolípidos. Sin embargo, la correlación entre sulfolípidos y virulencia no es absoluta, por lo que se ha sugerido que deben contribuir otros factores, por ejemplo los polisacáridos del bacilo también contribuyen a la inmunidad <sup>32</sup>.

## 2.4 Epidemiología de la tuberculosis en el mundo

Debido a su amplia diseminación, la tuberculosis representa un problema mundial de salud pública. Se estima que una tercera parte de la población mundial es portadora del bacilo de la tuberculosis (1, 722 millones), pero solamente el 10% de ella desarrolla la enfermedad <sup>43, 71</sup>. La OMS estima que hay 8 millones de casos nuevos y 3 millones de muertes atribuidas cada año a la tuberculosis <sup>47</sup>. En 1995 ocurrieron en el mundo más de nueve millones de casos nuevos de tuberculosis, y tres millones de muertes tuvieron como causa este padecimiento. Estas muertes corresponden al 25 % de todas las muertes evitables en países en vías de desarrollo, donde tienen lugar el 95 % de los casos de tuberculosis y 98 % de las muertes en grupos de edad económicamente productiva, entre los 15 y los 50 años <sup>56</sup>.

La OMS ha estimado que en el período de 1990 a 1999, hubo aproximadamente 90 millones de casos de tuberculosis en el mundo (figura 1), con aproximadamente 30 millones de muertes (figura 2). Aunque la epidemia del VIH ha tenido un modesto impacto en la tasa en años anteriores, el efecto de la pandemia del VIH se supone será mayor en los siguientes años, ya que la tendencia va en asenso, como se puede observar en la gráfica 1 <sup>73</sup>. Estos datos concuerdan con un estimado realizado por Dolin<sup>21</sup>, en donde se calculó que existían en el mundo durante los años noventa, 88 millones de nuevos casos de tuberculosis, 30 millones de muertes predecibles y 8 millones de casos asociados con el VIH.

Los factores asociados con la incidencia de la tuberculosis en países

desarrollados incluyen la epidemia del VIH, la migración de áreas endémicas, el deterioro de la infraestructura de salud, con la concomitante terapia antituberculosa incompleta, la transmisión en ambientes de alto riesgo y un incremento de los casos de tuberculosis drogoresistente <sup>47</sup>.

## 2.5 Epidemiología de la tuberculosis en México

En México y de acuerdo con la reforma del Sector Salud en 1995, la tuberculosis es un problema prioritario que debe enfrentarse con un programa nacional de carácter urgente, siguiendo los lineamientos establecidos a nivel mundial por la OMS <sup>56</sup>.

El problema de la tuberculosis (tanto en México como en el mundo) ha recibido insuficiente atención, ya que hace 116 años que Robert Koch identificó al bacilo de la tuberculosis y las herramientas para el control de la enfermedad (como la quimioterapia, que se emplea desde hace unos 50 años, la vacuna BCG, la radiografía del tórax, la bacteriología y la prueba de la tuberculina, cuyo uso es aún más antiguo) siguen vigentes. Al momento no se han desarrollado otros medicamentos o vacunas más eficaces, ni métodos más sensibles y específicos para el diagnóstico, que puedan ser aplicables a grandes grupos de población <sup>18, 50</sup>. Así que en mi opinión, el verdadero problema de la tuberculosis es el establecimiento inadecuado de programas de control.

Santin<sup>62</sup> informó a este respecto, destacando que tanto la Secretaría de Salud (SS) como la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) a partir de 1996, han delineado y aplicado un tratamiento intensivo de seis meses en lugar de tres años. Este programa es llamado Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado ó TAES. De acuerdo

con Ramírez<sup>59</sup>, TAES es una medida terapéutica que permite lograr la curación de la tuberculosis en más del 85 % de los casos. Sin embargo, la inadecuada organización de los servicios de salud ha propiciado que la supervisión de TAES tenga una eficiencia inferior a 65 %, lo que representa un gran problema para el control de esta enfermedad en países endémicos

Aunado a lo anterior, el registro de datos clínicos y epidemiológicos en México presenta serios problemas, lo que impide elaborar informes adecuados acerca de la morbilidad y mortalidad producida por tuberculosis pulmonar.

Al igual que en otros países, esto ocurre también por la carencia de marcadores específicos de especie, los cuales son necesarios en estudios epidemiológicos para diferenciar el origen de los cepas de *M. tuberculosis*, principalmente de aquellos que permitan diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*<sup>7,45</sup>.

De los reportes obtenidos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en 1999 (tabla 1), la distribución de casos con tuberculosis en todas sus formas se dio principalmente en los estados de Baja California, Colima, Chiapas, Guerrero, Nayarit, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz. La incidencia más alta se localizó en los estados de Guerrero, Tabasco y Tamaulipas, con un valor mayor al 9.55 por cada 100 mil habitantes.

En la tabla 2, se puede observar la relación entre los casos de tuberculosis y la edad, así como la habida entre los casos de tuberculosis y su localización anatómica acumulados hasta junio de 1999. Como se observa el grupo de edad con más casos de tuberculosis en 1999, fue el económicamente productivo, con 1,436 personas entre los 25-44 años y 1,067 personas de los 45 a 64 años. La región anatómica más frecuente fue la pulmonar con el de 89.8 % del total de casos.

En ese mismo año de 1999 y de acuerdo al Sistema Nacional de Referencia Epidemiológica, el método diagnóstico realizado en México con mayor frecuencia fue el de baciloscopia, alcanzando el 74.58 % (gráfica 2). Esto es congruente con los reportes que indican que en la actualidad no se han establecido nuevos métodos de diagnóstico, útiles para grandes grupos de poblaciones.

## 2.6 Multidrogorresistencia en cepas de *M. tuberculosis*

Un problema extremadamente serio de la tuberculosis consiste en la aparición de cepas multidrogorresistentes (MDR) de *M. tuberculosis*. Las personas con alto riesgo para adquirir tuberculosis multidrogorresistente (MDR-TB) son las inmunocomprometidas por padecer de VIH, las que abandonaron la toma de los medicamentos prescritos, los tuberculosos con un régimen de tratamiento inefectivo y los previamente tratados por haber contraído la infección anteriormente; también se han reportado brotes de MDR-TB en hospitales y prisiones<sup>28,52</sup>.

La multidrogorresistencia de cepas de *M. tuberculosis* es principalmente consecuencia de mutaciones naturales que las micobacterias presentan<sup>52</sup>. Por ello varios grupos de investigadores en el mundo están enfocados a la identificación y caracterización de marcadores responsables de la resistencia de *M. tuberculosis*<sup>13</sup>, ya que el fenotipo que las micobacterias exhiben y en el cual se basan los métodos de serotipificación, genera problemas por su incapacidad para obtener resultados reproducibles, además de la complejidad de los mecanismos que generan drogorresistencia. Por lo cual existe la necesidad de desarrollar resultados rápidos y confiables que permitan elegir un tratamiento antituberculoso adecuado<sup>45,52</sup>.

Tuberculosis en todas sus formas

Entidad	Casos de		Incidencia*
	junio	Casos acumulados	
Aguascalientes	5	24	2.60
Baja California	26	266	10.92
Baja California Sur	1	17	3.93
Campeche	2	21	3.03
Coahuila	4	73	3.15
Colima	8	48	9.55
Chiapas	16	282	7.04
Chihuahua	6	89	2.92
Distrito Federal	9	196	2.47
Durango	4	65	4.46
Guanajuato	8	72	1.53
Guerrero	32	463	15.59
Hidalgo	8	134	6.02
Jalisco	7	180	2.71
México	24	314	2.31
Michoacán	n.e.	97	2.46
Morelos	n.e.	58	3.90
Nayarit	11	91	9.88
Nuevo León	n.e.	62	1.67
Oaxaca	n.e.	59	1.67
Puebla	n.e.	67	1.30
Querétaro	n.e.	21	1.54
Quintana Roo	1	33	4.08
San Luis Potosí	5	101	4.31
Sinaloa	2	147	5.89
Sonora	8	136	6.17
Tabasco	25	206	11.25
Tamaulipas	33	290	10.76
Tlaxcala	7	22	2.27
Veracruz	81	734	9.94
Yucatán	3	42	2.61
Zacatecas	n.e.	7	0.51
<b>Total</b>	<b>336</b>	<b>4,417</b>	<b>4.52</b>

Tabla No. 1 Casos de tuberculosis en México en todas sus formas, acumulado hasta julio de 1999.

FUENTE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín Sistema Único de Información 1999, vol.16, no.30, semana 30, del 25 al 31 de julio.

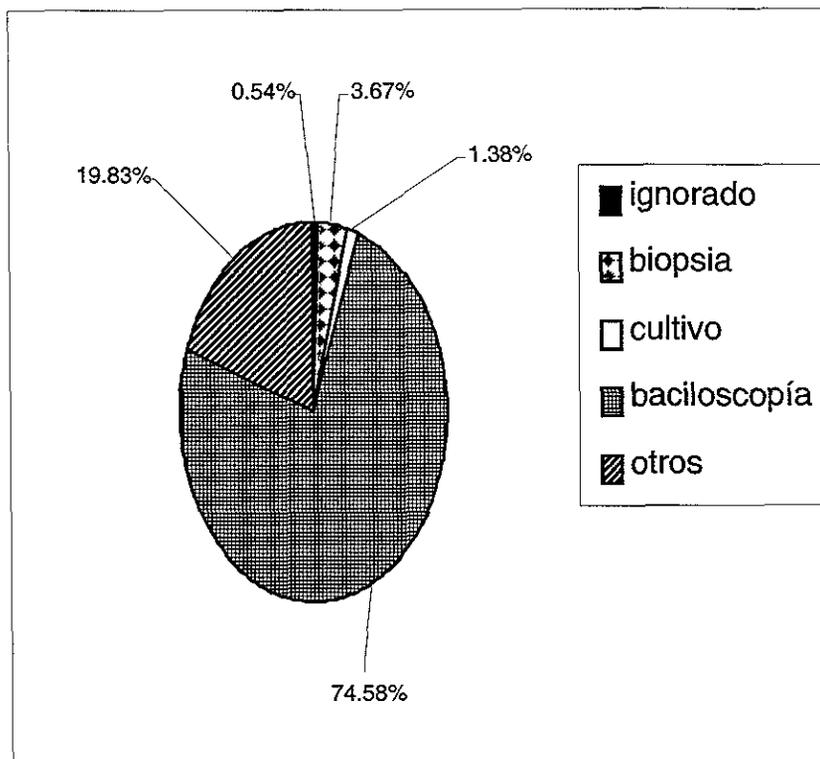
Casos de tuberculosis en México por grupos de edad y localización

Edad	Casos	%	Pulmonar	Meníngea	Otros	IGN
Menos de 1	7	0.16	6	0	1	0
1 - 4	52	1.18	30	2	20	0
5 - 14	185	4.19	130	7	48	0
15- 24	785	17.77	716	6	59	4
25- 44	1 606	36.36	1 436	8	156	6
45- 64	1 157	26.19	1 067	6	76	8
65 y más	595	13.47	555	2	37	1
Ignorada	30	0.68	28	0	2	0
<b>Total</b>	<b>4 417</b>	<b>100.00</b>	<b>3 968</b>	<b>31</b>	<b>399</b>	<b>19</b>

Tabla 2. Casos de tuberculosis por grupos de edad y localización acumulados hasta la semana 30 de 1999, en el mes de julio.

FUENTE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín Sistema Único de Información 1999, vol.16, no.30, semana 30, del 25 al 31 de julio.

## Métodos de diagnóstico tradicionales para identificación de *M. tuberculosis*



Gráfica 2. Casos de tuberculosis determinados por distintos métodos diagnósticos en los Estados Unidos Mexicanos en el mes de julio de 1999.

Modificado de: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica<sup>70</sup>.

Para evaluar la susceptibilidad a las drogas, los métodos tradicionales más usados son: el de las concentraciones absolutas, el de la relación de resistencia y el de las proporciones. Este último es el más conocido y difundido en América Latina. Los tres utilizan el medio de Lowestein-Jensen y los principales medicamentos evaluados son isoniazida, rifampicina, etambutol, etionamida, kanamicina y tiacetazona<sup>7</sup>.

## 2.7 Inmunología de la tuberculosis

Las micobacterias inducen tanto respuesta humoral como celular, siendo la última el principal mecanismo de defensa del hospedador contra las micobacterias. Aunque los bacilos de la tuberculosis aumentan la formación de anticuerpos contra una amplia variedad de inmunógenos, los anticuerpos contra proteínas y liposacáridos del bacilo de la tuberculosis son generalmente encontrados en bajos títulos en individuos tuberculosos, por lo que no son de un valor pronóstico adecuado y aparentemente no tienen un papel en la respuesta inmune contra la tuberculosis. A pesar de que el bacilo de la tuberculosis "florece" sin dañar a macrófagos de animales normales, se ha observado una destrucción más específica en macrófagos activados de animales infectados con este bacilo. Aunque el aumento en la actividad de macrófagos no es específico, se ha demostrado que es inducido por linfocitos, interactuando con el organismo infectado. En la activación del macrófago, las células T reconocen los antígenos microbianos de superficie asociados a receptores celulares. Esta interacción causa la secreción de algunas citocinas como el interferón gama y la interlucina-1. Estas interacciones también pueden aumentar la actividad fagocítica, el número de lisosomas y la producción de especies reactivas de oxígeno. Las células activadas no solo destruyen a las micobacterias ingeridas,

sino que también secretan las formas reactivas de oxígeno que pueden matar células susceptibles que se localizan en el entorno cercano.<sup>8, 11, 32</sup> Esta respuesta citotóxica específica es particularmente el daño pulmonar observado.

## 2.8 Métodos de diagnóstico e identificación.

### 2.8.1 Métodos Bacteriológicos.

La mayoría de las muestras clínicas que se envían para análisis microbiológico son esputos, pero también pueden incluir el exudado laríngeo, el lavado gástrico, el líquido cefalorraquídeo, la orina, el líquido pleural y el peritoneal y las biopsias de tejidos afectados<sup>11</sup>.

La identificación del agente causal de la tuberculosis se realiza rutinariamente en el laboratorio clínico, examinando los especímenes de los pacientes por dos métodos clásicos. Uno es el examen microscópico de extensiones teñidas con la técnica de Ziehl Neelsen, auramina-rodamina o cualquier otro que demuestre la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. El otro método es el cultivo de los especímenes en medios de cultivo complejos como el de Lowestein-Jensen o el Middlebrook 7H10 y 7H11. El método bacteriológico por medio de cultivo es el más sensible y específico para descubrir la presencia de micobacterias en muestras clínicas y en particular de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*<sup>32</sup>. Así, una muestra con un frotis positivo debe cultivarse por las siguientes razones: 1) el cultivo puede ser sensible para detectar unos cuantos bacilos, 2) el cultivo en medios específicos diferencia a *M. tuberculosis* de otros contaminantes avirulentos y de otras micobacterias patógenas y nocardias, 3) con el cultivo puede iniciarse la prueba de la sensibilidad a diversos antibióticos, para la cual es necesario partir de un

cultivo puro <sup>11</sup>.

La identificación definitiva de la micobacteria se efectúa mediante pruebas bioquímicas y una adecuada caracterización de *M. tuberculosis* debe incluir pruebas de susceptibilidad a fármacos antimicobacterianos, información necesaria para un adecuado tratamiento de la tuberculosis <sup>47</sup>. Las pruebas bioquímicas más utilizadas, en particular aquellas que diferencian a *M. tuberculosis* de *M. bovis*, así como aquellas que diferencian al complejo de *M. tuberculosis* de otras micobacterias, se tratan en el siguiente apartado.

## 2.8.2 Identificación de micobacterias.

De acuerdo con Balandrano *et al* <sup>7</sup>, el análisis comparativo entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* se puede realizar utilizando tres criterios.

El primero es la morfología colonial en el medio de Lowestein-Jensen. En este caso, *M. tuberculosis* forma colonias de color blanco a color crema, de aspecto rugoso a seco, que con el tiempo toman forma de coliflor. Las micobacterias desarrollan en la superficie del medio y el sitio en que se implantan no cambia de color. El crecimiento es eugónico ó crecimiento exuberante. En estas mismas condiciones, *M. bovis* forma colonias muy pequeñas (1.0 a 1.5 mm), translúcidas y con el tiempo toman la forma piramidal. Además, *M. bovis* tiene un crecimiento disgónico o pobre, con colonias disgregadas sobre el medio de cultivo.

El segundo criterio se basa en la morfología celular. Por este método se considera que los bacilos de *M. tuberculosis* son de longitud mediana miden 2 a 6 x 0.3  $\mu\text{m}$ . Generalmente, los bacilos son de forma ligeramente curva. Durante

el cultivo, estos bacilos forman ocasionalmente cordones serpentinos que tienden a ser extensos. También los bacilos de *M. tuberculosis* miden de 2 a 6 x 0.3  $\mu\text{m}$ , pero el acordonamiento durante el cultivo generalmente corto.

El tercer y último criterio se basa en las características fisiológicas, que incluyen:

- La acumulación de niacina. Esta prueba es positiva para *M. tuberculosis*, ya que carece de la enzima que convierte la niacina en niacina-ribonucleótido y negativa para *M. bovis*, puesto que esta especie presenta la enzima.

- La segunda característica es la reducción de nitratos a nitritos. Esta es positiva para *M. tuberculosis* y negativa para *M. bovis*.

- La tercera característica es la actividad de la catalasa, la catalasa de *M. tuberculosis* tiene termolabilidad positiva, mientras que en *M. bovis* sólo es positiva a 22°C y negativa a 68°C.

