

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**DIFERENCIAS EN LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE AISLADOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium tuberculosis QUE PUTATIVAMENTE CONFIEREN
VIRULENCIA**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ALUMNA:

ROSA ARELI MARTÍNEZ GAMBOA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO

COMITÉ TUTORAL:

DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO

ASESORES:

DRA. JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE

DR. LUÍS ALFREDO PÓNCE DE LEÓN GARDUÑO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE:

Antecedentes	3
Justificación	19
Hipótesis	20
Objetivo	21
Métodos	22
Resultados	30
Discusión	35
Conclusiones	47
Diagramas y Cuadros	48
Anexos	60
Agradecimientos	71
Referencias	72

ANTECEDENTES

Historia

La tuberculosis es una enfermedad antigua, ya que existen evidencias de tuberculosis espinal en esqueletos del periodo neolítico y en momias egipcias. Por otro lado, algunos médicos en China identificaron pacientes con fiebre, tos y deterioro físico (hallazgos sugerentes de tuberculosis) [1].

La tuberculosis fue reconocida por Hipócrates y la nombró tisis, él mismo realizó una descripción clínica. Posteriormente, Aristóteles y Galeno reconocieron que la tisis (tuberculosis) era una enfermedad contagiosa [2].

La tuberculosis fue responsable de un cuarto de todas las muertes en adultos de Europa durante los siglos XVII y XVIII, muy probablemente a consecuencia de la formación de los primeros grandes centros urbanos, Londres, París, Madrid, etc. Más tarde durante la revolución industrial, la tuberculosis representó un problema grave propiciado por las condiciones de hacinamiento en el que vivían la mayoría de los obreros, ello favoreció con mucho la transmisión y, posiblemente, la progresión acelerada [3].

Agente causal

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El complejo está integrado, hoy en día, por *M. tuberculosis*, *M. bovis* (*M. bovis subsp. bovis*, *M. bovis subsp. caprae* y *M. bovis BCG*), *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti* y *M. pinnipedii*. Estos organismos muestran más del 95% de homología en su DNA [4]. Sin embargo, estudios recientes de genómica comparativa han demostrado que existen diferentes regiones deletadas entre los miembros del complejo lo que resalta las diferencias entre las especies [5, 6].

M. tuberculosis es un bacilo aerobio, no esporulado, inmóvil, de aproximadamente 2 a 5 micras de largo por 0.4 a 0.6 micras de ancho. La pared celular es de constitución especial, conformada por un alto contenido de lípidos complejos que le confiere la característica de resistencia a colorantes, como los utilizados en la

tinción de Gram y Giemsa; por lo que solo pueden ser teñidos con procedimientos como la tinción de Ziehl-Neelsen o Kinyoun [7].

Epidemiología

La incidencia de la tuberculosis disminuyó progresivamente durante las primeras ocho décadas del siglo pasado, alcanzando su menor nivel a inicios de 1980, lo que ocasionó que muchos microbiólogos creyeran que la tuberculosis estaba cerca de ser vencida. Sin embargo, sucedió lo opuesto. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente, la tasa de morbilidad y mortalidad ha aumentado debido a la co-infección con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y a la aparición de cepas con resistencia a múltiples drogas. La OMS estimó que *M. tuberculosis* causó 9.4 millones de casos nuevos de tuberculosis y 1.3 millones de muertes alrededor del mundo en el año 2008. La mayoría de los casos ocurrieron en Asia (55%), y África (30%), y en pequeñas proporciones en la región este del Mediterráneo (7%), Europa (5%) y América (3%). La OMS reportó que el 80% de todos los casos de tuberculosis a nivel mundial en el 2008, se presentaron en tan solo 22 países. Los cinco países que mostraron la mayoría de los casos son: la India (1.6–2.4 millones de casos), China (1.0–1.6 millones de casos), Sudáfrica (0.38–0.57 millones de casos), Nigeria (0.37–0.55 millones de casos) e Indonesia (0.34–0.52 millones de casos). La India y China contribuyeron con el 35% del total de casos. La OMS estimó que 1.2–1.6 millones, del total de casos, ocurrieron en pacientes VIH-positivo. De estos casos VIH-positivo, 78% se presentaron en África y 13% de la región del sureste de Asia. Asimismo, la OMS estimó que 500 000 de los casos de tuberculosis fueron causados por organismos resistentes a múltiples fármacos. Además, reportó que el 85% de todos los casos de tuberculosis con resistencia a múltiples fármacos ocurrieron en tan solo 27 países (15 de la región Europea). Los países que ocuparon los primeros cinco lugares fueron la India (131 000 casos), China (112 000 casos), la Federación Rusa (43 000 casos), el Sur de África (16 000 casos) y Bangladesh (15 000

casos). Para noviembre del 2009, 57 países reportaron la recuperación de al menos un aislado de *M. tuberculosis* extensamente resistente (XDR). Las tasas de incidencia de tuberculosis llegan a ser mayores de 300/100,000 habitantes en algunos países, en el caso de México, se ha estimado que es de 25/100,000 habitantes [8].

Patogenia

La respuesta inmune determina en gran medida el desenlace final de la infección por *M. tuberculosis* ya que participa en la resistencia al patógeno y además de que contribuye en el desarrollo de la enfermedad. La entrada de *M. tuberculosis* al hospedero ocasiona una serie de eventos complejos como parte de los mecanismos de defensa del organismo [9].

Invasión (primera semana)

La infección por *M. tuberculosis* puede iniciar por la ingestión, inoculación o inhalación. Esta última es la vía más común de transmisión, así *M. tuberculosis* se transmite de persona a persona cuando un individuo con tuberculosis pulmonar tose y el material proveniente (microgotas) de la vía respiratoria inferior, es inhalado por otro sujeto. Cuando estas microgotas llegan hasta los alvéolos, los macrófagos locales fagocitan a *M. tuberculosis*. Tres factores principales determinan si la exposición al bacilo resulta en infección: dosis infecciosa, respuesta inmune del hospedero y virulencia de *M. tuberculosis*. Si los macrófagos son capaces de inhibir o matar a la micobacteria, la infección se interrumpe; de no ser así, se inicia la replicación bacteriana.

Replicación bacilar y lesión tuberculosa primaria (2ª y 3ª semana)

Crecimiento bacteriano.- Cuando el macrófago alveolar es incapaz de destruir los bacilos fagocitados, éstos se replican dentro del macrófago hasta que se produce la lisis celular. Los bacilos liberados son fagocitados, por otros macrófagos residentes vecinos, y por macrófagos inmaduros de la circulación que son atraídos al foco de la infección. Sin embargo, éstos son incapaces de destruir o inhibir el

crecimiento del bacilo, lo que da lugar a la multiplicación bacilar y lisis de estos macrófagos.

Lesión tuberculosa primaria y diseminación.- La lisis de los macrófagos infectados, da lugar a la formación de la lesión primaria, la cual consiste principalmente de capas concéntricas de macrófagos inmaduros que contienen micobacterias. Durante el estado de crecimiento no controlado, algunas micobacterias son transportadas al drenaje de los ganglios linfáticos, donde el proceso se repite. La lesión inicial (área de neumonitis y linfangitis) y el ganglio linfático inflamado (adenitis), forman el complejo primario de tuberculosis. Por otro lado, el bacilo también es capaz de diseminarse vía sanguínea, a sitios distantes.

Control de la infección (después de tres semanas)

Después de tres semanas, el crecimiento del bacilo cesa. Esto coincide con el desarrollo de una resistencia inmune adquirida y la formación del característico granuloma tuberculoso. Tradicionalmente el término de inmunidad mediada por células (CMI) y la hipersensibilidad tipo retardada (DTH), se usan para describir dos procesos distintos. La CMI se refiere a los procesos inmunes mediados por células, que resulta en la acumulación de grandes cantidades de macrófagos alrededor del foco tuberculoso caseoso. La DTH se refiere a los procesos inmunes cito tóxicos que matan a los macrófagos inmaduros no activados que permiten la multiplicación intracelular del bacilo. Experimentos en animales han mostrado que al menos en el ratón la inmunidad adquirida a tuberculosis está mediada por dos vías efectoras diferentes. En la primera vía, las células CD4+ se activan por la interacción de sus receptores con los antígenos correspondientes presentados por células especializadas en el contexto de moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad. Las células activadas liberan citocinas como el IFN-gamma que activa macrófagos, los cuales adquieren la capacidad de destruir los bacilos intracelulares. En otro mecanismo, los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* son destruidos por linfocitos T citolíticos CD8+. Los bacilos pueden sobrevivir al interior del macrófago por muchos años, sin embargo, son

incapaces de multiplicarse en el material caseoso del centro del granuloma en formación.

Granuloma caseoso tuberculoso.- El granuloma tuberculoso activado es una acumulación de macrófagos alrededor de una lesión caseosa que previene la futura diseminación. Los bacilos intracelulares secretan componentes, que presumiblemente son importantes como estimulantes primarios de la necrosis caseosa, lo cual involucra varios procesos poco definidos, además de la reacción que se genera por la destrucción de macrófagos inmaduros infectados de la lesión primaria.

Los macrófagos activados que se encuentran en el granuloma son derivados de monocitos de vía sanguínea. El estímulo que atrae a los macrófagos hacia el granuloma tuberculoso aun no se conoce, sin embargo, probablemente incluye quimocinas (CCL-2, CCL3, CCL4) secretadas por los macrófagos alveolares infectados con *M. tuberculosis*. Los granulomas caseosos en el pulmón son microscópicos durante las primeras cuatro a cinco semanas de la infección. En conejos resistentes las lesiones contienen pocos bacilos, algunos linfocitos, muchos macrófagos activados, células gigantes multinucleadas y relativamente poca necrosis, mientras que en las lesiones de conejos susceptibles, se observan muchos bacilos, pocos macrófagos activados y más necrosis.