- Una cuarta característica es la sensibilidad a la hidrazida del ácido tiofen-2-carboxílico (TCH). En este caso *M. tuberculosis* es resistente, por lo cual se desarrolla bien en presencia de este ácido, mientras que la hidrazida inhibe el crecimiento de *M. bovis*.

- La quinta característica es la capacidad para hidrolizar el Tween 80. Así, *M. tuberculosis* y *M. bovis* son capaces de liberar ácido oleico del polioxietileno derivado del mono-oleato de sorbitán (Tween 80).

- La sexta característica es la incapacidad de *M. tuberculosis* y *M. bovis* para crecer en presencia de p-nitro- $\alpha$ -acetil amino hidroxipropiofenona (NAP).

Así, ambas especies no pueden metabolizar este compuesto y por lo tanto son incapaces de liberar  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de ácido palmítico marcado con  $^{14}\text{C}$  durante su cultivo, usando el método de BACTEC.

- Finalmente, el último criterio es la diseminación enzimática de la pirazinamida. En este caso, la prueba es positiva para *M. tuberculosis* y negativa para *M. bovis*.

## 2.9 Aplicación de técnicas moleculares a la epidemiología de tuberculosis

El DNA es la base de la constitución de cada organismo y su análisis es usado como estrategia molecular para la genotipificación de agentes infecciosos. El desarrollo de métodos moleculares para genotipificación de cepas de *M. tuberculosis* ha permitido un gran avance en el estudio de la tuberculosis <sup>54</sup>.

La epidemiología molecular involucra técnicas de DNA recombinante para rastrear cepas específicas de patógenos. Así, junto con los métodos epidemiológicos convencionales, permite entender mejor la distribución de ciertas enfermedades en una población determinada. Actualmente, los marcadores fenotípicos han sido reemplazados con varias técnicas moleculares para la obtención de los "DNA fingerprintings" o huellas digitales del DNA. Estos nuevos métodos junto con investigación convencional han mejorado la capacidad de entendimiento de la epidemiología de la tuberculosis <sup>9</sup>.

Muchas son las técnicas que se han desarrollado para genotipificar cepas de organismos infecciosos. En el caso de *M. tuberculosis* las siguientes técnicas han sido utilizadas.

### 2.9.1 Análisis de regiones polimórficas arregladas en "tandem" (MPTRs)

Los MPTRs son secuencias heterogéneas de 10 bps (pares de bases) invariablemente separadas por una única secuencia espaciadora de 5 bps. Esta secuencia ha sido identificada tanto en el complejo *M. tuberculosis* como en otras micobacterias <sup>37</sup>. Debido a que la secuencia MPTR es homóloga a la secuencia palindrómica extragenética repetitiva Chi de *Escherichia coli*, se especula que la secuencia MPTR podría jugar un papel en el reacomodo y la regulación de genes en *M. tuberculosis*. Debido a que existen más de 200 copias de ese elemento en el genoma de *M. tuberculosis*, este método no se usa comúnmente para la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis* <sup>9</sup>, porque los patrones obtenidos son muy complejos e inestables.

Así por ejemplo, en estudios realizados con este método se encontró que en todas las especies del complejo de *M. tuberculosis* estaba presente el MPTR, y que distintas cepas de estas especies usualmente contenían un polimorfismo muy limitado en los fragmentos de restricción que contenían MPTRs <sup>37, 75</sup>. Por lo tanto, el poder discriminatorio de esta técnica para cepas de *M. tuberculosis* resulta poco eficiente.

### 2.9.2 Análisis de la secuencia polimórfica repetitiva rica en GC (PGRS)

La secuencia PGRS ha sido usada en la caracterización de cepas de *M. tuberculosis*. Bloom <sup>9</sup> describen a los PGRS como secuencias cortas con regiones no idénticas de 24 pb, las cuales se encuentran repetidas y separadas por secuencias de 1-30 pb. Inicialmente esta región se identificó en el complejo *M. tuberculosis* pero ahora se conoce que también se encuentra en *M. kansasii*, *M. gastri*, y *M. szulgae*. La similitud en la estructura del PGRS y el MPTR sugieren que estos elementos son miembros de una familia relacionada de elementos

repetitivos de DNA. Sin embargo, los mecanismos que generan el polimorfismo asociado a PGRS no se conocen todavía<sup>75</sup>.

La mayoría de los estudios usando el análisis de PGRS ha sido realizado en cepas con un bajo número de copias de *IS6110*, como es el caso de las cepas de *M. bovis* y algunas cepas de *M. tuberculosis*, en los que el número de copias de *IS6110* es reducido o nulo<sup>1, 75, 76</sup>. Por ejemplo, en un estudio realizado en San Francisco, EE.UU. se encontró que de seis cepas que no podían ser diferenciadas por RFLP, ya que no tenían el elemento de inserción *IS6110*, cinco tuvieron diferentes patrones por análisis de PGRS<sup>1</sup>. En otro estudio realizado en Argentina se encontró que el análisis de PGRS fue una excelente herramienta para la diferenciación de cepas de *M. bovis*<sup>75</sup>. Esta idea se refuerza con otros estudios epidemiológicos de tuberculosis bovina, en donde se ha observado que el análisis con PGRS resulta mejor que los que usan como marcadores a las sondas *IS6110* y DR<sup>16</sup>. Por otra parte el grupo del Dr. van Soolingen ha sugerido que la combinación de PGRS y DR conforman un grupo de marcadores excelentes para utilizarlos en la diferenciación de cepas de *M. bovis*<sup>75</sup>.

### 2.9.3 Análisis del DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR)

Esta técnica esta basada en el uso de una secuencia corta de iniciadores elegidos al azar de 9 a 10 bases de longitud, la cual hibrida con suficiente afinidad a secuencias de DNA genómico a una baja temperatura de alineamiento. Así, cuando dos iniciadores de este tipo alinean con algunas secuencias en la orientación propia, resulta un producto de PCR con una longitud correspondiente a la distancia entre los dos iniciadores. El número y la localización de estos sitios de amplificación al azar varían en cepas diferentes

de la misma especie bacteriana. De este modo, después de la separación de los productos de amplificación en un gel de agarosa por electroforesis, se obtienen patrones de bandas, característicos de cada cepa<sup>49</sup>.

Por otra parte, Williams *et al*<sup>80</sup> realizaron los primeros estudios por RAPD-PCR con algunas especies de microorganismos como *Glycine soja* y *Neurospora crassa* y encontraron que este método podía ser usado para construir mapas genéticos de una variedad de especies. Los estudios hechos hasta ahora han demostrado que el análisis por RAPD-PCR es más rápido que otros métodos de genotipificación, que no necesita información de la secuencia del DNA que se quiere amplificar y que además requiere poca cantidad de DNA purificado (menos de 25 ng). Por otro lado es menos costoso que otros métodos como el RFLP<sup>49</sup>. Sin embargo, varios problemas han sido reportados en los ensayos de RAPD que dificultan la reproducción y estandarización de este método. Por ejemplo, Linton *et al*<sup>45</sup> encontraron que la estandarización del método es extremadamente sensible a pequeños cambios en la temperatura de alineamiento de los iniciadores, por lo cual ocurrió variabilidad en los patrones de bandas cuando se realizaron ensayos de amplificación al azar con el DNA de la misma cepa. Otros aspectos que hacen variar los resultados son el tipo de termociclador y las características de la DNA polimerasa. Además, los resultados también pueden depender de la edad del cultivo.

Además, el uso de iniciadores diseñados empíricamente hace difícil la estandarización de la técnica y por lo tanto existe mucha variabilidad en los resultados cuando se realizan los ensayos a diferentes tiempos<sup>49</sup>.

#### 2.9.4 Análisis del polimorfismo de los patrones de restricción usando como sonda el *IS6110* (RFLP-*IS6110*)

Varios autores describen al *IS6110* como una secuencia de inserción de 1,355 pares de bases, inicialmente identificada en *M. tuberculosis* y subsecuentemente encontrada en todo el complejo de *M. tuberculosis*<sup>9</sup>. De 5 a 20 copias del *IS6110* están presentes en varias posiciones dentro del genoma de *M. tuberculosis*, aunque algunas cepas sin *IS6110* también han sido identificadas<sup>1, 9</sup>. La técnica de RFLP utiliza la secuencia de inserción *IS6110* para detectar diferencias en la digestión genómica con enzimas de restricción de las cepas de *M. tuberculosis*. La utilidad del RFLP en cepas con solo unas cuantas copias de *IS6110* parece ser limitada<sup>9, 25, 68</sup>, ya que no existe suficiente poder discriminatorio que permita diferenciar dos cepas con bajo número de copias. Esto se debe a que cuando dos cepas comparten un escaso número de bandas pertenecientes a *IS6110*, la probabilidad de que se asemejen y de que dicha semejanza sea producto del azar y no de la relación entre estas es mayor.

En el caso de *M. tuberculosis*, los patrones de RFLP se obtienen de la digestión del DNA genómico con la enzima PvuII, siendo los fragmentos de DNA separados en un gel de agarosa por electroforesis y luego transferidos a una membrana de nylon e hibridizados con un segmento del DNA clonado de *IS6110*, el cual está representado por dos diferentes porciones de *IS6110*. El número y el tamaño de los fragmentos de restricción de las cepas estudiadas es tal, que la probabilidad de que dos cepas analizadas tengan un patrón igual debido al azar es del orden de 1 en  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  cepas<sup>46</sup>.

El desarrollo del método de RFLP usando como sonda al *IS6110* para distinguir cepas individuales de *M. tuberculosis* ha proporcionado una poderosa

herramienta para el estudio de la epidemiología de la tuberculosis y para identificar rutas de reciente transmisión<sup>28, 31, 46, 69, 77, 79</sup>, ya que presenta un alto grado de discriminación en los patrones tipificados<sup>35</sup>. El método ha sido internacionalmente aceptado<sup>69</sup>, y estandarizado en diferentes laboratorios de todo el mundo. Gómez *et al*<sup>36</sup> diferenciaron el 86 % de las cepas de *M. tuberculosis* por RFLP. En otro estudio realizado en Cuba por Díaz *et al*<sup>19</sup>, se encontraron 103 patrones diferentes de 160 cepas analizadas por RFLP-*IS6110*, de los cuales 84 (52 %) fueron observados solo una vez. Esto demostró que el RFLP con *IS6110* tiene un alto poder discriminatorio. Lo que indicó el marcador *IS6110* es útil en estudios de epidemiología molecular en Cuba.

Algunas de sus limitaciones radican en que se requiere de un cultivo puro para la extracción de DNA, así como de una gran cantidad de este material. Además, los resultados regularmente se obtienen en 4 ó 5 semanas<sup>25, 35, 68</sup>, ya que los resultados dependen del cultivo de *M. tuberculosis*. Algunas cepas de *M. tuberculosis* sólo contienen dos, una o no contienen ninguna copia del elemento de inserción *IS6110*, lo que nulifica el poder de discriminación de este método en este tipo de cepas<sup>1, 28, 35, 68, 75</sup>. Por ejemplo, Agasino *et al*<sup>1</sup> encontraron en San Francisco cuatro cepas de *M. tuberculosis* que carecían de *IS6110*, éstas pudieron ser identificadas con cuatro genotipos diferentes por PGRS.

La labor intensiva y costosa del método y el hecho de que los patrones producidos puedan variar con el tiempo, han hecho difícil tanto el análisis de un gran número de cepas de diferentes regiones geográficas como la posibilidad de comparar los resultados entre laboratorios<sup>35</sup>.

### 2.9.5 Análisis del polimorfismo de los patrones de restricción usando como sonda la secuencia de repetición directa (RFLP-DR)

La secuencia de repetición directa (DR) es una secuencia de 36 pbs, interceptada con secuencias no repetitivas de 36 a 41 pbs, agrupada en una región del genoma de *M. tuberculosis*<sup>25, 41</sup>. Fue descubierta por Hermans *et al*<sup>36</sup>. Las secuencias varían en el número de DRs y en la presencia o ausencia de algunas secuencias espaciadoras particulares. Este polimorfismo es probablemente debido a la recombinación entre secuencias de DR de vecinos cercanos o distantes y por los arreglos provocados por la secuencia de inserción *IS6110*. Puesto que la región DR esta flanqueada por secuencias de inserción en la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis*, tal como se observa en la figura 3<sup>9, 75</sup>. Esta región ha sido utilizada como sonda para el análisis de RFLP con buenos resultados. Cousins *et al*<sup>16</sup>, encontraron que el análisis con PGRS permite una mejor diferenciación que el análisis con DR. Sin embargo van Soolingen *et al*<sup>75</sup>, sugiere que los análisis con estos dos marcadores es igual de adecuado para diferenciar cepas de *M. tuberculosis*, sobre todo aquellas cepas que son difíciles de distinguir con la sonda *IS6110* debido a la presencia de un solo elemento *IS6110*. En el trabajo de van Soolingen *et al*<sup>45</sup>, entre las 37 cepas investigadas, 34 tuvieron patrones de RFLP-DR diferentes. En otro estudio realizado por van Soolingen *et al*<sup>76</sup>, el RFLP-DR diferenció 5 patrones de cepas diferentes, y pudo distinguir 10 cepas de *M. bovis* que contenían una sola copia de *IS6110*.

### 2.9.6 Análisis de tipificación utilizando oligonucleótidos espaciadoras ("Spoligotyping")

El método de "Spoligotyping" utiliza como blanco de amplificación por PCR el locus DR. Debido a que los DRs son extremadamente conservados entre cepas de *M. tuberculosis*, cada copia dentro del locus DR es un blanco potencial para la amplificación *in vitro* por PCR. Así, cerca de 43 diferentes espaciadores se utilizan para obtener diferentes patrones de hibridación del DNA amplificado, ya que estos son utilizados como sondas en fase reversa cuando son unidos covalentemente a una membrana de nylon<sup>4</sup>.

El "Spoligotyping" es un método que ha sido propuesto para la detección y tipificación de cepas de *M. tuberculosis*. Este método, al tener un alto poder discriminatorio, ha sido usado para establecer relaciones epidemiológicas entre cepas de *M. tuberculosis*<sup>4, 25, 38</sup>. Goguet *et al*<sup>25</sup> analizaron 101 cepas de *M. tuberculosis* por el método de "Spoligotyping" y encontraron 57 patrones diferentes, lo cual confirma el alto grado de diversidad del marcador DR y sugiere que este marcador es suficientemente polimórfico para tipificar cepas de *M. tuberculosis*. Heyderman *et al*<sup>38</sup>, analizaron 28 cepas *M. tuberculosis* e identificaron 20 genotipos diferentes por "Spoligotyping" en Harare, Zimbawe.

El "Spoligotyping" también ha sido utilizado para detectar brotes en pacientes con tuberculosis multidrogorresistentes. Goyal *et al*<sup>28</sup> detectaron un microbrote de transmisión nosocomial que fue confirmado por análisis de "Spoligotyping". En Madrid España, Samper *et al*<sup>61</sup> analizaron 20 cepas de *M. bovis* multidrogorresistente de pacientes coinfectados con VIH; estas cepas mostraron patrones idénticos de "Spoligotyping", indicando un brote de transmisión nosocomial, dado que todos los pacientes fueron atendidos en el mismo hospital en el mismo período.

Además, se ha encontrado que este nuevo método es adecuado para estudios epidemiológicos de cepas de *M. bovis*, especialmente aquellas que tienen un solo elemento *IS6110*<sup>4, 33</sup>. Aranaz *et al*<sup>4</sup>, realizaron un estudio en Madrid España, donde analizaron 182 cepas de *M. bovis* pertenecientes a distintos animales, las cuales fueron colectadas por el Departamento de Patología Animal en la Facultad de Veterinaria. En este trabajo, el "Spoligotyping" detectó 24 diferentes tipos y permitió descubrir algunas relaciones epidemiológicas. Así, van Soolingen *et al*<sup>77</sup> detectaron por medio del método de "Spoligotyping" el primer brote de infección por *M. microti* entre humanos.

Una ventaja del "Spoligotyping" sobre el análisis de RFLP es su simplicidad, rapidez y que requiere sólo una pequeña cantidad de DNA<sup>35, 38</sup>. Además el análisis del "Spoligotyping" es mucho más fácil que el análisis de tipificación por RFLP y ambas metodologías pueden ser estandarizados para permitir una comparación entre laboratorios<sup>4, 25, 35</sup>.

No obstante las ventajas descritas, en México no existe ningún estudio que permita conocer la capacidad del método de "Spoligotyping" para determinar relaciones epidemiológicas entre diferentes cepas mexicanas y mucho menos estudios que comparen ambos métodos en cuanto a su aplicación epidemiológica. De ahí que este estudio estuvo enfocado a esclarecer la utilidad de este método como herramienta para el análisis genotípico de cepas de *M. tuberculosis*.

## Estructura del locus DR

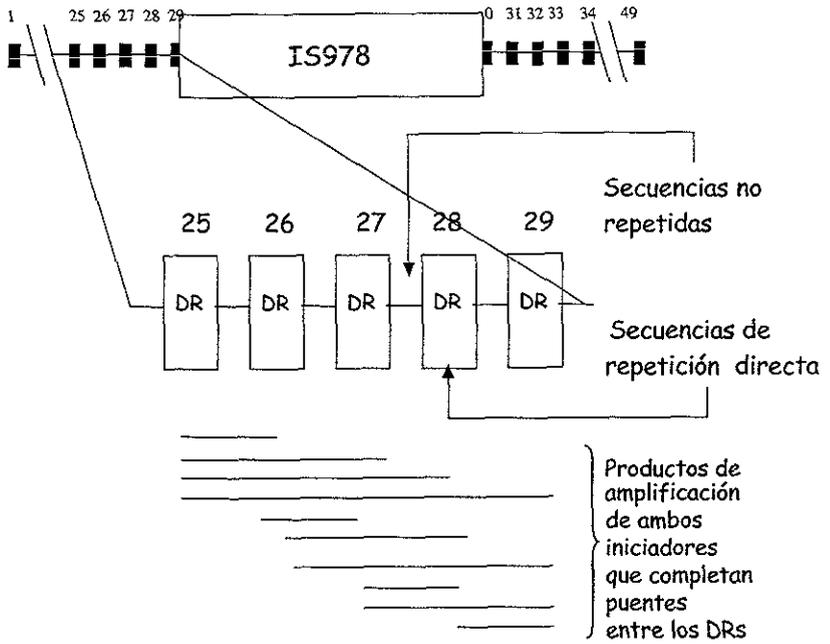


Figura 3. Estructura del locus DR en el genoma de *M. tuberculosis* y principio de su amplificación para ensayos de "Spoligotyping".  
Modificado de: Hermans *et al*<sup>37</sup>.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En abril de 1993, la Organización Mundial de la Salud declaró que la tuberculosis debe ser considerada como una emergencia mundial, ya que en muchos países está fuera de control y amenaza la vida de una parte importante de la población. De acuerdo con ello, es necesaria una acción urgente para su control en todo el mundo<sup>18</sup>. Uno de los objetivos del Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis en México es establecer un Sistema de Vigilancia Epidemiológica Especial, en el cual se dé importancia al diagnóstico, a los estudios de contacto, al seguimiento y a la clasificación final de los casos de tuberculosis<sup>53</sup>.

En los últimos años se han desarrollado métodos de biología molecular aplicados a la búsqueda de rutas de infección de *M. tuberculosis*. Estos son métodos de diferenciación de cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* ó de genotipificación por técnicas de DNA recombinante.

Los métodos de genotipificación permiten entre otras cosas: el reconocimiento de brotes de infección, detectar la transmisión a través de patógenos nosocomiales, determinar la fuente de infección o contaminación en el laboratorio, reconocer cepas virulentas, regular el monitoreo de los programas de vacunación para diferenciar entre reactivación o reinfección en pacientes con un segundo episodio de tuberculosis<sup>35,49</sup>.

En la actualidad, se tienen métodos estandarizados para la genotipificación de cepas de *M. tuberculosis*, los cuales están basados en el análisis del polimorfismo del DNA genómico<sup>36, 45, 54</sup>. Sin embargo, no hay estudios que definan la utilidad de estos métodos en México.

En varios estudios, se ha utilizado el "Spoligotyping" para genotipificación de cepas de *M. tuberculosis*. Este método se ha caracterizado

por su simplicidad y rapidez, ya que para su realización requiere aproximadamente de dos días y permite analizar a la vez hasta 43 cepas diferentes. Una ventaja adicional del método y que influye en la reducción de su costo, es la capacidad de la membrana para poder ser reutilizada hasta 15 veces <sup>41</sup>.

Además, este método permite diferenciar entre las especies *de M. tuberculosis* y *M. bovis*, lo cual simplifica enormemente el trabajo cuando se requiere distinguir cepas de pacientes inmunocomprometidos. Esto evita realizar algunas pruebas bioquímicas tradicionales tales como la prueba de la niacina, la de nitratos, la hidrólisis del tween y la de la catalasa entre otras, así como pruebas que son asociadas a resistencia, tal como la de las pirazinamidas.

El hecho de que el Spoligotyping produzca un patrón de tipificación en "código de manchas", en donde las manchas pueden estar presentes o ausentes pero no variar en la posición, permite que los patrones sean comparados usando una simple hoja de cálculo, la cual emplea caracteres cortos. Así, este método puede permitir realizar comparación entre patrones de cepas de manera más sencilla que el RFLP, por lo que puede resultar un método de análisis preliminar que permita la comparación de "finger printing" de DNA de aislados de *M. tuberculosis* entre distintos laboratorios.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general:

Genotipificar cepas de *M. tuberculosis* mediante el método de hibridación en fase reversa con oligonucleótidos espaciadores ("Spoligotyping").

### 4.2 Objetivos particulares:

1. Obtener DNA de cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.
2. Estandarizar el método de "Spoligotyping" con cepas mexicanas del complejo *M. tuberculosis*.
3. Realizar un análisis jerárquico de "cluster" para discriminar cepas del complejo *M. tuberculosis*.
4. Establecer relaciones genóticas de las cepas de *M. tuberculosis* usando los índices de similitud de los patrones de manchas obtenidos por "Spoligotyping".
5. Comparar la capacidad de los métodos RFLP y "Spoligotyping" para genotipificar un grupo de cepas de *M. tuberculosis* obtenidas de pacientes mexicanos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Muestras biológicas

Se analizaron 58 muestras de cultivos provenientes de pacientes con diagnóstico positivo de tuberculosis pulmonar, pertenecientes al cepario de la Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría (UIMEIP), Centro Medico Nacional Siglo XXI.

### 5.2 Tratamiento de las muestras

La descripción metodológica que a continuación se presenta hasta cultivo por el método BACTEC 460, fue realizada en un trabajo previo al presente, en el laboratorio de Biología Molecular de la UIMEIP. La metodología del "Spoligotyping" se resume en el esquema de la figura 4.

### 5.3 Descontaminación de las muestras de pacientes con tuberculosis pulmonar

Cada muestra de esputo de individuos con diagnóstico probable de tuberculosis pulmonar se colectó en contenedores estériles. Dentro de las primeras tres horas de recolección, las muestras se incubaron a 37°C con N-acetil cisteína durante 10 min. Posteriormente, se les agregó NaOH (J.T.Baker México) al 4% y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Enseguida, las muestras se neutralizaron con HCl (J.T.Baker México) a una concentración final de 1.25 N. Para verificar que efectivamente las muestras se encontraban descontaminadas, se sembró una alícuota en agar sangre y otra en tioglicolato (Costar, USA). Se esperaron dos días y se observaron las cajas.

En caso de no observar crecimiento, se procedió a sembrar en el medio específico para micobacterias.

#### 5.4 Cultivo de *M. tuberculosis*

El material de las muestras descontaminadas se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15-20 min a 4°C en una centrifuga Sorvall refrigerada (Dupont instruments USA) y el sobrenadante se eliminó por decantación. Las pastillas obtenidas se utilizaron para cultivo siempre y cuando mostraran tinción positiva para bacilos ácido alcohol resistente (BAAR) por el método de Ziehl Neelsen<sup>7</sup>. Los tubos con las muestras se colocaron en los medios de cultivo Lowenstein Jensen y Middlebrook. El primero para el crecimiento de la micobacteria y el segundo para su conservación. Con una pipeta Pasteur se tomó el producto neutralizado y se sembraron de 3 a 3.5 mL en cada tubo, dejando escurrir sobre la superficie del medio sin tocarlo. La siembra se realizó meticulosamente para no confundir las muestras y evitar la contaminación con gérmenes del ambiente. Las pipetas Pasteur se flamearon, lo mismo que los tubos después de abiertos y antes de cerrarse. Los tubos con el medio de cultivo se mantuvieron en posición inclinada cerca de la llama de mechero. Una vez sembrados, los tubos se colocaron en una bandeja con fondo inclinado, de manera que el líquido sembrado cubriera toda la superficie del medio. Los tubos que contenían los cultivos sembrados se llevaron a la estufa de cultivo, manteniendo los cultivos con la tapa floja para que se evaporara la parte líquida de la siembra y después de 48 horas se revisaron. En el caso de que se hubiera evaporado el líquido, se ajustaba la tapa de la rosca hasta un cierre completo. Los tubos se mantuvieron inclinados hasta el término del período de observación. La incubación de los tubos sembrados se hizo a 37°C.

En los tubos alcalinizados el medio adquirió un color blanco amarillento. En el caso de existir contaminación por flora secundaria, lo cual se aprecia por el desarrollo de colonias en tiempos cortos, las muestras se procesaron nuevamente. Las revisiones se hicieron a los 7, 30 y 63 días, se anotó e informó en cada revisión, aquellos cultivos que fueron positivos. Se consideraron cultivos negativos aquellos que después de un período de 63 días no mostraron crecimiento.

#### 5.4.1 Método radiométrico para el cultivo de *M. tuberculosis*

El cultivo, la identificación y la sensibilidad a los fármacos de las cepas se realizaron por el método BACTEC, de acuerdo al manual de procedimientos del sistema BACTEC TB 460 (Becton  $\alpha$  Dickinson, USA) <sup>66</sup>.

En resumen, las cepas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en medio de agar Middlebrook 7H12 (BACTEC 12B), suplementado con polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y azlocilina (PANTA). Los índices de crecimiento se midieron con el sistema automatizado "BACTEC" 460 (Becton  $\alpha$  Dickinson, USA) y los cultivos se recuperaron cuando alcanzaron un índice de crecimiento (IC) de 50-100 en la escala del aparato.

Para la identificación del complejo *M. tuberculosis* se tomó 1 ml del cultivo de crecimiento obtenido y se mezcló con p-nitro-alfa acetil amino hidroxipropiofenona (NAP) (Becton  $\alpha$  Dickinson, USA) y se consideraron cepas del complejo aquellas que no crecieron en presencia del NAP. Ya que el NAP es un componente intermediario de la síntesis del cloranfenicol, que inhibe específicamente las especies que componen el complejo.

Para el análisis de sensibilidad se utilizó un kit SIRE (Becton  $\alpha$  Dickinson, USA), el cual contenía solución de los diversos antibióticos,

estreptomycin, isoniazida, rifampicina y etambutol, disueltas en el medio de 12 B (BACTEC B y D, USA.). La resistencia fue determinada al comparar los índices de crecimiento de las cepas en los medios de cultivo con respecto a la velocidad de crecimiento en cepas control de resistencia ya definida.

## 5.5 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar clase II tipo A/B3 (NUAIRE™ Francia).

Las muestras de expectoración se colocaron en tubos Falcon 15 ml de perlas de vidrio cubiertas con silicón (ver apéndice) hasta la marca de 3 µl, más 300 µl de Buffer TE 1X (ver apéndice) y 300µl de fenol saturado. El cultivo de micobacterias se agregó con una varita de madera estéril. Las muestras se agitaron vigorosamente en Vórtex (Lab-Line Instruments, USA), dos veces por un minuto. Luego se transfirió todo el contenido a un tubo eppendorf estéril. Dado que las micobacterias fueron destruidas en su integridad celular con la solución de fenol, todo el trabajo posterior se realizó sin usar la campana de flujo laminar. Los tubos que contenían las muestras se centrifugaron a 14,000 r.p.m. en una microcentrífuga refrigerada Sorvall RMC 14 (DuPont, Newtonwn, Connm, USA) por 5 min a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un tubo eppendorf y se le adicionó un volumen de fenol-cloroformo 1:1, y nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones por 10 min. La fase acuosa fue depositada en un tubo eppendorf estéril y se le agregó un volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó por 10 min. La fase acuosa se separó y a ésta se le adicionaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar los ácidos nucleicos a 4°C por dos horas (para obtener mayor cantidad de DNA se recomienda dejar precipitando toda la noche). La pastilla que contenía los

ácidos nucleicos se obtuvo por centrifugación a 4°C, 14,000 r.p.m. durante 10 min. El sobrenadante obtenido fue decantado y a la pastilla se le adicionó un volumen de etanol al 70% (70 ml de etanol por 30 ml de agua) para lavar los ácidos nucleicos. Por centrifugación a 4°C, a 13,000 r.p.m. por 10 min, se obtuvo la pastilla, se secó y resuspendió en 50-100 µl de TE 1X y se conservó a -20°C hasta su uso.

---

### 5.6 Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA se realizó por fluorometría en un fluorómetro Fluoroskan Ascent (Labsystems, Finlandia) y por el método de pico-green. Para la cuantificación, se preparó una curva estándar de DNA con DNA del fago λ. Este se diluyó a partir de un estándar de DNA de 100 µg/ml hasta una concentración final de 2 µg/ml (dilución 1:50) y a partir de este se preparó la curva estándar descrita en la tabla 3.

Las muestras problema se trabajaron a una dilución 1:100 ó 1:1000 con TE 1X dependiendo de la cantidad de DNA que se hubiera

Una vez preparadas las diluciones de las muestras y la curva, se colocaron en una placa de ELISA y se les añadió la cantidad correspondiente de pico green e inmediatamente la placa se introdujo dentro del fluorómetro y se realizó la lectura a una longitud de onda de excitación de 485 y de emisión de 538.

Concentración del estándar (ng/ $\mu$ l)	$\mu$ l de estándar de 2 $\mu$ g/ml	TE 1X $\mu$ l	Pico green ( $\mu$ l) dilución 1:200
0	0	100	100
50	5	95	100
100	10	90	100
200	20	80	100
300	30	70	100
400	40	60	100
500	50	50	100
600	60	40	100
700	70	30	100

Tabla 3. Curva estándar utilizada para la cuantificación de DNA a partir de un estándar de DNA del fago  $\lambda$  (Molecular Probes Eugene, USA).

Los cálculos de las concentraciones se realizaron por el método de regresión lineal con el programa Statistics (Stat Soft I, EE.UU.) y todas las muestras se ajustaron a una concentración de 1  $\mu$ g/ml.

### 5.7 Amplificación de la región del locus DR

La amplificación de la región del locus DR a partir del DNA obtenido de los cultivos se realizó por PCR de acuerdo al método descrito por Kemerbeek J. *et al*, 1997. Los oligonucleótidos DRa y DRb fueron usados como iniciadores para amplificar la región DR por PCR.

En la siguiente tabla se describen las secuencias de los oligonucleótidos usados.

Iniciador	Secuencia	Marcaje	Concentración
DRa	GGTTTTGGGTCTGACGAC	5' Biotinilado	10 pmol/ $\mu$ l
DRb	CCGAGAGGGGACGGAAAC	-----	10 pmol/ $\mu$ l

Tabla 4. Secuencia de los iniciadores biotinilados utilizados para amplificar los oligonucleótidos espaciadores correspondientes a la región DR.

La mezcla de reacción para los ensayos de PCR se llevó a cabo en una campana de flujo laminar clase II tipo A/B3 (NUAIRE<sup>TM</sup> Francia). Los reactivos, así como las concentraciones y los volúmenes utilizados se enumeran en la tabla 5.

Reactivo	Concentración		Volumen por cada reacción(μl)	Concentración	
	Inicial			final	
Buffer*	10 X		5	1 X	
MgCl <sub>2</sub> *	30 mM		5	3 mM	
dNTP's**	5 mM		10	1 mM	
Iniciador DRa***	10 pmol/μl		2	0.4 pmol/μl	
Iniciador DRb***	10 pmol/μl		2	0.4 pmol/μl	
Taq polimerasa*	5 U/μl		0.5	0.05 U/μl	
DNA	1 μg/ml		10	10 pg/μl	
H <sub>2</sub> O			<u>15.5</u>		
Volumen final			50		

Tabla.5 Reactivos utilizados en la mezcla de reacción de PCR

\* Biotecnologías Universitarias S.A. México

\*\* Boehringer Mannheim, Alemania

\*\*\*Oligos Etc. Lakeside Labs, México

Todos los reactivos junto con el DNA de cada muestra se colocaron en tubos estériles de 200 μl. Los tubos se sellaron perfectamente y se introdujeron en un termociclador Gene Amp PCR Sistem 9700 (Applied Biosystem, EE.UU.) bajo las siguientes condiciones de reacción:

- 1) 96°C por 3 min
- 2) 20 ciclos de PCR a:
  - 96°C por 1 min (desnaturalización del DNA)
  - 55°C por 1 min (alineamiento de los iniciadores)
  - 72°C por 30 seg (extensión del DNA)
- 3) 72 °C por 15 min.
- 4) 4°C indefinidamente

Para evitar contaminación que pudiera contener moléculas de DNA exógeno, las mezclas de reacción se prepararon utilizando puntas con filtro (Labsystems, USA), En todos los casos se incluyeron un control positivo (una muestra que anteriormente se había amplificado), un control negativo (sin DNA) y la mezcla total de reacción siempre se preparó con un exceso de reactivos que contemplaran el volumen de 2 muestras más.

### 5.8 Electroforesis en gel de agarosa

Para corroborar que se llevó a cabo la amplificación y conocer el peso molecular de los productos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Para preparar 100 ml de una solución de agarosa al 2 %, se tomaron 2 g de agarosa (BioRad, California EE.UU.) y se suspendieron en 96 ml de amortiguador TAE 1X (apéndice). La agarosa fue disuelta por calentamiento en un horno de microondas (Packard bell, 1300 Watts de poder) hasta disolución total. La solución se colocó en una parrilla con agitación constante y se dejó enfriar hasta que alcanzó los 55 °C; entonces se le agregaron 2 ml de amortiguador TAE 50X (apéndice) y se dejó agitando unos segundos. La

solución (aproximadamente 70 ml) se depositó en una cámara de electroforesis Horizon 11,14 (Gibco BRL, Life technologies USA) con el peine y las prensas para presionar el gel colocadas previamente, y se dejó hasta que solidificó. Para retirar el peine y las prensas se agregaron aproximadamente 20 ml de TAE 1X, de manera que los aditamentos quedaran humedecidos y pudieran salir libremente sin romper el gel. Los carriles se llenaron con 8  $\mu$ l del producto de PCR (control positivo, control negativo y muestras), los cuales fueron mezclados con 2  $\mu$ l del buffer de carga 6X (ver apéndice). Tres microlitros del marcador de peso molecular de bajo rango pBR322/Msp1 (Biotecnologías Universitarias, México), fueron depositados en uno de los carriles laterales. La cámara se llenó con suficiente solución de TAE 1X para cubrir el gel. La corrida se llevó a cabo por 2.5 horas a 75 voltios con la ayuda de una fuente de poder (Gibco BRL modelo 14, USA). Una vez terminada la corrida, el gel se tiñó por 3 min en una solución de bromuro de etidio de 0.5  $\mu$ g/ml (Gibco BRL, EE.UU.) (ver apéndice). Posteriormente se lavó por un minuto en agua desionizada y se observó en el transiluminador de luz UV utilizando un equipo de fotodocumentación Gene Genius (Syngene Ltd, Inglaterra).