Reactivación endógena y transmisión (meses o años más tarde)

En la mayoría de las personas infectadas, la respuesta inmune mantiene al bacilo en un estado durmiente (infección latente). La eliminación continua de pequeñas cantidades de antígenos micobacterianos desde el granuloma, presumiblemente mantiene la reactividad a la tuberculina y la inmunidad protectora. Cuando algún evento (infección por VIH, alcoholismo, tratamiento con esteroides, desnutrición, entre otros) altera la respuesta inmune, ocurre la reactivación de las bacterias y en consecuencia de la enfermedad. La disolución tisular, es resultado de la hidrólisis progresiva de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos del tejido caseoso, por enzimas hidrolíticas del hospedero y/o la micobacteria. Presumiblemente, la defensa del hospedero es inapropiada dentro del tejido necrótico disuelto, lo que permite la

multiplicación de *M. tuberculosis*. El producto de la disolución tisular se descarga en un bronquio cercano, formando así una cavidad, la cual juega un papel importante en la transmisión de la enfermedad [9].

Variabilidad epidemiológica y clínica de la tuberculosis

Se ha observado que sólo 30% de los contactos de los pacientes con tuberculosis se infectan y de ellos, 10% llegan a desarrollar enfermedad, la mitad de éstos durante los primeros 2 años y la otra mitad en el curso de su vida [10]. Este fenómeno se ha atribuido a factores socio-demográficos y factores del hospedero, sin embargo, los factores relacionados a la micobacteria también pueden jugar un papel importante.

Entre los factores más importantes para la transmisión de *M. tuberculosis* se encuentra el hacinamiento [11].

Entre los factores más importantes del hospedero para la progresión a tuberculosis activa y variabilidad clínica, se encuentran las condiciones que disminuyen la respuesta inmune. Como ejemplos destacan la infección por VIH, desnutrición, deficiencia de vitamina D, alcoholismo, enfermedad pulmonar ocupacional, diabetes mellitus, enfermedades del tejido conectivo, trasplantes de órganos y el uso de fármacos inmunosupresores [12, 13, 14, 16, 17, 18]. Por otro lado, parece ser que algunos factores del patógeno también juegan un papel importante ya que se ha observado que *M. tuberculosis* presenta variabilidad en su comportamiento [19]. Existen algunas cepas que son más inmunogénicas que otras, como la cepa CDC1551 o muy prevalentes como la cepa C o las cepas de la familia Beijing. La cepa CDC1551 fue aislada de un brote en una comunidad rural con bajo riesgo de tuberculosis. En promedio, 80% de los contactos de pacientes con tuberculosis causada por esta cepa presentaron reactividad a PPD. La virulencia de la cepa CDC1551 en modelo animal es comparable a la H37Rv [20]. Sin embargo, se ha demostrado que presenta mayor inmunogenicidad que la H37Rv y otras cepas clínicas [21]. La cepa C es un organismo susceptible a los fármacos anti-tuberculosis de primera línea, es prevalente en la ciudad de Nueva York, donde fue responsable de un gran brote en Manhattan. En estudios *in vitro*,

se ha demostrado que en el ratón esta cepa es resistente al óxido nítrico, producido por el macrófago como mecanismo de defensa [22]. Las cepas de la familia Beijing pertenecen a un grupo de aislados recuperado de pacientes chinos residentes de la ciudad de Beijing. Estas cepas tienen parentesco genético con la cepa W, que es un microorganismo resistente a múltiples fármacos antituberculosis y fue recuperado de pacientes coinfectados con VIH involucrados en un gran brote nosocomial ocurrido en hospitales de la ciudad de Nueva York entre 1991 y 1994 [23]. Por otro lado, se ha observado que las cepas de esta familia son muy prevalentes (50% a 80%) en la inmensa población del continente asiático [24, 25, 26]. Los aislados de esta familia comparten un patrón de huellas digitales (número elevado [>16] de copias de IS6110) y espoligotipo similar (conocido como S00034) [27].

Así mismo, se ha podido observar variabilidad en el comportamiento de *M. tuberculosis* en experimentos con modelos animales. Las diferencias en la virulencia entre las cepas CDC1551 y Beijing están relacionadas con componentes de su pared celular [28]. Estudios ex-vivo en monocitos y experimentales en ratones han mostrado que las cepas CDC1551 (o sus extractos lipídicos) inducen una fuerte expresión de citocinas pro-inflamatorias [29]. En contraste, las cepas Beijing inducen una expresión pobre de citocinas pro-inflamatorias y un incremento en la producción de citocinas desactivadoras de macrófagos [30, 31]. Otro ejemplo es la diferencia en la respuesta inmune generada por los genotipos Beijing y Canetti en experimentos en modelo murino. La infección por cepas del genotipo Beijing mostró replicación bacteriana acelerada, neumonía masiva y muerte. En tanto que la infección por las cepas Canetti ocasionó enfermedad progresiva lenta, caracterizada por la disminución de la replicación de la bacteria, neumonía limitada, incremento en el número de granulomas y mayor sobrevivencia [32]. Asimismo, en el modelo animal con conejos, se ha demostrado que se requiere una dosis menor de la cepa Erdman que de la H37Rv para producir una lesión visible en 5 semanas [33].

De la misma manera, experimentos en modelo animal con aislados clínicos de *M. tuberculosis*, han mostrado esta variabilidad. Se ha demostrado que aislados

clínicos de *M. tuberculosis* involucrados en cadenas de transmisión reciente, se asocian con un índice de crecimiento intracelular mayor, así como con baja producción de TNF- α y secreción primaria de IL-10, en comparación con aislados clínicos de *M. tuberculosis* únicos. Los autores interpretaron estos hallazgos como que la producción inicial de IL-10 suprime la secreción TNF- α y permite el crecimiento intracelular rápido del organismo, lo que da lugar al fenotipo de crecimiento rápido en células THP-1 y transmisión eficiente entre humanos [34]. En otro estudio, compararon la infectividad y virulencia de cepas co-infectantes, pulmonares y extra pulmonares aisladas del mismo paciente con tuberculosis. Los autores encontraron que las cepas extrapulmonares infectaron monocitos humanos derivados de macrófagos más eficientemente, además de que crecieron más rápidamente en ratones [35]. Nuestro grupo seleccionó ocho aislados, con características clínico/epidemiológicas relevantes, de pacientes con tuberculosis pulmonar de un estudio de base poblacional realizado en la región de Orizaba, Veracruz. Grupo 1. casos de tuberculosis en los cuales más de 20% de los contactos intra-domiciliarios fueron PPD positivos al momento de inclusión al estudio o contactos con PPD negativo que convirtieron durante el seguimiento. Grupo 2. casos de tuberculosis en los cuales sus contactos intra-domiciliarios siempre tuvieron PPD negativo. Grupo 3. casos de corto periodo de latencia. Grupo 4. casos de reactivación. Todos estos aislados fueron probados en el modelo de ratón BALB/c de tuberculosis pulmonar progresiva y en un modelo de transmisibilidad. Identificamos cuatro fenotipos claramente definidos: grupo 1. cepas hipervirulentas con una respuesta inmune no protectora y altamente transmisible; grupo 2. cepas que inducen una inmunidad protectora eficiente con baja virulencia; grupo 3. cepas virulentas asociadas con alta expresión de citocinas pro-inflamatorias (TNF α , e interferon) y muy baja expresión de citocinas anti-inflamatoria (IL-10 e IL-4) las cuales inducen muerte acelerada por inmunopatología; y grupo 4. cepas con una activación primaria y fuerte de macrófagos (inmunidad innata) con un retraso en la participación de la inmunidad adquirida (expresión de interferón) [36].

Estas observaciones clínicas, y experimentales demuestran que *M. tuberculosis* presenta una gran variabilidad en su comportamiento, es decir que algunas características propias de la bacteria se expresan con una gran variabilidad fenotípica durante el curso de la infección y la enfermedad.

Mecanismos de virulencia de *M. tuberculosis*

M. tuberculosis ha desarrollado múltiples mecanismos de adaptación durante la infección de especies superiores que interfieren con el sistema inmune permitiendo la persistencia del organismo. Varios de estos mecanismos, son mediados por componentes de la pared celular de la micobacteria, una estructura compleja que consiste de varios tipos de ácidos grasos de cadena larga, glicolípidos y lipoproteínas [37].

Los lipoarabinomananos (LAM) son los componentes principales de la pared de *M. tuberculosis* y se han demostrado que actúan a diferentes niveles y pueden descomponer los radicales de oxígeno citotóxicos, inhibir la actividad de proteínas cinasas C y bloquear la activación transcripcional de genes regulados por interferón gamma en macrófagos humanos, de ahí que se considere que contribuyen en la persistencia de *M. tuberculosis* en el macrófago [38].

Los dimiocerosatos de ftiocerol (DIM) y diftioceranatos de ftiocerol (DIP) tienen actividades biológicas notables, como la modulación inmunológica. Estos dos compuestos en particular, son producidos sólo por micobacterias de crecimiento lento, las de mayor capacidad patogénica, como *M. leprae*, *M. marinum*, *M. ulcerans* y el complejo *M. tuberculosis*. Además, se ha demostrado que estos compuestos favorecen la entrada de *M. leprae* a las células nerviosas periféricas al unirse a las proteínas de éstas células [39].