### **5.9 Hibridación en fase reversa**

La hibridación en fase reversa se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Kemerbeek *et al* (1997). Para ello se utilizó una membrana que contenía los 43 oligonucleótidos inmovilizados, cada uno correspondiente a una de las secuencias espaciadoras polimórficas de DNA dentro del locus DR.

Las secuencias de los 43 oligonucleótidos del locus DR se encuentran en la tabla 6.

Para la hibridación, se utilizaron 20  $\mu$ l de los productos de amplificación los cuales fueron diluidos en 150  $\mu$ l de 2xSSPE-1% SDS (ver apéndice) y colocados en el termociclador para su desnaturalización por 10 min a 99.9 °C, manteniendo las muestras hasta su uso en hielo. Ciento cuarenta microlitros de las mezclas fueron aplicados en los canales en paralelo de un "miniblotter" (Immuntics, USA) en sentido perpendicular a los oligonucleótidos espaciadores previamente inmovilizados. La hibridación se realizó en un horno de hibridación (Robbins Scientific 400, USA) por 60 min a 60 °C. Después de la hibridación, las muestras fueron aspiradas con vacío y la membrana se retiró del "miniblotter" con pinzas y fue lavada dos veces a 60°C con 100 ml de 2 x SSPE-0.5 % SDS por 10 min cada vez. Entonces la membrana se introdujo a un tubo de hibridación y una vez que la temperatura descendió a 42°C, se incubó a esta temperatura por 1 hora, usando 50  $\mu$ l de una solución del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology, EE.UU.), a una dilución de 1:3000 en 2XSSPE-0.5% SDS. La membrana fue lavada dos veces, por 10 min cada vez, en 250 ml de 2XSSPE-0.5% SDS a 42°C y con 250 ml de 2XSSPE por 5 min a temperatura ambiente.

Para la detección de la señal de hibridación se colocó la membrana en una bolsa de hibridación y a ésta se le adicionaron 5 ml del reactivo CPD Star (Amersham, London) y se selló por calor, la reacción se dejó desarrollar por 5 min a temperatura ambiente evitando su exposición a la luz. Posteriormente, la bolsa se cortó en un extremo y el exceso de líquido fue eliminado, sellándola nuevamente. Los resultados de la hibridación se obtuvieron al exponer la membrana a una placa de rayos X (Kodak, México). En la figura 5, se muestra el proceso de hibridación en fase reversa y el de revelado de las muestras por quimioluminiscencia.

Después de obtenidos los resultados de hibridación, la membrana fue lavada dos veces por 30 min cada vez en 100 ml de SDS 1% a 80 °C y después incubada por 15 min en 150 ml de EDTA 20 mM a pH 8 (ver apéndice) a temperatura ambiente. La membrana se guardó en una bolsa de hibridación con 10 ml de EDTA 20 mM (pH 8) y se conservó a 4°C hasta su uso.

#### **5. 10 Análisis de los patrones de hibridación**

La representación esquemática de los patrones de hibridación de cada muestra, se realizó en una hoja de cálculo de Excel versión 4, de modo que fuera más fácil la visualización de los patrones de hibridación, especialmente en aquellos casos en los que la señal era débil. En la figura 8 se observa la representación de los 43 oligonucleótidos correspondientes a las secuencias espaciadoras. Los cuadros negros representaron la hibridación positiva y los cuadros blancos representaron la hibridación negativa. El orden en que se encuentran colocados los patrones de hibridación correspondientes a cada una de las muestras analizadas en la figura 8 y corresponde al mismo orden en que se ubicaron en el dendrograma después de realizado el análisis estadístico.

#### **5. 11 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con el programa "SPSS" para Windows versión 6 (Inc Michigan, Chicago Illinois). Se utilizó el método de análisis de grupos por aglomeración jerárquica (Aglomerative Hierarchical Cluster Analysis). Este método se basa en calcular las diferencias y similitudes entre cada uno de los patrones de bandas de cada cepa de *M. tuberculosis*, tomando como criterio de combinación su patrón de hibridación. Así, el número 1 representa presencia (hibridación positiva) y el número 0 representa ausencia

(hibridación negativa). Posteriormente el programa realiza un análisis de matrices y obtiene los índices de similitud de cada cepa con respecto a las demás. El programa agrupa entonces a las cepas con igual índice de similitud y ordena de mayor a menor similitud, a todo el grupo de cepas. La representación gráfica de los resultados denominada dendrograma muestra los coeficientes de similitud asignados por el programa, en una escala del 1 al 25. En este caso el uno corresponde al 100 por ciento y el 25 al cero por ciento de similitud.

Espacio No.	Secuencia del oligonucleótido	Espacio No.	Secuencia del oligonucleótido
1	ATAGAGGGTCGCCGGTTCTGGATCA	23	AGCATCGCTGATGCGGTCCA6CTCG
2	CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG	24	CCGCCTGCTGGGTGAGACGT6CTCG
3	CCGT6CTTCCAGTGATCGCCTTCTA	25	GATCAGCGACCACCGCACCCCT6TCA
4	ACGTCATACGCCGACCAATCATCAG	26	CTTCAGCACCACCATCATCCGGCGC
5	TTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA	27	GGATTGCTGATCTCTTCCCGCGGAT
6	CGTCGTCATTTCCGGCTTCAATTTT	28	TGCCCCGGCGTTTAGCGATCACAAC
7	GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC	29	AAATACAGGCTCCACGACACGACCA
8	CGTGA AACCGCCCCAGCCTCGCCG	30	GGTTGCCCCGCGCCCTTTTCCAGCC
9	ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC	31	TCAGACAGGTTCCGCTCGATCAAGT
10	TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC	32	GACCAAATAGGTATCGGGCTGTTCA
11	GTGAGCAACCGCGCGGCAACCTGG	33	GACATGACGGCGGT6CCGCACTTGA
12	ATATCTGCTGCCCGCCGGGAGAT	34	AAGTCACCTCGCCACACCGTCGAA
13	GACCATCATTGCCATTCCCTCTCCC	35	TCCGTACGCTCGAAACGTTCCAAC
14	GGTGTGATGCGGATGGTCGGCTCGG	36	CGAAATCCAGCACCACATCC6CAGC
15	CTTGAATAACGCGCAGTGAATTTG	37	CGCGAACTCGTCCACAGTCCCCCTT
16	CGAGRRCRCRCAGCGRGAAATC	38	CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC
17	GCGCCGGCCCCGCGGGATGACTCCG	39	GACGATGGCCAGTAAATCGGGCTGG
18	CATGGACCCGGGCGAGCTGCAGATG	40	CGCCATCTGTGCTCATACAGGTCC
19	TAAGTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT	41	GGAGCTTTCCGGCTTCTATCAGGTA
20	TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA	42	ATGGTGGGACATGGACGAGCGCGAC
21	TCGATGTCGATGTCCAATCGTCGA	43	CGCAGAATCGACCGGGTCCGGGAG
22	ACCGCAGAVGGCAGATTGAGACAA		

Tabla 6. Secuencia de los 43 oligonucleótidos espaciadores utilizados en el estudio. Los oligonucleótidos espaciadores utilizados corresponden a 37 espaciadores de *M. tuberculosis* H37Rv y 6 de *M. bovis* BCG. Los iniciadores usados fueron DRa (GGTTTTGGGTCTGACGAC, 5' biotinilado) y DRb (CCGAGAGGGGACGGAAAC).

## Estrategia experimental

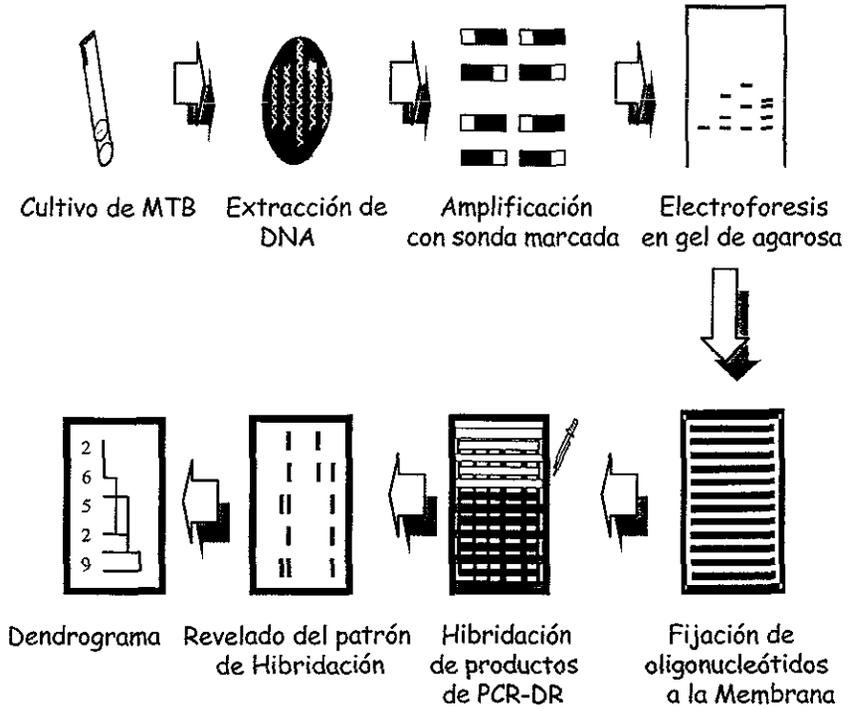


Figura 4. Representación esquemática de la metodología experimental utilizada en el estudio.

Representación esquemática de la hibridación en fase reversa y revelado por quimioluminiscencia en ensayos de "Spoligotyping"

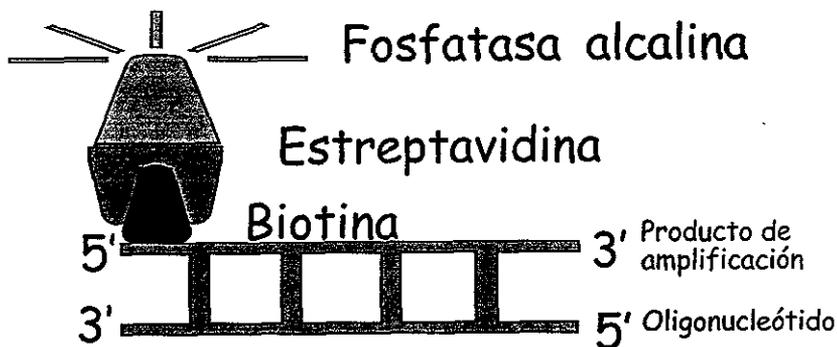
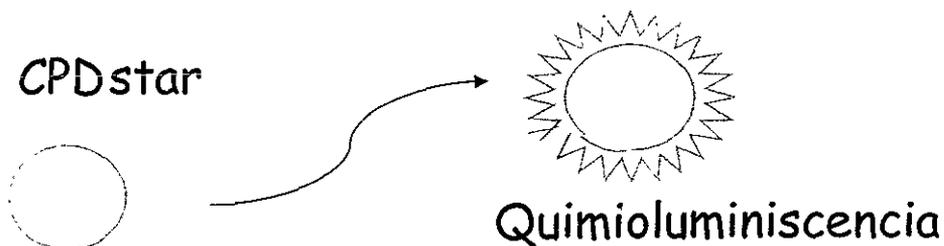


Figura.5 Representación esquemática de la hibridación en fase reversa y la reacción por quimioluminiscencia. Modificado de: Correa Chacón<sup>15</sup>.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características de las cepas utilizadas

Se analizaron 58 cepas aisladas a partir de sedimentos de expectoración de pacientes con diagnóstico probable de TB pulmonar. Todas las muestras incluidas en el estudio fueron procesadas previamente por el método de RFLP, estableciendo por medio de dendrogramas su relación genotípica.

Los datos relevantes de los pacientes de donde fueron obtenidas dichas muestras se describen en la tabla 8.

Las muestras estudiadas provenían de pacientes entre los 20 y los 76 años de edad, las cuales corresponden al sector de la población económicamente activa. El 38 % de los individuos fueron del sexo femenino y el 62 % fueron individuos del sexo masculino, con ocupaciones relacionadas y no relacionadas con la salud. El 82.7 % de los pacientes eran VIH negativos y el 17.3 % de los pacientes eran VIH positivos.

De acuerdo con los estudios de sensibilidad a diversos medicamentos realizados anteriormente en el laboratorio: el 52 % de las cepas fueron sensibles a todas las drogas (30 cepas), el 10 % de las cepas fueron resistentes a una droga (seis cepas), de las cuales 3 fueron resistentes a isoniazida, dos fueron resistentes a rifampicina y una fue resistente a estreptomycin. El 31 % de las cepas fueron resistentes a dos drogas (18 cepas), 17 resistentes a isoniazida y rifampicina y una resistente a estreptomycin e isoniazida, y el 7 % de las cepas fueron resistentes a tres drogas (4 cepas), dos resistentes a estreptomycin, isoniazida y rifampicina, y dos resistentes a isoniazida, rifampicina y etambutol.

NÚMERO	EDAD	SEXO	OCCUPACIÓN	CULTIVO	BCG	VIH	SIRE*
3	47	FEMENINO	S/DATO	POSITIVO	S/DATO	NO	SSSS**
7	45	FEMENINO	OBRERO	POSITIVO	S/DATO	SI	SSSS
8	21	MASCULINO	S/DATO	POSITIVO	NO	NO	SSR***S
9	42	MASCULINO	S/DATO	POSITIVO	S/DATO	SI	SRRS
10	20	MASCULINO	OBRERO	POSITIVO	S/DATO	SI	SSSS
13	30	MASCULINO	S/DATO	POSITIVO	S/DATO	SI	SSSS
15	21	MASCULINO	MESERO	S/DATO	S/DATO	NO	SSSS
16	27	MASCULINO	EMPLEADO	POSITIVO	S/DATO	NO	SSSS
34	53	MASCULINO	PINTOR	POSITIVO	NO	NO	SSSS
35	24	MASCULINO	MESERO	POSITIVO	SI	NO	SSSS
36	44	MASCULINO	S/DATO	POSITIVO	NO	NO	SRRS
39	60	MASCULINO	VELADOR	S/DATO	S/DATO	SI	SSSS
40	55	FEMENINO	HOGAR	POSITIVO	SI	NO	SSSS
75	63	FEMENINO	HOGAR	S/DATO	SI	NO	SSSS
101	37	FEMENINO	SECRETARIA	POSITIVO	NO	NO	SSSS
108	37	FEMENINO	HOGAR	POSITIVO	NO	NO	SRSS
112	32	MASCULINO	INGENIERO	POSITIVO	NO	NO	SSSS
116	21	MASCULINO	ALBAÑIL	POSITIVO	NO	NO	SRSS
118	21	MASCULINO	DESPACHADOR	POSITIVO	NO	NO	SSSS
119	48	MASCULINO	S/DATO	POSITIVO	NO	NO	SRRS
124	47	MASCULINO	CONTADOR PUB	POSITIVO	NO	NO	SSSS
153	71	MASCULINO	TABLAJERO	POSITIVO	NO	NO	SRRS
154	56	FEMENINO	HOGAR	POSITIVO	SI	NO	SRRS
156	40	MASCULINO	ASERRADOR	POSITIVO	SI	NO	SRRS
159	58	MASCULINO	ALBAÑIL	POSITIVO	S/DATO	SI	SRRS
160	50	FEMENINO	COMERCIANTE	POSITIVO	SI	NO	SSSS
170	46	MASCULINO	DESEMPLEADO	POSITIVO	NO	NO	SRRS
172	42	FEMENINO	HOGAR	POSITIVO	SI	NO	SRRS
178	38	FEMENINO	COSTURERA	POSITIVO	NO	NO	SSSS
184	36	FEMENINO	HOGAR	POSITIVO	S/DATO	NO	SRRS
194	28	FEMENINO	DIETOLOGA	S/DATO	NO	NO	SRRR
198	52	MASCULINO	TRUSILERP	POSITIVO	NO	NO	SSSS
199	68	FEMENINO	HOGAR	POSITIVO	SI	NO	SRRS
400	44	MASCULINO	PENSIONADO	POSITIVO	NO	NO	RRRS

NÚMERO	EDAD	SEXO	OCUPACIÓN	CULTIVO	BCG	VIH	SIRE
401	48	FEMENINO	ENFERMERA	POSITIVO	NO	NO	SSSS
404	39	MASCULINO	EMPLEADO	POSITIVO	NO	NO	SRRS
405	29	MASCULINO	ALBAÑIL	S/DATO	S/DATO	SI	SRSS
406	47	MASCULINO	PENSIONADO	S/DATO	NO	NO	SRRR
407	37	FEMENINO	HOGAR	POSITIVO	SI	NO	RRRS
410	36	MASCULINO	CHOFER	POSITIVO	SI	NO	SRSS
418	66	FEMENINO	HOGAR	POSITIVO	S/DATO	NO	SSSS
420	28	MASCULINO	S/DATO	S/DATO	NO	NO	SRRS
421	42	MASCULINO	COMERCIANTE	S/DATO	NO	NO	SSSS
428	22	FEMENINO	HOGAR	S/DATO	NO	NO	RRSS
430	44	MASCULINO	MÉCANICO	POSITIVO	NO	NO	SSSS
431	32	FEMENINO	HOGAR	S/DATO	NO	NO	SRRS
445	47	MASCULINO	EMPLEADO	S/DATO	S/DATO	SI	SSSS
478	67	FEMENINO	HOGAR	S/DATO	NO	NO	SSSS
481	59	FEMENINO	OBRAERO	S/DATO	NO	NO	RSSS
490	28	FEMENINO	HOGAR	POSITIVO	S/DATO	SI	SSSS
493	27	FEMENINO	OBRAERO	S/DATO	S/DATO	SI	SSSS
501	37	MASCULINO	PSICOLOGO	S/DATO	SI	NO	SRRS
508	23	MASCULINO	MÉCANICO	POSITIVO	NO	NO	SSSS
531	35	MASCULINO	CHOFER	POSITIVO	S/DATO	SI	SSSS
543	37	MASCULINO	MÉDICO	POSITIVO	SI	SI	RSSS
545	34	MASCULINO	HOJALATERO	POSITIVO	S/DATO	SI	SSSS
800	28	MASCULINO	ALBAÑIL	S/DATO	NO	NO	SSSS

Tabla 7. Características de las cepas estudiadas. Se incluye la edad, el sexo, la ocupación, los resultados del cultivo, la prueba de la tuberculina con BCG, la prueba del VIH y los resultados de las pruebas de sensibilidad a los medicamentos. S/D= sin dato, \*SIRE Resistencia a: S= Estreptomicina, I= Isoniazida, R= Rifampicina, E= Etambutol, \*\*S= Sensible, \*\*\*R= Resistente.

## 6. 2 Amplificación por PCR

La amplificación del locus DR se corroboró al hacer una corrida por electroforesis de los productos de amplificación en un gel de agarosa.

En la figura 6 se muestran los resultados del corrimiento electroforético de los productos de amplificación del locus DR obtenidos con distintas muestras. En la figura 6, se observan en el gel de electroforesis bandas correspondientes a productos de bajo peso molecular y de diferentes tamaños, semejando una escalera. Los iniciadores DRa y DRb, amplificaron productos de bajo peso molecular comprendidos principalmente entre 527 y 147 pares de bases.

Como se observa en la figura 6, en los carriles del 3 al 14 se encuentran bandas correspondientes a los productos de la región DR, excepto en el carril 13 (cepa 72), en el que solo se observó una banda en la parte inferior del gel, lo que indica que no hubo reacción de amplificación.

### 6.3 Hibridación en fase reversa

Una vez obtenida la amplificación del locus DR por PCR, se procedió a realizar la hibridación en fase reversa con los 43 oligonucleótidos espaciadores. En la figura 7 se encuentran resultados de los patrones de hibridación obtenidos para algunas cepas estudiadas. En el caso de la cepa 172 no se obtuvo un patrón de "Spoligotyping". Este resultado concuerda con la falla en la amplificación por PCR, observada en el carril 13 de la figura 6.

En la figura 7 podemos observar la variabilidad de los patrones de "Spoligotyping" de las distintas cepas. En esta figura se observa que las cepas pertenecientes a *M. tuberculosis* (cepas que contienen los espaciadores del 39 al 43), carecen de los espaciadores 33 al 36. Esta característica se presenta también en la cepa control H37Rv. Aunque la ausencia de estos espaciadores se

presenta en la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis*, las cepas 13, 16, 40 y 410 sí los presentaron (ver figura 8).

En la figura 8 se observa que tanto los controles de *M. bovis* (BCG y AN5) como algunas cepas analizadas (cepas 153, 184 y 401), carecen de los últimos 5 oligonucleótidos espaciadores (39 al 43), lo que sugiere que estas muestras pertenecen a la especie *M. bovis*<sup>41</sup>.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los patrones de hibridación coincidieron en todos los casos. En algunos casos varió la intensidad de las manchas, lo que es atribuido al reuso de la membrana.

En la figura 8 también se observa que los distintos patrones de "Spoligotyping" contienen entre 16 y 37 secuencias espaciadoras. Entre los 48 tipos obtenidos, cuatro se encontraron en más de dos pacientes y 44 fueron patrones únicos de cada cepa. El "Spoligotyping" identificó 51 cepas de *M. tuberculosis* y 7 cepas de *M. bovis*.

#### 6.4 Análisis estadístico

Utilizando el programa estadístico SPSS (Statsoft Inc., Tulsa USA) fue posible agrupar las cepas en base a sus patrones de "Spoligotyping". La representación de los resultados se obtuvo por medio del dendrograma que se muestra en la figura 9.

Los patrones de "Spoligotyping" fueron agrupados en cuatro "clusters" indicados con asterisco en la figura 9. Se define como un "cluster" a dos o más cepas que muestran patrones de hibridación idénticos<sup>19</sup>. Los "cluster" incluyen a las cepas: 430, 15 y 800, tipo 1 (primer "cluster"), 118 y 501, tipo 7 (segundo "cluster"); 178, 184 y 405 tipo 8 (tercer "cluster"); el último cluster fue el más común, pues incluye a las cepas 9, 10, 36, 39 y 124 (tipo 30). El resto de las

cepas, es decir el 77.6% (45 cepas), poseen cada una patrones particulares y por lo tanto no fueron agrupadas.

En la figura 10 se muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos por RFLP. En el dendrograma se identificaron 52 patrones de RFLP a partir de las 58 cepas estudiadas. Se encontraron 3 "clusters" con dos cepas cada uno. Estos incluyen a las cepas 9 y 10, 36 y 39, 178 y 445 respectivamente. El 89.6 % de las cepas fueron diferenciados por RFLP. Trece de las 58 cepas presentaron bajo número de copias del *IS6110* (4 o menos). Un de estas cepas con cuatro copias del elemento *IS6110*, no fue diferenciada por RFLP.

#### **6:5 Comparación entre el método de "Spoligotyping" y el método de RFLP-*IS6110***

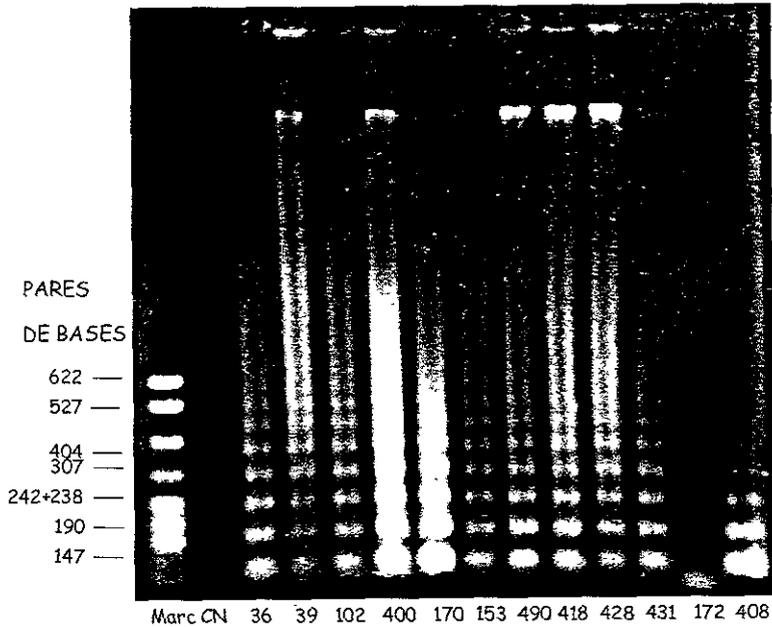
La tabla 8 resume los resultados obtenidos por los métodos de "Spoligotyping" y RFLP de manera individual y asociados. En total 54 cepas (48 más 6) fueron diferenciadas por ambos métodos.

Por "Spoligotyping" se identificaron 4 "clusters", por RFLP sólo 3 y uno de los "clusters" determinados por "Spoligotyping" como tipo 30, formó dos grupos por RFLP. Cuatro cepas fueron agrupadas en dos grupos. De las 13 cepas agrupadas por "Spoligotyping", 9 cepas fueron diferenciadas por RFLP.

Método	No. de cepas diferenciadas	No. de grupos	No. de cepas agrupadas	% de Cepas diferenciadas
"Spoligotyping"	52	3	6	77.6
RFLP	48	4	13	89.6
"Spo" + RFLP				Total 93.0

Tabla 8. Análisis de 58 cepas de *M. tuberculosis* estudiados, utilizando dos métodos de genotipificación; el método de "Spoligotyping" y el método de RFLP. En la primera columna se indica el método utilizado. En la segunda columna se indica el número de cepas diferenciadas por cada uno de los métodos, en la tercera columna se encuentra el número de grupos o "clusters" identificados por cada uno de los métodos, en la cuarta columna se encuentra el número de cepas que no fueron diferenciadas por cada método en forma individual y en la quinta columna se indica el porcentaje de cepas diferenciadas por cada uno de los métodos y el porcentaje de cepas diferenciadas por la suma de ambos métodos.

PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DEL LOCUS DR DE DIFERENTES  
 CEPAS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis*



Mr= Movilidad relativa de los marcadores de peso molecular,  
 CN = Control Negativo H<sub>2</sub>O

Fig 6 Electroforesis en gel de agarosa al 2 % mostrando los productos de amplificación del locus DR obtenido por PCR, para diferentes aislados del complejo *M. tuberculosis*. Los marcadores de movilidad relativa se muestran a la izquierda del gel. En cada carril se cargaron 10 µL de DNA y el gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/mL. El gel fue observado en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiado con un fotodocumentador (Gene Genius Syngene, UK).





**DENDROGRAMA DEL ANÁLISIS DE "SPOLIGOTYPING" PARA 58 CEPAS DE *M. tuberculosis***

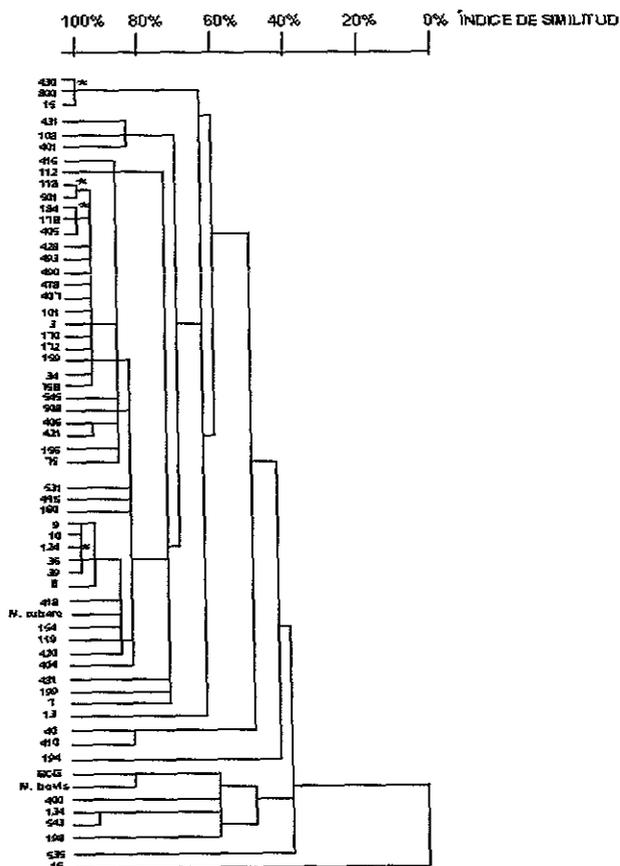


Figura 9 . Dendrograma obtenido con el programa SPSS, basado en los patrones de "Spoligotyping". Se muestra la relación genotípica entre 48 patrones de "Spoligotyping" identificados de los 58 aislados de *M. tuberculosis* de pacientes mexicanos analizados. Como sus controles se usaron las cepas H37Rv de *M. tuberculosis* y BCG y AN5 de *M. bovis*. Se agruparon en base a su índice de similitud (arriba del dendrograma). El número de la parte lateral izquierda se refiere a cada cepa. Los cuatro "clusters" definidos se indican con un asterisco (\*).

# DENDROGRAMA DEL ANÁLISIS DE RFLP PARA 58 CEPAS DE *M. tuberculosis*

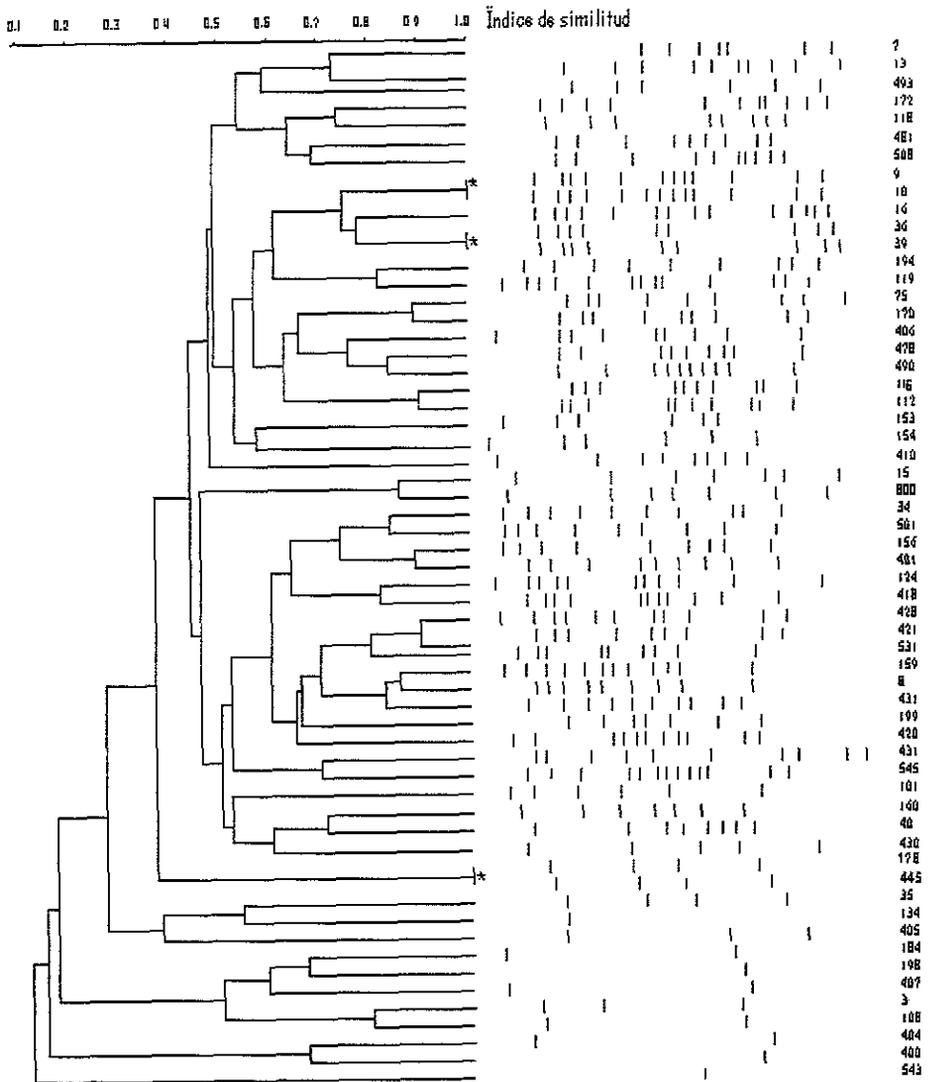


Figura 10. Dendrograma obtenido con el programa Gel Manager basado en los patrones de RFLP de cada aislado. En esta figura se muestra la relación genotípica de los 52 patrones de RFLP identificados a partir de los 58 aislados de *M. tuberculosis* de pacientes mexicanos. Se agrupan en base a sus índices de similitud, ordenados de mayor a menor similitud. Los números de la parte lateral señalan a cada cepa y los "clusters" se pueden identificar por el asterisco (\*).

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó un estudio descriptivo, para el análisis de cepas de *M. tuberculosis* implementando el método de "Spoligotyping". Además se comparó el poder discriminatorio del método de "Spoligotyping" con respecto al método de RFLP en el mismo grupo de cepas.

Se analizaron 58 cultivos puros obtenidos de pacientes con diagnóstico positivo de tuberculosis pulmonar. Como se puede observar de la tabla 8, la población estudiada fue heterogénea en cuanto a sexo, edad, ocupación, relación con el VIH, resistencia de las cepas a diversos medicamentos y datos epidemiológicos.

El método utilizado para la obtención de DNA se basó en el protocolo descrito por Telenti *et al*<sup>72</sup> con modificaciones; se realizó una desintegración mecánica de la micobacteria con perlas de vidrio siliconizadas. Los métodos alternativos de extracción de DNA que involucran digestión enzimática con lisozima y proteinasa K, no producen resultados consistentes y consumen más tiempo. Otras técnicas para el rompimiento de la pared celular de la micobacteria, tal como la sonicación, son probablemente igual de efectivas en cuanto a rendimiento y calidad del DNA que la utilizada por nosotros<sup>10</sup>.