M. tuberculosis tiene la capacidad de producir superóxido dismutasa, una enzima que juega un papel importante en la protección contra el estrés oxidativo, generado por el macrófago como mecanismo de defensa del hospedero durante la infección [40].

Comparaciones de los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* y *M. bovis* BCG han mostrado variabilidad en diversas regiones genómicas. Una de ellas es

la RD1 (9.5kb), la cual está ausente en todas las cepas de *M. bovis* BCG. Entre los genes perdidos, están los Rv3874 y Rv3875, que codifican para proteínas CFP-10 y ESAT-6 respectivamente. Se ha sugerido que la pérdida de RD1 es la responsable de la atenuación de *M. bovis* [41]. Mutantes específicas en el Rv3874 y Rv3875 de *M. bovis* virulenta y *M. tuberculosis*, causan la pérdida del fenotipo citolítico de neumocitos y macrófagos; así como atenuación de la virulencia en ratón [42]. Recientemente, se ha demostrado que ESAT-6, CFP-10 y su complejo de proteínas, modulan las vías de señalización en el macrófago, ya que pueden inhibir la vía de expresión de genes dependientes de NF-kappa β [43].

Otra de las proteínas relacionadas con la virulencia de muchas bacterias, incluyendo *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, son las fosfolipasas C (PLC) [44]. Recientemente, se demostró que los cuatro genes *plc* presentes en el genoma de *M. tuberculosis* son funcionales y que todos están involucrados en la actividad de PLC. Mutantes triples de *plcABC* y cuádruples *plcABCD* atenúan el crecimiento de *M. tuberculosis* en pulmón y bazo de ratón [45]. En un estudio reciente, los investigadores reportaron que las cuatro fosfolipasas de *M. tuberculosis* muestran efecto citotóxico en macrófagos, y esta citotoxicidad correlacionó con la degradación enzimática de los fosfolípidos de la membrana a diacilglicerol (DAG). Estos hallazgos sugieren que las fosfolipasa pueden jugar un papel importante en la virulencia de *M. tuberculosis* [46].

En la mayoría de las bacterias el hierro es esencial como un cofactor de enzimas involucradas en funciones vitales para las células. Las bacterias cuentan con una serie de mecanismos que le permiten establecer un balance en las concentraciones de hierro. Por un lado, tienen la capacidad de generar sideróforos que le permiten reclutar la mayor cantidad posible de hierro en condiciones donde existe limitación del mismo; por otro lado, tienen la capacidad de almacenar el hierro cuando se encuentran en altas concentraciones de éste, además, de protegerse contra los daños de los reactivos oxidativos producto del exceso de hierro. Se ha observado que el gen *mbtB*, requerido para la biosíntesis de sideróforos, se induce en condiciones de concentraciones bajas de hierro, en el macrófago y en el ratón durante la infección experimental. Por otro lado, ideR

(regulador dependiente de hierro) es necesario para una respuesta eficiente contra el estrés oxidativo, por lo que es muy probable que este regulador también sea muy importante para la resistencia de *M. tuberculosis* a los mecanismos oxidativos implementados por el macrófago durante el curso de la infección [47]. En el genoma de *M. tuberculosis* existe un grupo de genes que incluye del Rv1344 al Rv1349. Éstos, codifican para proteínas de función no conocida, sin embargo, recientes estudios sugieren que estas proteínas participan en la síntesis de sideróforos. El Rv1348 y Rv1349 (*irtA* e *irtB* respectivamente), codifican para un probable sistema de transporte ABC, el cual es similar al sistema YbtPQ involucrado en el transporte de hierro en *Yersinia pestis*. La inactivación de los genes *irtA* e *irtB*, disminuye la capacidad de *M. tuberculosis* para sobrevivir en condiciones de deficiencia de hierro. IrtA e IrtB son requeridos para la replicación de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos y en el pulmón de ratón [48].

Mutantes en PhoPR (sistema de transducción de señales de dos componentes) de *M. tuberculosis* se han vinculado con una atenuación del crecimiento bacteriano en macrófagos y ratones. Asimismo, se ha observado que estas mutantes muestran una disminución en la expresión de 44 genes, de los cuales, más de la mitad codifican para proteínas involucradas en el metabolismo y secreción, así como, para componentes de la pared celular. Entre los genes que regula PhoP se encuentran los que integran el conglomerado de genes *pks2* y *msl3* que codifican para enzimas requeridas para la biosíntesis de sulfatides y diaciltrealosa y poliaciltrealosa respectivamente [49].

Por otro lado, *M. tuberculosis* tiene la capacidad de permanecer durmiente dentro de las células del hospedero por muchos años, al mismo tiempo retiene el potencial para activarse. La persistencia de *M. tuberculosis* en ratones se ve facilitada por una isocitrato liasa, una enzima que es esencial para el metabolismo de ácidos grasos. La ruptura del gen *icl* (responsable de codificar para la enzima isocitrato liasa) disminuye la persistencia bacteriana y virulencia en modelo de ratón. La expresión del gen *icl* de *M. tuberculosis* se incrementa en macrófagos infectados y activados [50].

En el genoma de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se han identificado 13 factores sigma (*sigA*, *sigB*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigF*, *sigG*, *sigH*, *sigI*, *sigJ*, *sigK*, *sigL* y *sigM*) [51] de los cuales tres (*sigB*, *sigE*, *sigF*) se han señalado con capacidad de respuesta ante cambios ambientales. La transcripción de *sigB* se incrementa en respuesta a la disminución de la tensión de oxígeno; la transcripción de *sigE* se incrementa en condiciones de choque térmico y baja oxigenación; y la transcripción de *sigF*, que solo se encuentra en micobacterias patógenas de crecimiento lento, se incrementa después de la fagocitosis, en concentraciones bajas de nutrientes y en respuesta al tratamiento con antibióticos[52]. Por otro lado, recientemente se caracterizó el gen Rv3133 (*dosR*), cuyo producto activa la transcripción de genes en respuesta a la reducción de oxígeno y juega un papel importante en la supervivencia de *M. tuberculosis* en un ambiente hipóxico [53].

Estos antecedentes nos muestran que *M. tuberculosis* cuenta con una serie de elementos que le ayudan a evadir los mecanismos de defensa del hospedero. El estudio de las variables clínicas y su correlación con la expresión fenotípica y genotípica pudieran ser claves en el mejor entendimiento de la relación entre la bacteria y el hospedero. Sin duda, el conocimiento de los eventos que rigen esta interacción, debe permitir un mejor abordaje en el control y prevención de la tuberculosis.

Genoma de *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis H37Rv posee un cromosoma circular, compuesto por 4'411,532 nucleótidos, los cuales comprenden 4048 genes. El cromosoma consiste de una secuencia rica en GC (65%). Tiene 16 copias de la secuencia de inserción 6110, 6 copias de la IS1081 y dos fagos (*phiRv1* y *phiRv2*). Cuenta con dos grupos de proteínas (PE y PPE) las cuales comprenden aproximadamente el 10% de la capacidad codificante del cromosoma. Tiene 13 factores sigma y se predicen más de 100 proteínas reguladoras. Posee más de 250 enzimas distintas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos a diferencia de *E. coli* que tiene solo alrededor de 50 enzimas. Solo se conoce con detalle la función de las proteínas codificadas por el 40% de los genes; en tanto que de las proteínas codificadas por otro 44%

de los genes, solo se cuenta con información de similitud con proteínas de otros microorganismos, y las características de las proteínas codificadas por el 16% de los genes restantes son desconocidas [51].

Variabilidad en la secuencia nucleotídica. Se sabe que el complejo *M. tuberculosis* presenta escasa variabilidad a nivel nucleotídico. El análisis de 26 genes estructurales (*katG*, *rpoB*, *gyrA*, *mabA*, *mdh*, *embA*, entre otros) en un grupo 842 aislados de (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*) recuperados de diversas localidades geográficas, reveló sólo 32 nucleótidos polimórficos (SNPs) no relacionados con resistencia a antibióticos [54]. También el análisis de 16 cepas no relacionadas, demostró pobre polimorfismo en la secuencia nucleotídica de 24 genes que codifican para proteínas consideradas blanco del sistema inmune (proteínas de la familia PE y PPE, ESAT-6, CFP10, CFP17, CFP25, Ag85, entre otros) [55]. Algunos investigadores explican este fenómeno, por el número bajo de SNPs en el genoma de *M. tuberculosis* como una evidencia de que este género es relativamente joven (15,000 a 20,000 años) en la naturaleza y por su asociación con la infección solo en animales de sangre caliente [56].

Variabilidad por elementos repetitivos. En contraste con la pobre variabilidad generada por SNPs, se ha demostrado que el complejo *M. tuberculosis* presenta una mayor variabilidad en su genoma por la presencia de ciertos elementos repetitivos(propios del genoma). Entre los más estudiados están: la secuencia de inserción IS6110, el locus DR (direct repeat) y las secuencias ricas en guanina-citocina. Estos elementos se han usado como marcadores en epidemiología molecular para trazar líneas de transmisión de tuberculosis.

La secuencia de inserción IS6110 es un elemento móvil característico de la familia IS3, se encuentra en número (1-20 copias)y localización variable dentro del genoma [57, 58]. Esta variabilidad permite distinguir, con base en el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP),entre los aislados genéticamente relacionados (patrones de RFLP similares) y los no relacionados (patrón de RFLP diferente) [59]. De modo que el RFLP basado en IS6110 es hoy

día la metodología internacionalmente aceptada como herramienta de apoyo epidemiológico en el estudio de la transmisión de la tuberculosis de manera más precisa [60].

Otro elemento que genera variabilidad es el locus cromosomal DR, el cual está formado por un número variable de secuencias cortas repetitivas (36 pb), estas secuencias están separadas por otras no repetitivas que varían en tamaño (35-41 pb) y número [61]. La variabilidad observada en este locus ha permitido su empleo como marcador secundario para tipificación de aislados clínicos de *M. tuberculosis* con un número menor de 6 copias de IS6110, esto porque se ha descrito que en los aislados con esta característica el RFLP no permite una buena discriminación [62]. La variabilidad generada en este locus ha permitido el desarrollo de la espoligotipificación como método de tipificación de *M. tuberculosis* al detectar la presencia o ausencia de los espaciadores (secuencias no repetitivas) en la región DR del genoma.

M. tuberculosis contiene secuencias repetitivas ricas en guanina - citocina (PGRS), las cuales son las más abundantes en su genoma. Estas secuencias pertenecen a la familia de multi-genes llamados Pro-Glu. Se usan como marcadores secundarios de tipificación molecular de tuberculosis para confirmar conglomerados de aislados de *M. tuberculosis* con número bajo de copias de IS6110 [63].

Polimorfismo generado por grandes secuencias polimórficas (LSPs). Después de la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* por Cole y col. [51] se ha reconocido el polimorfismo generado por pérdida de secuencias grandes del DNA. Así, se sabe que existe variabilidad generada por la pérdida de estas secuencias grandes de DNA entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* y las diferentes *M. bovis*-BCG utilizadas como vacuna en todo el mundo [64]. Ello seguramente influye en la eficacia de la vacuna BCG como ha sido observado por nuestro grupo [65].

Kato-Maeda y colaboradores analizaron el genoma de 19 aislados clínicos de *M. tuberculosis* clínica y epidemiológicamente bien caracterizados y detectaron 25 secuencias deletadas (76,839 pb) que constituyen el 1.7% del genoma de H37Rv.

Observaron que a mayor número de deleciones la probabilidad de asociación con cavitación pulmonar es más baja, sugiriendo que la acumulación de deleciones tiende a disminuir su patogenicidad [66]. Tsolaki y cols. sugieren que aún cuando la mayoría de las deleciones parecen ser deletéreas para el patógeno, las deleciones tienen un amplio rango de efectos, y algunas pueden asociarse con incremento en la probabilidad de transmisión, ya que pueden ofrecer ventajas como escape del sistema inmune del hospedero [67]. Adicionalmente, el análisis genómico de 875 cepas, de 80 países, en busca de LSPs ha demostrado la existencia de seis linajes de *M. tuberculosis* (incluyendo dos que tradicionalmente son reportados como *M. africanum*) que se han adaptado en regiones geográficas específicas [68].

- Linaje del este de Asia (que incluye a las cepas de la familia Beijing) [69].
- Linaje Indo-Oceánico (que incluye la familia Manila) [70].
- Linaje del este Indo-Africano [68].
- Linaje Euro-Americano (que incluye a las cepas que se describen generalmente como el grupo genético principal 2 y 3) [71].
- Linaje 1 y 2 del oeste de África (que incluye las cepas de *M. africanum*) [72].

Polimorfismo del gen *pks15/1*. El gen *pks15/1* está constituido de 1491 nucleótidos y codifica para una proteína de 496 aminoácidos, caracterizada como una de las policétidosintetasas (Pks 15/1) de *M. tuberculosis* [73]. Esta enzima es requerida en la vía metabólica para la producción de fenol glicolípidos (PGL). Se ha demostrado que existen cepas que no producen PGL y se ha encontrado que este fenotipo se asocia a una deleción de 7 pares de bases en el gen *pks15/1*. Esta deleción ocasiona un desplazamiento del marco de lectura abierta, que genera un codón de paro, lo cual detiene la traducción y la producción de la enzima Pks15/1. Esta enzima es necesaria para la formación de los compuestos lipídicos necesarios como precursores de los PGL. Estos mismos autores describieron una deleción de 6 pares de bases en cepas de *M. bovis*, que si producen una variedad de PGL, lo que sugiere que la ausencia del codón de paro genera una enzima

funcional, a pesar de presentar dos aminoácidos menos. Con base a estos hallazgos, Marmiesse y colaboradores [71] realizaron un estudio filogenético en el que combinaron macro-arreglos y bases de datos bio-informáticos y sugieren que las deleciones de esta región del gen *pks5/1*, ocurrieron en dos ramas distintas del árbol filogenético del complejo *M. tuberculosis*. La deleción de 7 pares de bases, que impide la traducción del gen *pks15/1*, ocurrió en cepas “modernas” de *M. tuberculosis*. La deleción de 6 pares de bases ocurrió en la línea de *M. africanum-M. bovis*, que conserva la capacidad de producir PGL; finalmente el gen *pks15/1* silvestre se encuentra en cepas derivadas de los ancestros más antiguos de este grupo de microorganismos, que han originado a la actual familia W/Beijing.

Recientemente, el polimorfismo observado en el gen *pks15/1* ha llamado la atención, ya que se ha demostrado que los PGL tienen actividades biológicas in vitro que pueden estar relacionadas con la patogénesis de *M. tuberculosis*: inhiben la proliferación de linfocitos T y modulan la producción de citocinas. Existe una correlación inversa entre la producción de PGL y el nivel de secreción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-12). Además, es posible que pueda alterar los procesos necesarios para la destrucción de la bacteria en el interior del macrófago, disminuyendo la producción de radicales libres de oxígeno y de óxido nítrico [74, 75, 76].

Técnicas de tipificación molecular de *Mycobacterium tuberculosis* RFLP y espoligotipo

Desde la introducción del espigotipo como una de las herramientas de tipificación molecular más usadas para *M. tuberculosis* en 1997 [77, 78]. El espigotipo agrega poder discriminatorio al RFLP basado en IS6110, estándar de oro actual para estudios epidemiológicos de tuberculosis [60]. El espigotipo frecuentemente se usa como una herramienta de genotipificación complementaria, ya que esta combinación es especialmente útil para clasificar aquellas cepas con un número bajo (menos de 6) de bandas de IS6110.

Determinación del linaje mediante el análisis, por PCR, de grandes secuencias polimórficas

Después del conocimiento de la secuencia nucleotídica del genoma de *M. tuberculosis*, se han generado diversas técnicas moleculares que han permitido determinar que *M. tuberculosis* presenta polimorfismos generados por pérdida de grandes secuencias de DNA. Estas grandes secuencias polimórficas son eventos únicos que se pueden usar para definir y subdividir a las cepas de *M. tuberculosis*. Por ejemplo, recientemente, Tsolaki y col. describieron que todas las cepas de *M. tuberculosis* de la familia Beijing que analizaron, no contaban con la RD105, y que por lo tanto, esta delección sirve como marcador para la identificación de cepas de esta familia [69]. Por otro lado, Gagneux y col. identificaron 19 LSPs linaje específicas, entre ellas se encuentra la RD239 la cual fue característica de cepas del linaje Indo-Oceánico, por lo que esta delección puede ser utilizada para definir las cepas de este linaje [68].

Deligotipificación

La deligotipificación es una técnica basada en la exploración simultánea de 43 regiones genómicas de *M. tuberculosis* con PCR/hibridación en un número relativamente grande de cepas en una membrana de nylon en un solo experimento. Estas 43 regiones son interrogadas mediante 10 sondas diseñadas en estudios previos, 29 sondas diseñadas a partir del estudio de 100 cepas con microarreglos y cuatro más diseñadas para monitorizar regiones con propiedades especiales (dos fagos de H37Rv y dos regiones implicadas en transferencia horizontal) [79].

Microarreglos

Los microarreglos son una tecnología que ha permitido, en múltiples microorganismos, determinar el polimorfismo genético, conocer la interacción hospedero-patógeno [80], entender la evolución de microorganismos [64], estudiar los mecanismos de acción de medicamentos, identificar probables genes de virulencia [81] y conocer la función de genes no caracterizados.

El microarreglo de DNA de *M. tuberculosis* consiste en productos de PCR que representan cada uno de los 3924 genes descritos en la cepa H37Rv [51], los cuales se han inmovilizado en una laminilla de vidrio. El experimento consiste en marcar el DNA problema con fluorocromo Cy3 (verde) y el DNA control con Cy5 (rojo). Estos DNAs se exponen para una hibridación competitiva sobre el microarreglo. En caso de que el gen esté presente en el DNA problema, la señal será la combinación de ambos marcadores fluorescentes (amarillo), mientras que si el gen está ausente en el DNA problema, la señal será únicamente la del fluorocromo Cy5 (rojo).

JUSTIFICACIÓN

A pesar de los esfuerzos globales para combatir la tuberculosis, la enfermedad continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial. Después de más de un siglo de haberse descrito que *M. tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis, los factores que regulan el desarrollo de la enfermedad aún son complejos e incompletamente entendidos.

Se conoce que existe una considerable variabilidad clínica y epidemiológica en el desenlace de la infección por *M. tuberculosis*; esta variabilidad generalmente se ha atribuido a factores ambientales y del hospedero. Actualmente, se ha descrito que existen diferentes genotipos de *M. tuberculosis*, y recientes avances en genotipificación nos permite realizar un análisis más detallado de la contribución de los factores bacterianos en la variabilidad de los índices de transmisión y progresión a enfermedad.

Si logramos identificar los eventos genéticos que confieren aumento en la virulencia, podríamos entender mejor el proceso biológico de la infección por *M. tuberculosis* y, eventualmente, orientar mejor las medidas para la prevención y el control de la tuberculosis.