Para el análisis del DNA obtenido, así como de los productos de amplificación del locus DR, se utilizó la electroforesis en gel de agarosa; ésta es una poderosa herramienta para la separación y caracterización de macromoléculas con diferentes tamaños y cargas<sup>67</sup>. La electroforesis en gel de agarosa es utilizada para separar y purificar fragmentos de DNA entre 0.5 y 25 kb. Otra técnica de electroforesis denominada electroforesis de campo

pulsado se ha utilizado para separar moléculas entre 10 a 2000 kb <sup>5</sup>. Nosotros amplificamos secuencias de DNA entre 0.5 y 0.15 kb, las cuales fueron separadas adecuadamente por electroforesis en gel de agarosa. Como se muestra en la figura. 6, de la amplificación del locus DR se obtienen una serie de productos en forma de escalera. En los casos en que el DNA no amplificó, se observó una banda en la parte inferior del gel al inicio de la corrida, como se observa en la muestra 172 de la figura 6. Esta banda probablemente corresponde al DNA del templado y a la mezcla de reacción. Para comprobar que no se habían obtenido productos en la muestra 72 y descartar la idea de que la electroforesis no era suficientemente sensible para detectar una baja cantidad de DNA amplificado, la muestra fue incluida en la hibridación en fase reversa. Los resultados de hibridación confirmaron la ausencia de DNA amplificado, por lo que no se obtuvo un patrón de hibridación para esta muestra (figura 7, cepa 172). Las probables razones de que la muestra no haya amplificado inicialmente son: que el DNA se encontraba degradado o contaminado con algún producto de reacción previa<sup>78</sup> o que la cantidad de DNA era menor a la necesaria para lograr productos de amplificación. Así, el criterio de la electroforesis fue importante en la metodología del "Spoligotyping", porque de esta forma sólo se realizaron los ensayos de hibridación a muestras con PCR positivo.

La técnica de hibridación en fase reversa que nosotros usamos, se ha utilizado para analizar el polimorfismo de locus en una sola reacción de hibridación. Fue inicialmente descrita por Saiki *et al* <sup>58</sup>. Goyal *et al* <sup>28</sup>, utilizaron la hibridación en fase reversa para detectar mutaciones asociadas a resistencia de rifampicina en el gen *rpoB* en cepas de *M. tuberculosis*. Todos estos estudios indican que la detección de la señal de hibridación es

suficientemente sensible para la identificación de blancos de DNA hibridizados. Además, en el caso de reacciones de quimioluminiscencia se puede detectar una sola copia de gen en 1 µg de DNA genómico y tiene la ventaja de que no utiliza isótopos radioactivos.

Estudios realizados por algunos investigadores usando análisis por "Spoligotyping"<sup>25, 36, 64</sup>, confirman la especificidad del método. Varios autores han demostrado que cepas de micobacterias atípicas, así como cepas de otras bacterias distintas a las micobacterias, no amplifican productos que puedan ser detectados por la hibridación con los 43 espaciadores utilizados en el "Spoligotyping". Un análisis comparativo entre 12 distintos métodos de genotipificación de cepas de *M. tuberculosis*, realizado por Kramer *et al*<sup>41</sup>, (5 de los métodos utilizaron el RFLP con diferente sonda y los otros 7 métodos se basaron en una amplificación por PCR), demostraron que el "Spoligotyping" es reproducible y que tiene un poder discriminatorio alto. Aunque el RFLP-*IS6110*, el mixed-linker PCR (PCR mixto ligado), el análisis APPCR (análisis de PCR usando iniciadores arbitrarios), el análisis PGRS RFLP y el análisis DRE-PCR (análisis de PCR basado en el doble elemento repetitivo) fueron ligeramente superiores, el "Spoligotyping" en particular, fue el único que además de tipificar en su totalidad 90 cepas estudiadas, no produjo resultados positivos con 10 de las cepas distintas al complejo *M. tuberculosis*, por lo que tuvo un 100% de especificidad. Es por ello que muchos investigadores han utilizado con buenos resultados el método de "Spoligotyping", a partir de muestras clínicas tales como esputo, lavado bronqueoalveolar, sangre o biopsia. Inclusive Qian *et al*<sup>55</sup> realizaron un estudio retrospectivo de la existencia de la familia "Beijing" de *M. tuberculosis* en muestras de tejidos de pulmón conservados desde 1952, demostrando que el método de "Spoligotyping" es una herramienta valiosa y

sensible que proporciona información de genotipificación en especímenes guardados más de 40 años. Quizá la principal ventaja es que la metodología incluye una amplificación por PCR, la cual aumenta logarítmicamente la cantidad de DNA que se analiza. En el caso del RFLP es diferente porque se parte de DNA genómico purificado, por lo tanto la cantidad necesaria para el análisis es mucho mayor. Dada su alta especificidad, una de las aplicaciones futuras del "Spoligotyping" en nuestro laboratorio es la detección directa a partir de muestras clínicas, lo que simplifica el análisis y reduce el tiempo de diagnóstico, dado que evita tener que cultivar a las micobacterias. Así, sería interesante usar al método de "Spoligotyping" como un método de diagnóstico y realizar estudios de validación, determinando su especificidad y sensibilidad para la detección de *M. tuberculosis* a partir de muestras clínicas en las que se sospeche de infección por *M. tuberculosis*. Es probable que solamente la amplificación por PCR y la detección de los productos por electroforesis en gel de agarosa, sea suficiente para identificar cepas del complejo *M. tuberculosis*. Este ensayo utilizaría el mismo procedimiento descrito por Eisenach *et al*<sup>23</sup>, en el cual utilizaron como blanco para la amplificación, una secuencia de 123 pb, localizada dentro del *IS6110*. La desventaja de utilizar al *IS6110* como un marcador en cepas del complejo *M. tuberculosis* es la existencia de cepas sin el elemento *IS6110*<sup>6</sup>.

El polimorfismo del locus DR acoplado a una reacción de PCR ha sido usado por Groenen *et al*<sup>29</sup> para detectar y diferenciar cepas de *M. tuberculosis*. Sin embargo, este método no es adecuado para laboratorios de rutina debido a sus demandas técnicas, puesto que además de utilizar un PCR y realizar una electroforesis, el método requiere de secuenciar la región obtenida por PCR.

Comparando los resultados de los controles obtenidos por nosotros y los reportados por Kamerbeek *et al*<sup>41</sup>, observamos en la figura 7 que el patrón de hibridación de nuestro control *M. tuberculosis* H37RV carece de las secuencias espaciadoras 22 y 23, mientras que nuestra cepa control *M. bovis* BCG carece de la secuencia espaciadora 16.

Analizando y comparando los resultados obtenidos por "Spoligotyping" y RFLP, observamos que el "Spoligotyping" detectó 48 patrones de hibridación distintos y el RFLP 52 tipos diferentes. Estos resultados concuerdan con los análisis de otros investigadores, los cuales demuestran que el método de RFLP tiene un mayor grado de diferenciación de *M. tuberculosis* que el "Spoligotyping" <sup>41, 27</sup>. Esto es válido siempre y cuando las cepas tengan un número mayor a 5 copias del elemento *IS6110*, ya que cuando las cepas tienen menos de cinco copias, el método de "Spoligotyping" resulta mejor.

En nuestro estudio, las cepas que no fueron diferenciadas por "Spoligotyping" y que el RFLP logró discriminar, se situaron muy cerca en el dendrograma obtenido por RFLP (ver figura 9 y 10). Por ejemplo; las cepas 15 y 800 tuvieron "Spoligotyping" tipo 1, y las cepas 178, 184 y 405 con "Spoligotyping" tipo 8, mostraron estrecha relación en el análisis por RFLP. Estos resultados son esperados, si pensamos que estas cepas están relacionadas y que el poder de discriminación del RFLP es tal, que permite detectar pequeñas variaciones. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Goguet *et al*<sup>25</sup>. Al analizar 101 cepas, ellos obtuvieron 57 patrones distintos por "Spoligotyping" y 81 patrones diferentes de RFLP. Las cepas con un mismo "Spoligotyping" que pudieron ser diferenciadas por análisis de RFLP-*IS6110*, tuvieron patrones similares. A diferencia de los resultados

descritos por Díaz *et al*<sup>19</sup>, en las cuales la mayoría de las cepas con idénticos patrones de "Spoligotyping" presentaron patrones de RFLP con un bajo grado de similitud. Estos autores no explican porque existen cepas con patrones de "Spoligotyping" idénticos y RFLP diferentes. Nosotros pensamos que en estos casos, las cepas no tienen un antecesor común y el hecho de que se hayan agrupado en el análisis de "Spoligotyping" puede deberse al menor poder discriminatorio del "Spoligotyping" que permite que las cepas se agrupen sin tener relación epidemiológica, en estos casos las agrupaciones son producto del azar.

La razón de que cepas con multicopias del elemento *IS6110* sean mejor discriminadas por el RFLP esta fundamentado en el hecho de que el RFLP usa todo el DNA genómico, mientras que el método de "Spoligotyping" utiliza solo una región del genoma de *M. tuberculosis* (el locus DR), lo que disminuye la posibilidad de encontrar polimorfismo. Otra posible explicación del mayor polimorfismo encontrado por RFLP se puede basar en los resultados de Alito *et al*<sup>2</sup>. En este trabajo, se estudio una posible transmisión nosocomial de cepas multidrogorresistentes en Argentina. En el estudio con nueve cepas incluidas en uno de los brotes, 5 de las cuales eran VIH positivas, presentaron patrones de "Spoligotyping" idénticos pero diferentes patrones de RFLP. Los autores sugieren que existe una mayor evolución en polimorfismo del RFLP que en el del "Spoligotyping" y que existe una mayor inestabilidad en el elemento *IS6110* que en el locus DR. Adicionalmente, en este mismo trabajo se encontraron cambios en el patrón de RFLP de un mismo aislado, cuando se realizó el RFLP después de un año. Estos resultados coinciden con un estudio realizado por Gutierrez *et al*<sup>33</sup>, de un brote de transmisión nosocomial con cepas multidrogorresistentes, en el cual existió una cepa que difería ligeramente de los patrones de las otras, la

cepa había sido diagnosticada tres años después que las demás. Se asumió por estudios epidemiológicos tradicionales, sensibilidad a las drogas y pruebas bioquímicas, que este aislado tenía el mismo origen. Además, las cepas de este brote fueron estudiadas por análisis de "Spoligotyping" y se encontró que todas las cepas presentaban el mismo patrón, incluyendo la cepa que había sido analizada tres años después, por lo tanto se asumió que la cepa diferente había sufrido una mutación. En un estudio más específico para determinar la estabilidad tanto del método de RFLP-*IS6110* como la del "Spoligotyping" realizado por Niemann *et al*<sup>48</sup>, se demostró que el "Spoligotyping" tiene una tasa de variación menor comparada con el RFLP. Así de 56 cepas de pacientes con tuberculosis analizados en el transcurso de 772 días, 5 cepas (9%) presentaron cambios en los patrones de RFLP, mientras que no se detectaron en ningún caso cambios en los patrones de "Spoligotyping".

En el dendrograma de la figura 10, se observan tres grupos con patrones de RFLP idénticos (cepas 178, 445; 36, 39 y 9, 10). De las cepas anteriores, solo las cepas 178 y 445 fueron diferenciadas por "Spoligotyping" (ver figura 9). En cuanto a las cepas 36 y 39, se piensa que existió una contaminación en el laboratorio, puesto que cuando se realizó el RFLP a la cepa 39, presentaba un patrón muy diferente al obtenido cuando la cepa fue analizada al final del estudio. En cuanto a las cepas 9 y 10, no se encontró relación cuando se revisaron los datos clínicos de los pacientes. Las cepas 178 y 445 (diferenciadas por "Spoligotyping") con RFLPs idénticos, tienen cuatro copias del elemento *IS6110*, lo cual comprueba la teoría que para las cepas con bajo número de copias del elemento *IS6110*, el método de "Spoligotyping" tiene un mejor poder discriminatorio<sup>68,75</sup>.

La presencia de cepas con un bajo número de copias ha cobrado mayor

importancia, Bauer *et al*<sup>6</sup> reportaron un incremento en el número de cepas en Dinamarca con bajo número de copias del elemento *IS6110*. Esto se debió a un incremento en grupos de cepas originarias de inmigrantes, principalmente del centro y del este de Africa y algunos de Asia. Si este es el caso en otras partes del mundo, es posible considerar que lo mismo puede ocurrir en nuestro país y así el método de "Spoligotyping" puede ser de gran utilidad en México, para la caracterización de cepas con bajo número de copias del *IS6110*. Nosotros encontramos en la muestra estudiada 14 cepas con 5 ó menos copias del *IS6110*.

Debido a que las cepas de *M. bovis* tienen bajo número de copias del elemento *IS6110*, generalmente de 1 a 5<sup>74</sup>, el método de "Spoligotyping" es una poderosa técnica para diferenciación de cepas de *M. bovis*, a diferencia del RFLP<sup>61</sup>. Nosotros inicialmente pensábamos que todas las muestras incluidas en nuestro trabajo eran de la especie *M. tuberculosis*, ya que desafortunadamente las pruebas bioquímicas que se habían realizado en el laboratorio no aportaban resultados concluyentes en cuanto a la diferenciación de especie. Pero cuando se realizó el análisis de "Spoligotyping" se identificaron 7 cepas de *M. bovis*, 4 de las cuales tuvieron de 4 a 1 copia del *IS6110* (cepas 134, 198, 400 y 543) y una (430), tuvo 5 copias del *IS6110*. En los estudios de Serraino *et al*<sup>64</sup> se analizaron por "Spoligotyping" 30 cepas provenientes de ganado y de jabalíes que mostraron patrones característicos de *M. bovis*, los cuales fueron confirmados por pruebas bioquímicas. Por lo que no se puede menospreciar la importancia de la tuberculosis bovina, ya que ésta es una enfermedad endémica causante de grandes pérdidas de ganado en muchas partes del mundo, incluyendo México y la infección por *M. bovis* es importante desde el punto de vista epidemiológico. a pesar de que se ha

subestimado su importancia como fuente de contagio en humanos, lo cual ha sido más evidenciado por la infección en pacientes con VIH. Por ello existe la necesidad de utilizar un método que permita diferenciar entre las especies de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. En este sentido, el método de "Spoligotyping" puede ser útil para detectar casos de infecciones por *M. bovis* en humanos inmunocompetentes, pues como se menciono anteriormente la infección por *M. bovis* ha aumentado en humanos, porque la inmunosupresión causada por el VIH ha dado casos de infección bovina cada vez más comunes en pacientes con VIH, principalmente en hospitales y prisiones<sup>27, 61</sup>. Aún más, estudios realizados por algunos investigadores con el método de "Spoligotyping", han permitido encontrar tanto rutas de transmisión entre animales silvestres y domésticos, como contagios de animales a humanos<sup>4, 16, 81</sup>.

Por otro lado, nosotros no encontramos cepas sin el locus DR, al igual que en la mayoría de los estudios realizados con "Spoligotyping". Por ejemplo, en un estudio preliminar realizado por Kamberkee *et al*<sup>41</sup>, se analizaron más de 1, 000 cepas de *M. tuberculosis* y 500 cepas de *M. bovis*, en todos los casos se logró amplificar el locus DR. Sin embargo en un trabajo realizado por Horgen *et al*<sup>40</sup>, en Guadalupe Francia, se encontraron cepas de *M. tuberculosis* que no pudieron ser tipificadas por el método de "Spoligotyping". Los autores suponen que estas cepas carecen del locus DR. No obstante, en éste estudio no se realizó la secuenciación para confirmar que efectivamente aquéllas cepas carecían del locus DR. Además, los autores sugieren que la posibilidad de encontrar cepas con bajo número de copias del *IS6110* es muy baja y que probablemente las cepas por ellos identificadas sean únicas de esta región.

Tampoco se encontraron en nuestro estudio, cepas sin el elemento

*IS6110*. Se han reportado casos de cepas en las que se encuentra ausente el elemento *IS6110*, particularmente en cepas pertenecientes a *M. bovis*<sup>1</sup>, las cuales han sido analizadas por "Spoligotyping". Como en el caso de Goguet *et al*<sup>25</sup>, quienes reportaron tres cepas sin el elemento *IS6110* que fueron diferenciadas por "Spoligotyping".

Debido a que se ha demostrado que en la mayoría de los casos, el método de RFLP tiene un mayor poder de discriminación que el método de "Spoligotyping", se ha planteado la necesidad de mejorar el poder de discriminación del "Spoligotyping". A la fecha se han descrito 43 secuencias espaciadoras en el locus DR del genoma de las cepas H37Rv y BCG de *M. tuberculosis*<sup>74</sup>, pero existe la posibilidad de encontrar un mayor número de secuencias espaciadoras, por lo que es necesaria la secuenciación de una mayor cantidad de cepas. De ser así, el método podría incluir más elementos con los cuales podría aumentar su poder de discriminación<sup>35, 41, 42</sup>.

Un aspecto importante que debe ser tomado en cuenta cuando se va a elegir un determinado método de genotipificación es el tiempo necesario para obtener resultados. Esto es importante, porque el control adecuado de la enfermedad implica un diagnóstico rápido, de la tipificación del agente causal y de un tratamiento temprano y seguro<sup>40</sup>. Es durante el período de inicio de la enfermedad, sobre todo en pacientes con infecciones agregadas como aquellos con VIH o con sospecha de tuberculosis multidrogorresistente, que se requiere una rápida decisión en relación con el régimen de tratamiento y con la situación del paciente<sup>28</sup>. Los métodos de RFLP y "Spoligotyping" permiten la detección de rutas de infección, incluyendo vías de transmisión de cepas multidrogorresistentes y brotes entre pacientes coinfectados con el VIH<sup>61</sup>, así

como contaminación en el laboratorio <sup>57</sup>. Sin embargo, de los dos métodos el de "Spoligotyping" ha demostrado ser más rápido <sup>68</sup>. De acuerdo a nuestra propia experiencia, aún cuando se trabajó con cultivos puros, el método de "Spoligotyping" fue más rápido y fácil de realizar que el RFLP. El método de "Spoligotyping" requiere poca cantidad de DNA (10 ng en el "Spoligotyping" frente a 100 ng en el RFLP), por lo tanto el tiempo de crecimiento necesario para obtener suficiente DNA para llevar a cabo el análisis del "Spoligotyping" es menor. Además, debido a que en el "Spoligotyping" se amplifica solamente una región del genoma de *M. tuberculosis*, no es estrictamente necesario que el DNA se encuentre totalmente íntegro, sólo se requiere que la región de DNA que se va a amplificar se encuentre a una concentración adecuada y no se encuentre degradado. Esto no sucede con el RFLP, en donde la integridad de todo el genoma es requisito indispensable para obtener un resultado confiable. Adicionalmente, el "Spoligotyping" toma aproximadamente de 1 a 2 días para llevarse a cabo en su totalidad, mientras que el RFLP tarda más de 72 horas. En el "Spoligotyping" se pueden procesar simultáneamente 43 muestras y además es posible volver a utilizar la membrana hasta 15 veces más, lo que lo hace más económico que el RFLP. Por su parte, el diseño del método de RFLP solo permite analizar de 10 a 12 muestras en una sola corrida.