HIPÓTESIS ALTERNA

Las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes previamente vacunados con BCG y que participan en cadenas de transmisión reciente tienen diferencias genómicas asociadas a su comportamiento biológico.

HIPÓTESIS NULA

Las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes previamente vacunados con BCG y que participan en cadenas de transmisión reciente no tienen diferencias genómicas asociadas a su comportamiento biológico.

OBJETIVO

Determinar las diferencias genómicas entre las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes, previamente vacunados o no vacunados con BCG y con o sin participación en cadenas de transmisión reciente (conglomerados), para dilucidar la asociación de estas diferencias con el comportamiento biológico.

MÉTODOS

Este estudio es parte de un proyecto de investigación de vigilancia de resistencia a los antibióticos de primera línea realizado en la Jurisdicción Sanitaria No.1 de Huauchinango Puebla, México, realizado entre junio de 1995 y diciembre de 2002, se encontró que la frecuencia de resistencia primaria a isoniacida fue de 12%, a rifampicina de 4% y resistencia a múltiples drogas de 2.5% [82]. Los pacientes incluidos en este estudio fueron diagnosticados de julio de 1998 a diciembre de 2002.

Huauchinango es una de las 10 jurisdicciones sanitarias del estado de Puebla, está formada por 18 municipios con una extensión territorial de 3019 km² y tiene 390,596 habitantes. Según el censo general de población de 1990, la población rural estimada para 1995 fue 68% y la urbana de 32%. El 65% de la población es letrada, sin embargo, solo el 8% terminó la primaria; 2% habla sólo la lengua indígena y 23% la lengua indígena y español. Una cuarta parte de las viviendas está construida con material de cemento y el resto con lámina de cartón, materiales de desecho y piso de tierra; 40% tienen agua entubada, 35% drenaje, y 67% energía eléctrica; y viven 5 personas en promedio por casa. Del total de individuos económicamente activos, 59% se encuentran desempleados, 15% trabajan en el sector primario (agricultura, ganadería, silvicultura, caza y pesca), 11% en el secundario (minería, petróleo, gas, energía eléctrica y construcción), y 15% en el terciario (comercio y servicios) (INEGI) [83]. Solamente el 17% de la población es derecho-habiente de algún sistema de salud de seguridad social, y 85% viven en la zona urbana. La infraestructura para atender al resto de la población consiste de dos hospitales de segundo nivel, 43 unidades médico-rurales IMSS-Solidaridad, 19 centros de salud, tres unidades móviles y 110 casas de salud.

Criterios de inclusión

Se incluyeron individuos con tos durante dos o más semanas de evolución que acudieron a los centros de salud y que dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio, entre julio de 1998 y diciembre de 2002.

Todos los casos diagnosticados fueron referidos al Programa Nacional para el Control de Tuberculosis para que recibieran el tratamiento correspondiente según la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Investigación Biomédica en Humanos del INCMNSZ.

Grupos de estudio

1. Aislados de pacientes vacunados con BCG y que están involucrados en cadenas de transmisión reciente.
2. Aislados de pacientes vacunados con BCG y que se encuentran como aislados únicos.
3. Aislados de pacientes que no fueron vacunados con BCG y que están involucrados en cadenas de transmisión reciente.
4. Aislados de pacientes que no fueron vacunados con BCG y que se encuentran como aislados únicos.

Datos clínicos-epidemiológicos

A todos los pacientes se les aplicó un cuestionario estandarizado para obtener información sobre datos demográficos, epidemiológicos, antecedente de vacunación con BCG, tuberculosis previa, otras enfermedades y el cuadro clínico actual.

Se realizó el estudio de contactos intradomiciliarios. A los contactos se les aplicó la prueba de la tuberculina, que consistió en aplicar 0.1 mL (5 unidades) del derivado proteico purificado estándar (PPD) (Aventis Pasteur Limited, Toronto, Ontario, Canadá). La interpretación se realizó con la lectura de la induración a las 72 horas después de su aplicación. Los contactos con PPD positivo (> 10 mm de induración) [84], fueron evaluados clínicamente y clasificados como infectados o se les realizó baciloscopia y cultivo para descartar tuberculosis activa. Por otro lado, los contactos con PPD negativo fueron vigilados con la aplicación del PPD cada seis meses durante dos años en busca de sintomatología clínica de tuberculosis.

Microbiología y biología molecular

Estudio microbiológico: se solicitaron tres muestras de expectoración, a las cuales se les dio un identificador numérico para mantener el estudio en ciego. Se les realizó baciloscopia y cultivo. Las muestras fueron digeridas y descontaminadas por el método de N-acetil cisteína-hidróxido de sodio [85] e inoculadas en medios de Löwentein-Jensen y en medio MGIT (Becton Dickinson, Cockesville, Maryland, EUA) según las instrucciones del fabricante. Los cultivos positivos fueron identificados como *M. tuberculosis* por procedimientos bioquímicos convencionales, y/o con sonda de DNA (Accuprobe GEN-PROBE, San Diego, California, EUA) según las instrucciones del fabricante. Las pruebas de susceptibilidad a isoniacida, rifampicina, etambutol y estreptomycin se realizaron mediante el método radiométrico BACTEC 12B (Becton-Dickinson, Cockesville, Maryland, EUA) [86].

Aislamiento de DNA: a todos los aislados de *M. tuberculosis* se les extrajo el DNA, como se describe a continuación en forma breve: se transfirieron dos asadas del cultivo masivo de micobacterias a un tubo de micro centrifuga con un volumen de 400 μ L de TE 10-1mM. Esta suspensión se calentó a 80°C por 20 min. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de lisozima (10 mg/mL) y los tubos se incubaron a 37°C por toda la noche.

Al día siguiente, se agregó un volumen de 75 μ L de una solución de SDS 10%/proteinasas K y se incubaron a 65°C por 10 min. Después, se agregó un volumen de 100 μ L de NaCl 5M y 100 μ L de CTAB/NaCl, los tubos se agitaron hasta obtener una suspensión homogénea de aspecto lechoso y se incubaron a 65°C, durante 10 minutos; posteriormente, se agregó un volumen de 750 μ L de cloroformo-alcohol isoamilico a cada tubo y se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min. Se obtuvo la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio, y se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA, se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos y se desechó el isopropanol, finalmente se lavó el DNA con etanol al 70% y se resuspendió en 30 μ L de agua.

El análisis molecular se realizó con los siguientes métodos:

1. Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP): a todos los aislados de *M. tuberculosis* se realizó RFLP por el método estándar internacional [57]. En breve, el DNA fue digerido con 10 U de la enzima de *PvuII* (Boehringer Mannheim, México, DF, México), la cual reconoce un sitio para corte dentro de IS6110, por 1hr a 37°C. En cada proceso de digestión se incluyó la cepa de referencia H37Rv como control.

El DNA digerido, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (Gibco® BRL, Grand Island, N.Y, EUA) por 14 hr. En todos los ensayos se incluyó una mezcla de marcadores de peso molecular, lambda-*HindIII* (Gibco® BRL, Grand Island, NY, EUA) y PhiX 174-*HaeIII* (Invitrogen lifeTechnologies, Carisbad, CA, EUA) y la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv.

El gel se trató con bromuro de etidio para tomar la fotografía, posteriormente se expuso 5 min. a la luz ultravioleta. Se trató en agitación con HCl al 0.25N por 15 minutos, después con NaOH 0.4M por 20 minutos dos ocasiones. El DNA se transfirió a una membrana de Nylon (Amersham Life Science, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) con el uso del equipo “vacuum blotter” (Bio Rad Hércules, CA, EUA) con NaOH 0.4 M durante 45 min. La membrana se lavó con SSC 5 X por 5 min.

Se realizó la hibridación con la sonda, correspondiente a la secuencia de inserción IS6110, marcada con peroxidasa (equipo ECL RPN 3000. Amersham LIFE Science, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) a 42°C durante toda la noche. Se reveló con los reactivos 1 y 2 del equipo ECL RPN 3000 y se expuso con una película Hyperfilm (Amersham life Science, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) por 2 y 5 min.

El patrón de RFLP se analizó y comparó en el programa de cómputo BiImage (Ann Arbor, MI). Se determinó el RFLP en todos los aislados recuperados durante el estudio (187 aislados).

Se definió el número de aislados únicos y aquellos involucrados en conglomerados. Se analizó la información epidemiológica de cada uno de los

pacientes con aislados involucrados en conglomerados para investigar posibles cadenas de transmisión reciente de tuberculosis.

Definiciones:

1.1. Conglomerado. Se definió como conglomerado al grupo de aislados con seis o más bandas de IS6110 y un patrón de RFLP idéntico entre sí; los aislados con un perfil idéntico pero con menos de seis bandas de IS6110 fueron tipificados con un segundo método denominado espoligotipificación, descrito más adelante. Si el espoligotipo resultaba idéntico, estos organismos fueron considerados como partícipes de un conglomerado. En estos pacientes asumimos que la tuberculosis fue consecuencia de transmisión reciente de *M. tuberculosis* con progresión rápida a enfermedad.

1.2. Aislados únicos, se definió a los aislados con seis o más bandas de IS6110 y un patrón de RFLP único, o los aislados con menos de 6 bandas de IS6110 con RFLP y/o espoligotipo únicos. En estos pacientes asumimos que la tuberculosis fue consecuencia de reactivación endógena de una infección adquirida en el pasado.

2. Espoligotipificación (tipificación secundaria): la espoligotipificación se realizó en: A) todos los aislados con menos de 6 bandas de IS6110 y B) 36 aislados con 6 ó más bandas de IS6110, 32 aislados componentes de 13 conglomerados (9 sin relación cercana y 4 intrafamiliares), y 4 aislados más con perfil de RFLP único.

Esta tipificación consistió en determinar el polimorfismo que existe en el locus DR del genoma de *M. tuberculosis* [77]. En breve, se realizó la amplificación de los espaciadores de las regiones DR, mediante PCR en tubos PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (Amersham life Science, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) con 20 pmol de los oligonucleótidos Dra 5-ggttttgggtctgacgac-3 (marcado con biotina) y DRb 5-ccgagaggggacggaac-3. Las condiciones de amplificación fueron: 96°C por 3 min, seguido por 30 ciclos a 96°C por 1min, 55°C, 1min, 72°C por 30 s, y un ciclo final de 72°C por 5 min. Los productos de PCR se desnaturalizaron a 94°C por 10 min. Se realizó hibridación reversa, en una membrana de nylon

(Isogen Life Science B.V. Maarsssen, The Netherlands) que tiene unidos en forma ordenada, cada uno de los oligonucleótidos que representan los espaciadores de la región DR, a 55°C una hora. La membrana se lavó con una solución 2X SSPE/0.5% SDS dos veces por 20 minutos a 55°C. Se agregaron 3.75 unidades del conjugado de estreptoavidina peroxidasa a la membrana y se incubó a 42°C por una hora. El revelado se realizó con 10 mL de cada una de las soluciones 1 y 2 del equipo ECL RPN 3000 (Amersham LIFE Science, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). Posteriormente, la membrana se expuso a una película Hyperfilm (Amersham LIFE Science, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) durante 5 min. Finalmente, la lectura de los patrones de espigotipificación se analizó visualmente y se anotó el código octagonal. En cada experimento se incluyeron como controles positivos las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG P3, y agua como control negativo.

3. Amplificación y secuenciación del gen *pks15/1*: se realizó amplificación y secuenciación de un fragmento de 383 pb de la zona variable previamente descrita del gen *pks15/1* [74] mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los siguientes grupos: A) aislados con menos de 6 bandas de IS6110, 8 aislados, uno por cada conglomerado sin relación cercana, los dos aislados componentes del conglomerado intrafamiliar, así, como 4 aislados únicos, B) Integrado por aislados con 6 ó más bandas de IS6110, 32 aislados componentes de los 13 conglomerados, 4 aislados con RFLP único.

La amplificación se realizó según las siguientes condiciones: para un volumen final de 25 µL se usó una mezcla de deoxiribonucleótidos trifosfatados –dNTPs– (Gibco® BRL, Grand Island, N.Y, EUA) 100 mM; MgCl₂ 2 mM; *Taq* polimerasa 1U (Gibco® BRL, Grand Island, N.Y, EUA), 10 pmol de los oligonucleótidos PGL F ggtcctcctttgggatcag y PGL R ctgcccaggaaacacgac y 10 ng de DNA. El programa consistió de un ciclo a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos con las siguientes temperaturas: 95°C por 45 segundos; 60°C por 45 segundos; 72°C por 45 segundos y un ciclo final a 72°C por 8 minutos. Se usaron como controles, las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y CDC1551 para la delección de 7 pares de bases

descrita, mientras que para la delección de 6 pares de bases se usó la cepa de *M. bovis*, y para el gen íntegro, se usaron las cepas del grupo W/Beijing con el gen silvestre, además de un control negativo de reactivos. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8% (Gibco® BRL, Grand Island, N.Y, EUA). Para la secuenciación de los productos amplificados, el DNA se purificó con un equipo comercial (Qiaquick® DNA Gel Extraction Kit, Quiagen, Stanford, California EUA). La amplificación de los productos se hizo con un equipo comercial (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied BioSystems, Perkin Elmer, Foster City, California, EUA) y se secuenciaron en un secuenciador automatizado Applied BioSystems 3100® (Perkin Elmer) según las instrucciones del fabricante.

4. Determinación del linaje mediante el análisis, por PCR, de grandes secuencias polimórficas: se determinó el linaje [68] de los organismos con *pks15/1* íntegro, conglomerado 4 (familia Manila) y conglomerado 5 (familia Beijing). Brevemente, se usó una PCR multiplex tiempo real (Stratagene Mx 3000P, La Jolla, California, EUA) para determinar la presencia o ausencia de la delección RD105 (característica del linaje del este de Asia) y de la delección RD239 (característica del linaje Indo-Oceánico). Se usaron los siguientes iniciadores y sondas: RD105-F 5'-aacgaactgcgactgaactc-3'; RD105-R 5'-tcccgcaccggttgag-3'; RD105-sonda, 5'-FAM-agagtggacagtttcg-MGBNFQ-3'; RD239-F' 5'-cgagctcaatccgaacgaaa-3'; RD239-R, 5'-ccgggcttggttactg-3'; RD239-sonda, 5'-VIC® -ccaggtgcttgccatg-MGBNFQ-3'. Las muestras sin incremento en la fluorescencia de FAM o VIC® se consideraron como deletadas para la región de interés correspondiente. Como controles se incluyó una cepa del Linaje del este de Asia y una cepa del Linaje Indo-Oceánico.

5. Deligotipificación: se realizó deligotipificación con el propósito de determinar el patrón de delecciones posiblemente asociadas con el comportamiento biológico de los organismos seleccionados. Se llevó a cabo una amplificación por PCR, para lo cual se usaron 10 ng del DNA problema. El volumen de reacción final fue de 50 µl

que contenía 1.5 mM de MgCl₂, 250 μM de dNTPs y 5 pmol de cada uno de los 43 pares de oligonucleótidos. Un oligonucleótido de cada par estaba marcado con biotina en el final 5'. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C por 5 minutos, 25 ciclos de 95°C por 1 minuto; 55°C por 1 minuto; 72°C por 30 segundos y un ciclo final a 72°C por 5 minutos [79].

El producto de la PCR multiplex se hibridó con las 43 sondas (que representan las secuencias polimórficas) que se encontraban covalentemente unidas a una membrana de nylon (Biotrans; ICN) en líneas paralelas. A 20 μl del producto de PCR se le agregó 150 μL de 2X SSPE /0.1% SDS y se desnaturalizó a 95°C por 10 min. 135 μl de esta suspensión, se usó para la hibridación a 60°C durante 60 min. La membrana se lavó dos veces con 250 mL de 2X SSPE-0.5% SDS por 13 minutos a 60°C. Los fragmentos unidos se revelaron por quimioluminiscencia después de la incubación a 42°C con el conjugado de estreptoavidina peroxidasa (Boehringer Mannheim) por 60 minutos. La membrana se lavó por 10 min. con 250 mL de 2XSSPE/0.5 SDS a 42°C.

La membrana se expuso por 2 minutos con 10 ml del reactivo 1 y 10 mL del reactivo 2 del equipo ECL RPN 3000 (Amersham LIFE Science, Little Chalfont Buckinghamshire, UK), y posteriormente se expuso por 5 min. a una película Hyperfilm (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire UK). En cada experimento se incluyeron las cepas H37Rv y CDC1551 como controles. Los patrones fueron analizados visualmente[79].

Para este ensayo se incluyeron los siguientes grupos: A) en aislados con menos de 6 bandas de IS6110, 8 aislados, uno por cada conglomerado sin relación cercana, los dos aislados componentes del conglomerado intrafamiliar, así, como 4 aislados únicos, B) en aislados con 6 ó más bandas de IS6110, 32 aislados componentes de los 13 conglomerados (9 sin relación cercana y 4 intrafamiliares), y 4 aislados con perfil de RFLP único.

6. Microarreglos: se determinó el polimorfismo generado por deleciones, en el genoma de los aislados de la familia Beijing (conglomerado 5), por medio de microarreglos de *M. tuberculosis* [64]. En breve, 5μg del DNA problema y de

referencia (H37Rv) se digirieron con 4U de la enzima de restricción *AluI* (Gibco® BRL, Grand Island, N.Y, EUA) y 8U de *NdeI* (Gibco® BRL, Grand Island, N.Y, EUA). Cinco microgramos del DNA problema y de referencia se marcaron con dUTP-Cy3 y con dUTP-Cy5 respectivamente, usando el kit Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen life Technologies, Carisbad, California EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La misma cantidad de ambos DNA marcados se utilizó para la hibridación a 50°C por 12 h. La lectura se realizó en un ScanArray 4000 (Packard BioChips), y la imagen fue analizada con el programa ScanAlyze (Stanford University) para transformar, las intensidades de Cy3, Cy5 y ruido en valores numéricos, estos, fueron transportados al programa ProbeBrowser para calcular la razón Cy3/Cy5. Para evitar efectos de la incorporación de fluorocromo, se realizaron cuatro experimentos de cada uno de los aislados, dos consistieron en marcar el DNA problema con Cy3 y la H37Rv con Cy5. Los otros dos experimentos consistieron en marcar el DNA problema con Cy5 y la H37Rv con Cy3. Cundo se obtuvo una razón igual a 1, se interpretó como que el gen estaba presente en ambos genomas, mientras que, si la razón fue menor a uno, se interpretó como que probablemente el gen se encontraba deletado en el genoma problema. Una vez detectadas las probables deleciones, estas fueron confirmadas mediante la secuenciación de los productos de PCR originados por amplificación de los extremos de cada una de ellas. En breve, se seleccionaron los iniciadores correspondientes a las regiones aledañas y se realizaron las PCR bajo las siguientes condiciones: volumen final 50 µL, una mezcla de deoxinucleótidos trifosfatados –dNTPs– (Gibco® BRL, NY, EUA) 100 mM; MgCl₂ 1mM; *Taq* polimerasa 1U (Gibco® BRL, NY, EUA), 10 pmol de los oligonucleótidos y 10 ng de DNA. El programa consistió de un ciclo a 95°C por 5 minutos; 40 ciclos con las siguientes temperaturas: 95°C por 45 segundos; 65°C por 45 segundos; 72°C por 60 segundos y un ciclo final a 72°C por 8 minutos. Se usaron como controles la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv y control de reactivos.