Dado que los resultados del "Spoligotyping" se resumen en un patrón de hibridación en forma de código de manchas, solo existen dos posibilidades: que las manchas se encuentren presentes o ausentes, pero no existen variaciones en su posición. De esta forma el análisis de "Spoligotyping" puede ser efectuado usando una hoja de cálculo, sin la necesidad de utilizar programas sofisticados como en el caso del RFLP <sup>27</sup>. Esto es muy importante en países latinoamericanos en donde no se cuenta con los recursos necesarios para

adquirir equipos que utilizan programas de computación costosos y sofisticados.

Con los resultados obtenidos podemos afirmar que el uso combinado de ambas metodologías: "Spoligotyping" y RFLP-*IS6110*, proporciona una mejor discriminación que el utilizar solamente una de las dos. El uso de ambas metodologías ha sido propuesto por varios autores<sup>25, 68</sup>, los cuales sugieren utilizar una estrategia de tipificación combinada como la que se muestra en la figura 11. Así, a partir de una gran colección de muestras, se podrá utilizar el método de "Spoligotyping" como un método inicial para la tipificación y basándose en los resultados obtenidos, procesar por RFLP únicamente las muestras con patrones de "Spoligotyping" idénticos. En este sentido, el RFLP que ha sido internacionalmente aceptado, podría utilizarse para discriminar aquellas cepas que el "Spoligotyping" no es capaz de diferenciar. Esta estrategia puede permitir el análisis rápido y eficiente de un gran número de muestras<sup>25</sup>. Tal es el caso de los estudios de Bauer *et al*<sup>6</sup>, quienes utilizaron ambas técnicas para diferenciar 311 cepas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*, logrando una mejor diferenciación al combinar ambos métodos que cuando estos fueron utilizados por separado. Así, por "Spoligotyping" se agruparon el 75 % de las cepas y por RFLP el 83%, mientras que la combinación de ambas se agruparon el 95% de las cepas.

Además, de acuerdo a los resultados de Díaz *et al*<sup>19</sup>, cepas con distintos patrones de "Spoligotyping" presentan en todos los casos distintos patrones de RFLP, por lo cual se hace innecesaria la tipificación adicional por el método de RFLP de cepas diferenciadas ya por "Spoligotyping". Así también, los estudios realizados por Niemann *et al*<sup>48</sup>, confirman la estabilidad del "Spoligotyping".



Figura 11. Estrategia propuesta para tipificar una gran cantidad de cepas de *M. tuberculosis*. El "Spoligotyping" se sugiere como método de tipificación inicial y el RFLP como un método de subtipificación definitivo.

Ellos analizaron cepas de 56 pacientes por más de dos años y encontraron que los patrones de "Spoligotyping" se mantuvieron sin cambios, por el contrario en el caso del RFLP se encontraron cambios en el 5% de las cepas, lo que demuestra que cuando las cepas tienen diferentes patrones de "Spoligotyping" es debido a que pertenecen a pacientes no relacionados, mientras que en el caso del RFLP puede ser producto de la inestabilidad del elemento de inserción *IS6110*. Por ello consideramos adecuada la propuesta de utilizar ambos métodos conjuntamente, como se esquematiza en la figura 11, para la mejor tipificación de cepas de *M. tuberculosis*.

## 8. CONCLUSIONES

El método de "Spoligotyping" permite la tipificación de cepas del complejo *M. tuberculosis* obtenidas a partir de pacientes mexicanos.

El "Spoligotyping" permite diferenciar entre las especies *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

El "Spoligotyping" es rápido, sencillo, reproducible y menos costoso, que el RFLP.

A pesar de que el RFLP discrimina un mayor número de cepas que el método de "Spoligotyping", cuando las cepas tienen un bajo número de copias del elemento *IS6110*, el método de "Spoligotyping" resultó un mejor método de discriminación.

El método de "Spoligotyping" tiene utilidad como método de tamizaje preliminar, para diferenciar cepas de *M. tuberculosis*, especialmente cuando el número de cepas a analizar es grande, lo que podría disminuir tiempo y costos en estudios de epidemiología molecular.

## 9. RESUMEN

El método de "Spoligotyping" utiliza como blanco para la amplificación una secuencia altamente polimórfica denominada locus de repetición directa (DR) presente únicamente en cepas del complejo *M. tuberculosis*. El polimorfismo del locus DR es debido a que las cepas pueden variar en el número de DRs y en la presencia o ausencia de secuencias espaciadoras.

En el presente trabajo, se realizó la estandarización del método de "Spoligotyping" con muestras provenientes de pacientes mexicanos.

Un total de 58 cepas de *M. tuberculosis* de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar fueron tipificadas por el método de "Spoligotyping". Se consideraron los resultados de tipificación por RFLP obtenidos previamente en nuestro laboratorio y se comparó la capacidad de discriminación de cepas de *M. tuberculosis* por cada método.

Para realizar el método de "Spoligotyping" se obtuvo DNA de 58 cultivos de *M. tuberculosis* por medio de una extracción mecánica. Posteriormente se llevó a cabo una amplificación del locus DR por PCR. A las muestras con PCR positivo se les realizó la hibridación en fase reversa. Se obtuvieron los patrones de hibridación del "Spoligotyping" por una reacción de quimioluminiscencia y la exposición de una placa de rayos X a la membrana. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS, a partir del cual se obtuvo un dendrograma que estableció relaciones genotípicas entre las cepas.

Por el método de "Spoligotyping" se encontraron 48 patrones de hibridación diferentes, 4 patrones se encontraron repetidos en más de dos muestras, es decir el 82% de las cepas no se encontraron relacionadas genéticamente. Este método permitió la identificación de 7 cepas de *M. bovis*

y 51 cepas de *M. tuberculosis*. Las muestras fueron procesadas por duplicado obteniendo patrones similares en todos los casos. Los patrones de las cepas control que nosotros obtuvimos fueron similares a los reportados por Kamerbeek *et al*<sup>41</sup>. En nuestro trabajo encontramos ausencia de las secuencias espaciadoras 22 y 23 en la cepa H37Rv y de la secuencia espaciadora 15 en la cepa BCG, ambas comparadas con los patrones reportados por Kamerbeek.

Con el mismo número de cepas, el método de RFLP produjo 52 patrones distintos (89%), tres pares de cepas con patrones idénticos.

Así, el método de RFLP tuvo un mayor poder discriminatorio que el método de "Spoligotyping". Sin embargo, en dos muestras con un bajo número de copias del elemento *IS6110*, el "Spoligotyping" resultó un mejor método de diferenciación.

El 93% de las cepas analizadas fueron diferenciados con los dos métodos. La utilización de ambos métodos, permitió una mayor discriminación de las cepas de *M. tuberculosis*.

Debido a la rapidez y simplicidad del método de "Spoligotyping", sugerimos que puede utilizarse dentro de una estrategia epidemiológica que incluya al método de "Spoligotyping" como un método inicial, seguido por un análisis de RFLP.

## 10. ABREVIATURAS

APPCR	Análisis de PCR usando iniciadores arbitrarios
ATCC	Colección americana de cultivos tipificados
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dATP	desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	desoxicitocina-5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanina-5'-trifosfato
dNTPs	desoxirribunucleótidos trifosfato
dTTP	desoxitimina-5'-trifosfato
DR	Repetición directa
DRE-PCR	Análisis de PCR basado en el elemento doble repetitivo
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en placa sólida
IS6110	Secuencia de inserción 6110
MDR	Multidrogorresistente
MDR-TB	Tuberculosis multidrogorresistentes
MPTRs	Regiones polimórficas arregladas en "tandem"
NAP	p-Nitro-alfa-acetil-aminohidroxiopropiofenona
OMS	Organización Mundial de la Salud

OPS	Organización Panamericana de la Salud
PANTA	Mezcla de Polimixina B, Anfotericina B, Ácido nalidíxico, Trimetroprim y Azlocilina
pbs	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGRS	Polimorfismo en la secuencia repetitiva rica en G-C
RAPD	DNA polimórfico amplificado al azar
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIRE	Mezcla de Estreptomina-Isoniazida-Rifampicina-Etambutol
SS	Secretaría de Salud
SSPE	Amortiguador salino de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /EDTA
TA	Temperatura ambiente
TAE	Amortiguador de Tris/acetato/EDTA
TAES	Tratamiento acortado estrictamente supervisado
TE	Amortiguador de Tris/EDTA
TB	Tuberculosis
TCH	Ácido tiofen carboxílico
VIH	Virus de inmunodeficiencia adquirida

## 11. APÉNDICE

### Soluciones y amortiguadores

#### SOLUCIONES GENERALES

##### ○ EDTA 0.5 M (pH=8)

Agregar 186.1 g de etilendiaminotetracético de disodio bihidratado en 800 ml de agua. Agitar vigorosamente en un agitador magnético. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH. Dispensar en alícuotas y esterilizar en autoclave.

##### ○ SDS 10%

Disolver 100 g de duodecil sulfato de sodio (también llamado lauril sulfato de sodio) grado electroforesis en 900 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Calentar a 68°C hasta disolución. Ajustar el pH a 7.2 con unas gotas de HCl concentrado. Ajustar el volumen a un litro con H<sub>2</sub>O destilada. Dispensar en alícuotas.

NOTA: Usar una mascarilla cuando se pese el SDS y limpiar el área de pesado después, ya que los cristales finos de SDS se dispersan fácilmente. No es necesario esterilizar el SDS 10%.

##### ○ Amortiguador TE 10X

Disolver 12.11 g de Tris base (PM 121.1 g) en 900 ml de agua destilada hasta disolución. Agregar 20 ml de EDTA 0.5 M. Ajustar el pH a 8 con HCl concentrado y agua destilada a volumen final de 1 litro. Esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente (TA) máximo 1 año.

##### ○ Amortiguador 50X TAE

Disolver 242 g de Tris base, con 57.1 ml de ácido acético glacial más 100 ml de EDTA 0.5 M en 900 ml de agua desionizada. Ajustar a pH 8 y llevar

con agua destilada a un volumen final de 1 litro. Esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente (TA) máximo 1 año.

### SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA

#### ○ Preparación de perlas de vidrio cubiertas de silicón.

Se debe trabajar en campana de flujo laminar. Las perlas de vidrio 40 mesh se lavan con SDS al 0.2% y se dejan en esa solución durante una noche. Después se lavan con agua destilada y se secan en el horno a 70°C durante 15 min. El prosil 28 se diluye con agua destilada a una dilución máxima de 1:500 y una dilución mínima de 1:100. Esta solución se pone en contacto con las perlas de vidrio por 30 seg. Posteriormente se secan en el horno a 70°C por 15 minutos y se esterilizan en autoclave.

#### ○ Amortiguador de TE 1X

Tomar un volumen de TE 10X y 9 volúmenes de agua destilada. Esterilizar en autoclave y guardar máximo un año.

#### ○ Cloroformo

Guardar en frasco ámbar o cubrir el frasco con papel de aluminio a 4°C no más de un año.

#### ○ Etanol absoluto

Guardar en frasco ámbar o cubrir el frasco con papel aluminio a TA. La solución se puede guardar hasta como máximo un año.

#### ○ Etanol al 70%

Mezclar 7 volúmenes de etanol con 3 volúmenes de agua destilada. Guardar en frasco ámbar o cubrir el frasco con papel aluminio a TA máximo un año.

○ Fenol buffer saturado

El fenol buffer saturado se utiliza tal como viene preparado. Se recomienda guardar en frasco ámbar o cubrir el frasco con papel aluminio a TA. La solución se puede conservar en estas condiciones máximo un año.

○ Fenol-cloroformo

Agregar un volumen de fenol buffer saturado más un volumen de cloroformo. Se recomienda guardar la mezcla en frasco ámbar o cubrir el frasco con papel aluminio a TA. La mezcla se puede conservar en estas condiciones máximo un año.

SOLUCIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL LOCUS DR

○ Amortiguador de PCR 10X, contiene:

Tris-HCl 100 mM, pH= 8.3

KCl 500 mM

Gelatina 10 µl/ml. En un volumen final de 1.5 ml.

○ Amplificasa (Taq polimerasa)

0.5 ml de DNA-polimerasa termoestable recombinante concentración 5U/µl. Guardar en refrigeración a 4°C.

○ Cloruro de magnesio 20X

20 X equivale a una concentración de MgCl 30 mM. El vial contiene 1 ml de esta solución.

○ dNTP's

Agregar 10µl de cada dNTP (solución 100 mM de dATP, dGTP, dTTP y dTTP) y 360 µl de agua desionizada. Guardar en alícuotas de 1ml a -20° C máximo un año.

○ Iniciadores

Oligonucleótido DRa liofilizado:

Fórmula: 1 nmol oligo →  $\frac{\text{Unidad de densidad óptica} \times 90}{\text{longitud del oligo}} = \frac{7.7 \times 90}{18} = 38.5 \text{ nmol}$

$$\frac{38.5 \text{ nmol oligo}}{\text{ml}} = 38.5 \frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}}$$

Resuspender el liofilizado en 385 µl de agua estéril para obtener una concentración final de 100 pmol/µl.

°Oligonucleótido DRb liofilizado:

Unidades de densidad óptica 8.5

$$\frac{8.5 \times 90}{18} = 42.5 \text{ nmol}$$

Resuspender el liofilizado en 425 µl de agua estéril para obtener una concentración final de 100 pmol/µl.

De cada iniciador con concentración de 100 pmol/µl tomar una alícuota de 50µl y disolver con 450 µl de agua estéril para obtener una concentración final de 10 pmol/µl y preparar alícuotas de 100 µl cada una.

## SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

### ○ Amortiguador 1XTAE

Tomar 20 ml de amortiguador TAE 50X y llevar al aforo de 1 litro con agua destilada.

### ○ Amortiguador de Carga 6X

Contiene:

0.25% Xileno-cianol

0.25% Azul de bromofenol

30% de Glicerol agua

### ○ Marcador de peso molecular pBR322

Digerido con la endonucleasa de restricción Msp 1 se encuentra a una concentración de 0.05 µg/µl en amortiguador de carga:

Ficoll 400 5%

EDTA 40 mM

Azul de bromofenol 0.02%

## SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA Y PARA LA HIBRIDACIÓN

### ○ 20X SSPE

Disolver 175.3 g de NaCl, 27.6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 7.4 g de EDTA en 800 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Ajustar el pH a 7.4 con NaOH (6.5 ml de una solución 10 N) ajustar el volumen a un litro en  $\text{H}_2\text{O}$ . Dispensar dentro de alícuotas. Esterilizar por autoclave.

### ○ 2XSSPE

La solución 20XSSPE se diluye 1:10 y se esteriliza en autoclave.

○ 2X SSPE/ 0.1%

Agregar 100 ml de 20XSSPE y 10 ml de SDS 10% en 890 ml de agua desionizada, aforar a 1000 ml. Preparar antes de su uso.

○ 2XSSPE/0.5%

Agregar 100 ml de 20XSSPE y 50 ml de SDS 10% en 850 ml de agua desmineralizada, aforar a 1000 ml. Preparar antes de su uso.

○ Solución del conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina

Agregar 17  $\mu$ l del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina a 50 ml de solución de 2XSSPE/0.5%. Se obtiene una dilución aproximada de 1:3000. Preparar antes de su uso.

#### SOLUCIONES PARA REUSO DE LA MEMBRANA

○ 20 mM EDTA

Agregar un volumen de 0.5 M EDTA en 24 volúmenes de agua desionizada. Guardar a TA máximo 1 año.

○ 1% SDS

Agregar 100 ml de 10% SDS en 900 ml de agua desionizada. Guardar a TA máximo 1 año.

## 12. GLOSARIO

Aislado	El que se obtiene de un cultivo puro de un organismo.
Alineamiento	Es la unión de una hebra complementaria de DNA a su secuencia antiparalela para formar una doble cadena de DNA.
Amplificación	Se refiere a la producción exponencial de copias adicionales de una secuencia de DNA por reacción enzimática.
Anticuerpo	Una proteína que interactúa con un sitio particular (epítipo) de un antígeno y facilita la eliminación del antígeno por varios mecanismos.
Antígeno	Cualquier material soluble o particulado de carácter exógeno capaz de inducir una respuesta inmune.
Cepa	Es la progenie y el subcultivo de una colonia única aislada en un cultivo puro.
Disnea	Dificultad en la respiración.