RESULTADOS

Epidemiología

Tipificación por RFLP basado en IS6110: de julio 1998 a diciembre del 2002, se detectaron 253 casos de tuberculosis, 187 de los cuales (73.9%) fueron confirmados por cultivo. De todos los casos con cultivo positivo se obtuvo la información clínica y epidemiológica. De esta forma, se integraron dos conjuntos de aislados: el primero integrado por 118 (63.1%) aislados con 6 ó más bandas de IS6110 y el segundo con 69 (36.9%) aislados con menos de 6 bandas de IS6110. Del primer conjunto, 86 (72,9%) aislados mostraron un patrón de RFLP único, en tanto que los 32 (27.1%) restantes se encontraron formando parte de 13 conglomerados. Del segundo, 69 aislados fueron caracterizados con un segundo esquema de tipificación –espoligotipificación-, se encontró que 16 (23.1%) eran aislados únicos y 53 (76.8%) formaban parte de 9 conglomerados (8 compuestos por 51 pacientes no relacionados y 1 compuesto por dos individuos emparentados). De esta manera, de los 187 aislados originales, 102 fueron únicos (54.5%) y 85 (45.5%) estuvieron involucrados en 22 conglomerados, mismos que estaban integrados por 2 a 12 aislados.

De los 22 conglomerados identificados, 17 (74 aislados, 87%) estuvieron integrados por casos sin relación cercana de familia o de convivencia (9 de más de 6 bandas y 8 con menos de 6 bandas), los otros 5 conglomerados (11 aislados, 13%) (4 de más de 6 bandas y 1 con menos de 6 bandas) estuvieron integrados por individuos emparentados y convivientes en el mismo domicilio, es decir conglomerados intrafamiliares. Así, el 5.9% de los casos de tuberculosis confirmados por cultivo correspondió a casos de transmisión reciente en el ambiente doméstico. Diagrama 1

Espoligotipificación: se realizó espoligotipificación en todos los aislados con menos de 6 bandas de IS6110 (incluyendo el conglomerado de individuos emparentados) (grupo A). Mientras que de los aislados con 6 ó más bandas se incluyeron a los 32 aislados componentes de los 13 conglomerados y en los 4 aislados seleccionados al azar con perfil de RFLP único (grupo B). Ver Diagrama

2. Los hallazgos del primer grupo fueron descritos en el párrafo concerniente a la Epidemiología. De los 32 aislados (componentes de 13 conglomerados) del grupo B, se observaron únicamente 11 espoligotipos distintos, ya que el conglomerado 7 (compuesto por 3 aislados sin relación con 9 bandas de IS6110) mostró el mismo perfil de espoligotipo que el conglomerado 1 (compuesto por dos aislados intrafamiliares con 16 bandas de IS6110). El conglomerado 9 (compuesto por 4 aislados no relacionados con 10 bandas de IS6110) tuvo el mismo perfil de espoligotipo que el conglomerado 12 (compuesto por 2 aislados no relacionados con 11 bandas de IS6110). Finalmente, los 4 aislados con RFLP único del grupo B mostraron un perfil de espoligotipo diferente entre ellos.

Con los resultados de la espoligotipificación se pudo identificar dos grupos de aislados sugestivos de pertenecer a organismos de la familia Manila (conglomerado 4 compuesto por 3 aislados con 10 bandas de IS6110) y de la familia Beijing (conglomerado 5 compuesto por 2 aislados con 19 bandas de IS6110).

Después de la caracterización molecular con RFLP y espoligotipificación, pudimos integrar tres grupos de aislados en términos de susceptibilidad a los antibióticos, el grupo de aislados únicos (102), el grupo de aislados en conglomerados sin relación o parentesco (74) y el grupo de aislados en conglomerados intrafamiliares (11). Los resultados se aprecian el Cuadro 1. Al comparar la tasa de resistencia a estreptomicina entre los tres grupos se observó una diferencia estadística (X^2 , $p < 0.05$), también en el caso de isoniacida (X^2 , $p < 0.01$) y de rifampicina (X^2 , $p < 0.05$).

Por otro lado, al analizarse antecedente de vacunación con BCG en estos grupos encontramos los siguientes resultados: se obtuvo el dato en 87 de los 102 casos del grupo de aislados únicos, 52 (59.7%) estaban vacunados en tanto que 35 (40.3%) no lo estaban; asimismo, obtuvimos el antecedente de vacunación de 69 de los 74 casos del grupo de pacientes con aislados en conglomerados sin relación, 49 pacientes habían sido vacunados (71%) y 20 (29%) no habían sido vacunados; finalmente, se obtuvo la información de los 11 pacientes con aislados en conglomerados intrafamiliares, 5 pacientes habían sido vacunados (45.5%) y 6

(54.5%) no habían sido vacunados. Cuadro 2.

Datos demográficos y clínicos: para la descripción de los datos demográficos y clínicos se tomaron en cuenta los tres grupos previamente integrados con base en la caracterización molecular con RFLP y espoligotipificación: primer grupo: aislados únicos (102), segundo grupo: aislados en conglomerados sin relación o parentesco (74) y tercer grupo: conglomerados intrafamiliares (11). La mayoría de los pacientes del grupo de aislados únicos y de los pacientes en conglomerados sin relación, fueron hombres (65.7% y 56.7% respectivamente), mientras que en el grupo de conglomerados intrafamiliares, la mayoría fueron mujeres (55%). La mediana de edad en el primer grupo fue de 53 años (14-82años), en el segundo fue de 49 años (16-88 años), mientras que en el tercero fue de 22 años (18-68 años).

La fiebre apareció en 71.7% de los pacientes (61 de 85 pacientes) del primer grupo, el 57.3% (39 de 68 pacientes) del segundo y el 77.7% del (7 de 9 pacientes) tercer grupo. Hemoptisis ocurrió en 33 de 85 pacientes (38.8%) del primer grupo, 23 de 68 (33.8%) del segundo y 6 de 10 (60%) del tercero. Otras manifestaciones de desgaste como pérdida ponderal se observaron en 70 de 85 pacientes (82.3%) del primer grupo, 52 de 68 (76.5%) del segundo y 10 de 10 (100%) del tercero.

Veinticinco de 85 pacientes (29.4%) del primer grupo, 29 de 68 pacientes (42.6%) del segundo grupo y 4 de 10 pacientes (40%) del tercer grupo presentaron alteraciones pulmonares. Cuadro 3.

Secuenciación del gen *pks15/1*: este procedimiento se realizó en los siguientes grupos: A) en aislados con menos de 6 bandas de IS6110, 8 aislados, uno por cada conglomerado sin relación cercana, los dos aislados componentes del conglomerado intrafamiliar, así, como 4 aislados únicos seleccionados al azar, todos ellos tuvieron el gen *pks15/1* con la delección de 7pb distintiva de *M. tuberculosis* H37Rv. B) en aislados con 6 ó más bandas de IS6110, 32 aislados componentes de los 13 conglomerados (9 sin relación cercana y 4 intrafamiliares),

y 4 aislados con perfil de RFLP único. Veintisiete de los aislados en conglomerados (84.4%) y los cuatro aislados con RFLP único presentaron la delección de 7pb en el gen *pks15/1*. Los otros 5 aislados en conglomerados tuvieron el gen *pks15/1* intacto, 3 del conglomerado 4 (familia Manila) y 2 del conglomerado 5 (familia Beijing). Diagrama 3

Al describir la proporción de pacientes vacunados con BCG y su relación con la presencia del gen *pks15/1* intacto en este grupo selecto de 50 casos, encontramos lo siguiente: el antecedente de vacunación con BCG se obtuvo de 49 casos, 30 estaban vacunados con BCG, mientras que 19 no lo estaban. Cuarenta y cuatro aislados (26 de pacientes vacunados con BCG y 18 de pacientes no vacunados) tuvieron la delección de 7 pb en el gen *pks15/1*, mientras que los 5 aislados restantes mostraron el gen *pks15/1* intacto (4 de pacientes vacunados con BCG- tres del conglomerado 4 y uno del conglomerado 5-, y 1 de paciente sin vacunación- conglomerado 5), ver Cuadro 4.

Determinación del linaje mediante el análisis, por PCR, de grandes secuencias polimórficas: se realizó PCR de las regiones RD105 y RD239 para confirmar el linaje de los 5 aislados con el gen *pks15/1* intacto, 3 pertenecientes al conglomerado 4 (familia Manila) y 2 del conglomerado 5 (familia Beijing). Los aislados del conglomerado 4 mostraron la delección RD239 característica del linaje Indo-Oceánico y los aislados del conglomerado 5 mostraron la delección RD105 característica del linaje del Este de Asia. Destaca que los tres aislados del conglomerado 4 (linaje Indo-Oceánico) y uno de los dos aislados del conglomerado 5 (linaje del Este de Asia) fueron recuperados de pacientes vacunados con BCG.