DNA genómico	Toda la secuencia de DNA que contiene el genoma de una célula.
DNA polimerasa	Es una enzima que sintetiza una nueva hebra de DNA bajo la dirección de un DNA templado.
DNA recombinante	Una molécula de DNA formada por fragmentos de DNA unidos de diferentes fuentes. Son comúnmente producidos por moléculas de DNA cortadas por enzimas de restricción y unidos por acción de DNA ligasas.
Duplex	DNA complementario de doble cadena.
Electroforesis	Una técnica para la separación de moléculas basada en su migración en un gel u otro medio sujeto a un campo eléctrico.
Enfermedad emergente	Infecciones que han aparecido en una población o que han existido pero que rápidamente han incrementado su incidencia o intervalo geográfico. Por ejemplo SIDA, fiebre del dengue, cólera.

Enzimas de restricción	Enzima que reconoce secuencias específicas de DNA. Estas enzimas cortan el DNA algunas veces en el sitio blanco y otras veces en regiones cercanas al mismo.
Epidemiología	Es la ciencia que describe las relaciones dinámicas entre enfermedad y población.
Febrícula	Hipertermia prolongada, de origen nervioso o infecciosos.
Fístula	Conducto anormal, ulcerado y estrecho que se abre en la piel o en las membranas.
Fluorimetría	Medición de la excitación de la luz y detección de su emisión.
Hemoptisis	Emisión por vía oral de sangre procedente de los pulmones.
Hibridación	Asociación de moléculas de ácido nucleico complementarias de doble hebra. Los híbridos pueden contener 2 hebras de DNA, 2 hebras de RNA o una de DNA y una de RNA. En hibridación <i>in situ</i> es una técnica para determinar la localización de una secuencia

específica de RNA dentro de un tejido o célula por una sonda de una sola cadena de ácido nucleico, seguida por detección (Autorradiografía).

**Hibridación en fase reversa** Método que utiliza sondas de oligonucleótidos inmovilizadas dentro de un soporte sólido y la hibridación subsecuente de DNA amplificado y marcado con algún compuesto como biotina o digoxigenina.

**Iniciadores** Es una secuencia corta (generalmente de RNA) que es complementaria con una hebra de DNA y proporciona un extremo 3'-OH libre, en el cual comienza la síntesis de una cadena de DNA.

**Inmunidad mediada por células** Involucra la interacción de linfocitos T con con fagocitos, es esencial para la prevención del cáncer y la infección con patógenos intracelulares.

**Inmunocompetencia** El estado normal del sistema inmunológico, que se traduce en resistencia a las infecciones.

Immunodeficiencia	Estado anormal del Sistema Inmunitario por el cual la inmunidad celular o la humoral son inadecuadas y disminuyen la resistencia de las infecciosas.
Inmunógenos	Sustancia capaz de producir una respuesta inmune.
Locus	Es el sitio de localización específico de un gen para una característica particular en un cromosoma, el locus puede ser ocupado por cualquiera de los alelos para el gene.
Marcador de DNA	Es un grupo de fragmentos de DNA de tamaño conocido que se usa para calibrar un gel de electroforesis.
Métodos de genotipificación	Los métodos que se basan en las características de la información genética contenida en un patógeno.
Mutación	Describe un cambio en la secuencia del DNA genómico.

Necrosis	Muerte de algunos elementos celulares en el interior de un cuerpo vivo, con la pérdida de la integridad celular.
Hibridación RNA-DNA	Es una técnica para transferir RNA de un gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa en la cual se puede hibridar a una sonda de DNA complementario.
pBR322	Es uno de los vectores de derivados de plásmidos para clonación estándar.
Polimorfo	Que puede tener varias formas.
Proceso meningítico	Proceso que consiste en una inflamación de las meninges causada por agentes bacterianos, viricos o protozoarios. Sus síntomas son fiebre, vómito, convulsiones y rigidez de la nuca.
Prueba de la tuberculina	Se usa para determinar la hipersensibilidad tardía que se interpreta como antecedente de haber estado en contacto con <i>M. tuberculosis</i> u otras micobacterias.

Quimioluminiscencia	Emisión de luz producida por medio de una reacción química.
Quimioterapia	Tratamiento de las enfermedades por medios químicos.
Reacción en cadena de la polimerasa	Describe una técnica en la cual, los ciclos de desnaturalización, alineación con iniciadores y extensión con DNAPolimerasa, son usados para amplificar exponencialmente un número de copias de una secuencia de DNA blanco usando iniciadores específicos.
Recombinación homóloga	Recombinación entre dos moléculas de DNA de secuencia similar, ocurre en todas las células, ocurre durante la meiosis y la mitosis en eucariotes.
Repeticiones en "tandem"	Son copias múltiples de la misma secuencia situadas en serie.
Resistencia	Fenómeno por el cual ciertos organismos que eran especialmente sensibles a determinadas sustancias químicas ya no lo son.

Respuesta humoral	Inmunidad conferida a anticuerpos circulantes producidos por linfocitos T y células plásmaticas.
Secuencia Chi	Es un octamero que proporciona un hot-spot para recombinación genética en <i>E. coli</i> .
Secuencia de inserción	Es una pequeña secuencia de DNA bacteriano que lleva solo el gene necesario para su transposición.
Secuencia palindrómica	Secuencia nucleotídica que es idéntica a su secuencia complementaria donde la lectura de la secuencia es leída igual en las dos direcciones (5' → 3' y 3' → 5').
Sistémico	Pertenece a la circulación general. Pertenece al cuerpo considerado como una unidad funcional.
Sonda	Fragmento de DNA o RNA, marcado radioactivamente o químicamente, que es usado para localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos por hibridación.

Supuración	Acción y efecto de formar pus en una lesión, por la acción de gérmenes patógenos.
Transposon	Es una secuencia de DNA capaz de insertarse ella misma en una nueva localización en el <i>genoma</i> .
Tuberculosis extrapulmonar	Diseminación de los bacilos de la tuberculosis de lesiones pulmonares por la sangre, con lo cual la infección puede abarcar cualquier órgano o sistema.
Tuberculosis multidrogorresistente	Resistencia a dos o más drogas (por ejemplo a isoniazida y rifampicina).
Virulencia	Patogenicidad relativa de un microorganismo.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Agasino C., Ponce de Leon A., Jasmer R. and Small P. Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains in San Francisco that do not contain *IS6110*. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2 (6): 518-20.

2. Alito A., Morcillo N., Scipioni S., Dolmann A., Romano M. I., *et al*. The *IS6110* restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. J Clin Microbiol 1999; 37 (3): 788-91.

3. Alland D., Kalkut E., Moss A., McAdam R., Hahn J., *et al*. Transmission of tuberculosis in New York City. N Engl J Med 1994;330:1710-6.

4. Aranaz A., Liébana E., Mateos A., Domínguez L., Vidal D., *et al*. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* trains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996; 34 (11): 2734-40.

5. Ausubel R., Kingston R., More D., Smith J., *et al*. Short protocols in molecular biology. Third Edition. Published by John Wiley. Canada 1995. Chapter 2.

6. Bauer J., Andersen A., Kremer K. and Miørner H. Usefulness of Spoligotyping to discriminate low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. J. Clin Microbiol 1999; 37 (8): 2602-6.

7. Balandrano S., Anzaldo G., Peña G., Betancourt X. Manual de Procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR. No.18 Tuberculosis, Alejandro Escobar Gutiérrez, México 1996.

8. **Bernard D.** Microbiology. 4<sup>a</sup> edition. Lippincott Company. Philadelphia, Pennsylvania 1990. Chapter 35.

9. **Bloom B.** Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1994. Chapter 4, 6, 7, 30 y 33.

10. **Buck G., O'Hara L. and Summersgill.** Rapid, simple method for detecting clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992. 30:1331-4.

11. **Burton R.** Microbiology for the health sciences. Third Edition. Mycobacteria. Lippincott Company. Philadelphia Pennsylvania 1988. Chapter 41

12. **Clarridge III J., Shawar R., Shinnick T. and Plikaytis B.** Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. J. Clin. Microbiol 1993; 31 (8): 2049-56.

13. **Cole S. and Talenti A.** Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Eur Respir J 1994; 20: (Suppl.) 701s-13s.

14. **Control disease center.** Management of persons exposed to multidrug-resistant tuberculosis. MMWR 41 1992; (RR-11): 59-71.

15.

16. **Cousins D., Williams S., Liébana E., Aranaz A., Bunschoten A., et al.** Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1998; 36(1): 168-78.

17. **De Beenhouwer H., Lhiang Z., Jannes G., Rossau R., et al.** Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from

tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tuberc Lung Dis* 1995; 76: 425-30.

18. de la Fuente J., Narro J. y Rodríguez D. Manual de procedimientos para el diagnóstico y control de la tuberculosis. Secretaría de Salud. 1995.

19. Diaz R., Kremer K., de Haas P., Gomez R., Marrero A., *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-june 1995: utility of spoligotyping versus *IS6110* restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2 (9): 743-50.

20. Divo A. Microbiología Médica. 4a Edición. Interamericana Mc Graw Hill. México 1990. pp 184-93.

21. Dolin P., Ravigione and Kochi. Global tuberculosis incidence and mortality during 1900-2000. *Bull W. H. O.* 1994; 72: 213-20.

22. Edlin B., Tokars J., Grieco M., Grauwford J., Williams J., *et al.* An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med* 1992; 326: 1514-21.

23. Eisenach K., Sifford M., Cave M., Bates J. and Crawford J. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 1160-3.

24. Garza R. Manual de prácticas. Bacteriología, Departamento de Biología. Facultad de Química, UNAM.

25. Goguet Y., Li H., Torrea G., Bunschoten A., van Embden J., *et al.* Evaluation of Spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol* 1997; 35 (9): 2210-4.

26. González S. Torales T. y Gómez B. Tuberculosis. Infectología clínica. 4ª edición. Trillas 1989. pp 105-257.

27. Goyal M., Saunders N., van Embden J., Young D. and Shaw R. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by Spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 1997; 35 (3): 647-51.

28. Goyal M., Shaw R., Banerjee D., Coker R., Robertson B., et al. Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis. Eur Respir J 1997; 10: 1120-4.

29. Groenen P., Bunschoten A., van Soolingen D. and van Embden J. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. Mol Microbiol. 1993; 10 (5): 1057-5.

30. Grosset J., Mouton Y. Is PCR a useful tool for the diagnosis of tuberculosis in 1995?. Tuberc Lung Dis 1995; 76: 183-4.

31. Gómez J., Rigouts L., Villegas L.E. y Portaels F. Análisis de polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) y epidemiología de la tuberculosis. Bol Oficina Sanit Panam 1995; 119 (1): 1-10.

32. Gutiérrez R, y López R. Microbiología y Parasitología Médicas. 2ª edición. Capítulo 29. Editorial Francisco Méndez México 1995.

33. Gutierrez M., Galán J., Blázquez J., Bouvet E. and Vincent V. Molecular markers demonstrate that the first described multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* outbreak was due to *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol 1999; 37 (4): 971-75.

34. Harrison. Principios de Medicina interna. Vol.1, 4ª Edición. McGraw-Hill, 1998. pp. 1149-61.

35. Hayward A. and Watson J. Typing of mycobacteria using spoligotyping. Thorax 1998; 53: Editorials.

36. Hermans P., van Soolingen D., Bik E., de Haas P., Dale J. *et al.* Insertion element *IS978* from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex. Infect Immun 1991; 59 (8): 2695-705.

37. Hermans P., van Soolingen D. and van Embden D. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae*. J Bacteriol 1992; 174 (12): 4157-65.

38. Heyderman R., Goyal M., Roberts P., Ushewokunze S., Zizhou S., *et al.* Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by Spoligotyping. Thorax 1998; 53: 346-50.

39. Hoge C., Fisher L., Donnell H., Rodson D, Tomlison G., Breiman R., *et al.* Risk factors for transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in a primary school outbreak, lack of racial difference in susceptibility to infection. Am J Epidemiol 1994; 139: 520-30.

40. Horgen L., Sola C., Devallois A., Goh K. and Rastogi N. Follow up of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in the French West Indies by *IS6110*-DNA fingerprinting and DR-based Spoligotyping. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1998; 21: 203-12.

41. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of

*Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin Microbiol. 1997; 35 (4): 907-14.

42. Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R., Haas W., Hermans W., *et al.* Comparison of methods bases on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 1999; 37 (8): 2607-18.

43. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercle 1991; 72: 1-6.

44. Kox L., Rhienthong D., Miranda A., Udomsantisuk N., Ellis K., *et al.* A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. J Clinical Microbiol 1994; 32 (3): 672-8.

45. Linton C., Jalal H., Leeming J. and Millar M. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol 1994; 32 (9): 2169-74.

46. Mazurek G., Cave M., Eisenach K., Wallace R., Bates J., *et al.* Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with *IS6110* as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis. J Clin Microbiol 1991; 29 (9): 2030-3.

47. Murray P. Manual of clinical microbiology. Asm Press, Washintong D. C. 1999. pp 399-424.

48. Niemann S., Richter E. and Rüsç-Gerdes S. Stability of *Mycobacterium tuberculosis IS6110* restriction fragment length polymorphism patterns and Spoligotyping determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis 1999; 37 (2): 409-12.

49. Olive D. and Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (6): 1661-9.

50. Olvera R. Tuberculosis: enfermedad del presente o ¿tuberculosis enfermedad del siglo XXI?. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1998; 11 (1): 5-6.

51. Pearsons J., Benjamin D. y Kadner R. *Microbiología Médica*. México 1998. pp 480-490.

52. Persing D. PCR protocols for emerging infectious diseases. American Society for Microbiology. Washington, DC 1996. Chapter 1 and 2.

53. Programa de prevención y control de la tuberculosis. Diciembre de 1999. México.

54. Pro'Hom G., Guilhot C., Gutierrez M.C., Varnerot A., Gicquel B. *et al*. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (12): 3331-4.

55. Quian L., van Embden J., van der Zanden A., Weltevreden E., Duanmu H. *et al*. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (2): 471-4.

56. Ramírez E.. Día Mundial contra la tuberculosis 24 de marzo de 1998. *Revista de Neumología y Cirugía de Tórax* 1998; 57 (1): I-II.

57. Ramos M., Soini H., Roscanni G., Jaques M., Villares M. and Musser J. Extensive cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *J Clin Microbiol*. 1999; 37 (4): 916-9.

58. Saiki R., Walsh P., Levenson C and Erlich. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci. USA 1989. 86: 6230-4.
59. Salomon N., Perlman D., Friedmann P., Buchstein S., Kreiswirth B., *et al.* Predictor and outcome of multidrug-resistant tuberculosis. Clin Infect Dis 1995; 21: 1245-52.
60. Salyers A. and Whitt D. Bacterial Pathogenesis. A molecular approach. Washington, D.C. 1994. pp 307-21.
61. Samper S., Martín C., Pinedo A., Rivero A., Blázquez J., *et al.* Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. AIDS 1997; 11: 1237-42.
62. Santin G. Tuberculosis ¿Cómo yugular su repunte?. Rev Fac Med UNAM 1998, 41 (6): 257.
63. Scharer L. and McAdam M. Tuberculosis and AIDS. Springer Publishing Company. New York 1995. pp. 94, 95, 105-108.
64. Serraino A., Marchetti G., Sanguinetti V., Rossi M., Zanoní R., *et al.* Monitoring of transmission of tuberculosis between wild boars and cattle: genotypical analysis of strains by molecular epidemiology techniques. J Clin Microbiol 1998; 37 (9): 2766-71.
65. Shinnick T. and Good R. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. Clin Infect Dis. 1995; 21: 291-9.
66. Siddiqui S. El manual de procedimientos del sistema BACTEC TB SYSTEM, Becton Dickinson Diagnostic Instr. Systems. Maryland USA 1989.

67. Snustad P., Simmons M., Jekis J. and Sans. Principles of genetics. USA 1997. pp. 490-507.

68. Sola C., Horgen L., Maïsetti J., Devallois A., Goh K., *et al.* Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to *IS6110* fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol* 1998; 36 (4): 1122-4.

69. Sola C., Devallois A., Horgen L., Maïsetti J., Filliol I., *et al.* Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerging Infectious Diseases* 1999; 5 (3): 404-14.

70. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Boletín. 1999; 16 (30). Semana 30, del 25 al 31 de julio.

71. Sudre P., Ten Dam G. and Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bulletin of the World Health Organization*. 1992; 70 (2): 149-59.

72. Talenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Böttger E *et al.* Rapid identification of *Mycobacteria* to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (2): 175-8.

73. The Johns Hopkins University on behalf of its division of infectious diseases. Diseases Tuberculosis- Epidemiology & Natural History. La información se puede consultar en la página Web <http://www.hopkins-id.edu/diseases/tb/tb-epi.html>

74. van Soolingen D., Hermans P., de Hass P., Soll D. and van Embden J. 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* 1991; 29 (11): 2578-6.

75. van Soolingen D., de Haas P.E., Hermans P., Groenen P., van Embden J. D. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (8): 1987-95.

76. van Soolingen D., de Haas P., Haagsma J., Eger T., Hermans P., *et al.* Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (10): 2425-33.

77. van Soolingen D., van der Zanden A., de Haas P., Noordhoek G., Kiers A., *et al.* Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (7): 1840-5.

78. Walker J and Gingalg. *Molecular biology and biotechnology*. 3rd edition. The Royal society of chemistry 1993. Chapter 3.

79. Wilkinson D., Pillay M., Crump J., Lombard C., Davies G., *et al.* Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in rural Africa. *Tropical medicine and international Health*. 1997; 2 (8): 747-53.

80. Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski J. and Tingey S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 1990; 18 (22): 6531-5.

81. Zinsser. *Microbiología*. 18<sup>o</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires 1989.

82. Zumárraga M., Martín C., Samper S., Alito A., Latini O., *et al.* Usefulness of Spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium*

*bovis* related infections in South America. J Clin Microbiol 1999; 37 (2): 296-303.