Deligotipificación: se incluyeron 50 aislados componentes de los mismos grupos: A) Integrado por los aislados con menos de 6 bandas de IS6110, 8 aislados, uno por cada conglomerado sin relación cercana, los dos aislados componentes del conglomerado intrafamiliar, así, como 4 aislados únicos. B) Integrado por aislados con 6 ó más bandas de IS6110, 32 aislados componentes de los 13

conglomerados (9 no relacionados y 4 intrafamiliares), y 4 aislados con RFLP único. Cuadro 5.

La descripción de las sondas impresas en la membrana de deligotipificación, se muestran en el Cuadro 6.

De los 14 pacientes infectados por los aislados del grupo A, 6 estaban vacunados con BCG (4 pacientes por aislados en conglomerados no relacionados y 2 por aislados únicos) y 8 no estaban vacunados (4 pacientes por aislados en conglomerados no relacionados, 2 por aislados únicos y 2 por aislados en un conglomerado intrafamiliar compuesto por aislados con 5 bandas de IS6110 y espoligotipo idéntico).

De los 36 pacientes infectados por los aislados del grupo B, 24 estaban vacunados (17 pacientes por aislados en conglomerados no relacionados, 5 por aislados en conglomerados intrafamiliares y 2 por aislados únicos) y 11 no estaban vacunados (5 pacientes por aislados en conglomerados no relacionados, 4 por aislados en conglomerados intrafamiliares y 2 por aislados únicos) y se desconoce la información de un paciente infectado por un aislado en un conglomerado no relacionado.

Microarreglos: incluimos los dos aislados del linaje del Este de Asia (conglomerado 5). En ambos, se observaron 5 regiones deletadas (LPSs) (RD105: Rv0071 a Rv0074, RD149: Rv1572c a Rv1587c, RD150: Rv1671 a Rv1673c, RD152: Rv1754c a Rv1765c y RD207: Rv2814c a Rv2820c) que comprende 0.86% del genoma de H37Rv. Estas LPSs van de 2,757 a 11,533 pb y comprende la delección de 42 Rvs, cuyas funciones se muestran en el Cuadro 7. Algunos de los Rvs de tres de estas regiones fueron identificados previamente como deletados con el método de deligotipificación: Rv1582c, (segunda región), Rv1672c (tercera región), Rv1755c y Rv1761c (cuarta región). Las delecciones de las regiones Rv0071 a Rv0074 y Rv2814c a Rv2820c fueron detectadas únicamente con microarreglos.

DISCUSIÓN

En este estudio utilizamos varios métodos moleculares para caracterizar genéticamente un grupo de aislados clínicos de *M. tuberculosis* con características clínicas particulares (aislados recuperados de pacientes vacunados o no vacunados con BCG, así como involucrado en cadenas de transmisión reciente y con progresión rápida a enfermedad y aislados únicos). Con estos métodos moleculares finos observamos que prácticamente la mitad de nuestra población estuvo involucrada en cadenas de transmisión reciente con progresión rápida a enfermedad. Así mismo, encontramos dos conglomerados intrafamiliares causados por cepas de las familias Manila y Beijing, estos organismos fueron los únicos con un gen *pks15/1* intacto. Por otro lado, también pudimos determinar que los aislados de *M. tuberculosis* obtenidos de pacientes residentes de una región geográfica relativamente pequeña mostraron polimorfismo generado por la delección de grandes secuencias nucleotídicas del genoma. Sin embargo, después de esta caracterización fina no encontramos diferencias genómicas que sustenten el comportamiento biológico propuesto en nuestra hipótesis de trabajo (aislados con predilección por individuos vacunados con BCG y con capacidad de involucrarse en cadenas de transmisión reciente).

Epidemiología

Los hallazgos de este estudio indican que la mitad (45.5%) de los casos de tuberculosis pulmonar en la población de la Jurisdicción Sanitaria de Huauchinango, Puebla, fueron consecuencia de infección reciente con progresión rápida de la enfermedad, en tanto que solo el 54.5% de los casos correspondieron a reactivación endógena. La proporción de casos de transmisión reciente ha mostrado variaciones de acuerdo con la modalidad de estudio realizado (estudio de base poblacional vs estudios de casos de hospitales de referencia) y áreas geográficas, así se ha descrito lo siguiente:

Localidad donde se realizó el estudio	No. de aislados analizados	Método de tipificación	% de aislados en conglomerados	Referencia
Ontario Canadá	1308	RFLP y MIRU-VNTR	6.5	87
San Francisco	3134	RFLP y PGRs	15	88
Nueva York	2467	RFLP y espoligotipificación	27	89
Londres	552	RFLP	27	90
Praga	111	RFLP y espoligotipificación	27.9	91
Sur de Moravia	120	RFLP y espoligotipificación	35.3	92
Turquía	145	RFLP y espoligotipificación	35.9	93
Benín	194	MIRU-VNTR y espoligotipificación	34	93
Uganda*	183	RFLP	50	94
Sudáfrica	151	RFLP	54	95
Tailandia*	420	RFLP	26.4	96
Hong Kong	1553	RFLP y PGRs	29	97
Sur de la India	378	RFLP	38	98
Teherán	129	RFLP y espoligotipificación	43	99
Buenos Aires Argentina	208	RFLP y espoligotipificación	30.2	100
Rio Grande	262	RFLP y	34	101

Brasil		espoligotipificación		
Colombia	111	RFLP	40	102
Cuba	160	RFLP y espoligotipificación	48	103
Venezuela	41	MIRU-VNTR, RFLP y espoligotipificación	78	104
Veracruz, México	188	RFLP	36	105
Monterrey, México	166	RFLP y espoligotipificación	39	106
Veracruz, México	623	RFLP y espoligotipificación	24.8	107

Después de comparar nuestro resultados con los datos informados en la literatura, nuestros hallazgos se parecen más a los resultados de estudios de algunas regiones de África, así como a los de ciertas regiones de Latinoamérica (Cuba, Colombia, Venezuela). En apariencia, todas estas regiones tienen un nivel de desarrollo, medido a través de las variables comparables como el Índice de Desarrollo Humano (IDH) considerablemente más bajo que México. Así, los datos de este estudio muestran un problema grave debido a la tasa elevada de transmisión reciente con progresión rápida a enfermedad en la población estudiada. Esto probablemente refleja los problemas socio-económicos de la población de esta región, además, de que nos permite ver errores en la aplicación del programa de control de la tuberculosis en esta región, dado que al parecer los casos nuevos de tuberculosis son detectados tardíamente y con ello se permite mayor transmisión antes del inicio del tratamiento. Esto implica un gran reto para las autoridades de salud ya que uno de los objetivos principales, de los programas para el control de la tuberculosis, es la detección temprana y el tratamiento oportuno para interrumpir las cadenas de transmisión.

En este estudio fue posible confirmar la relación epidemiológica sólo en 5 de los 22 conglomerados (22.7%), de hecho en estos conglomerados fue posible definir transmisión intradomiciliaria, por RFLP/espiligotipificación y epidemiología convencional. Por otro lado, en los otros 17 conglomerados (77.3%) es probable que la relación entre los pacientes ocurriera a través de contactos casuales difíciles de rastrear pero esperables en una población relativamente cerrada y estable. Esta limitante ha sido descrita en otros estudios al contrastar los hallazgos de la epidemiología molecular con los de la epidemiología convencional [108, 109, 110].

La transmisión intradomiciliaria ha sido descrita desde hace mucho tiempo, sin embargo, la confirmación epidemiológica, microbiológica y molecular es un concepto relativamente nuevo. En nuestro estudio fue posible identificar el sitio de transmisión (intradomiciliaria), en 11 de 85 casos en conglomerados (13%). Recientemente, en un estudio realizado en Barcelona, España, analizaron 351 casos por métodos de epidemiología convencional y epidemiología molecular, encontraron que 129 (36%) formaban conglomerados, de éstos, 106 casos (82.2%) formaban conglomerados solo por métodos moleculares, es decir no se encontró relación epidemiológica entre ellos, y solo entre los 23 (17.8%) restantes se confirmó una relación epidemiológica y, de éstos, en siete casos (5.4%, 7 casos de 129 en conglomerados) se confirmó la transmisión intradomiciliaria [108].

Nuestros datos muestran que la mayor proporción de transmisión ocurre fuera de casa y por lo tanto, existe la oportunidad de mejorar la capacidad de detección de los contactos no intrafamiliares si realizamos un estudio de contactos más acucioso, en el que se consideren lugares recreativos, vecindad, trabajo, transporte ya que en otros estudios se ha reportado que mediante una segunda entrevista después de conocer el RFLP se incrementa la detección de casos secundarios [110, 111].

Espiligotipos: con la espiligotipificación se encontró que 7 (10.15%) de 60 aislados en conglomerados por RFLP (con menos de 6 bandas de IS6110) correspondían en realidad a aislados únicos. El uso de esta segunda tipificación

nos permitió incluir a los aislados con menos 6 bandas de IS6110 en el análisis de la dinámica de transmisión de la tuberculosis y con ello, detectar un conglomerado intrafamiliar adicional compuesto por dos pacientes con aislados de 5 bandas de IS6110.

Además, con esta metodología detectamos dos aislados clínicos del genotipo Beijing involucrados en transmisión intrafamiliar en una pequeña comunidad rural. Este grupo de pacientes corresponde al primer reporte de cepas Beijing en México cuyo origen no está precisado. Además, el genotipo Beijing ha sido escasamente aislado en los estudios de base poblacional que hemos realizado en Orizaba, Ver. por más de 10 años con 867 aislados (un aislado), de vigilancia de resistencia antimicrobiana en Huauchinango, Pue. durante 7 años con 358 aislados (dos aislados) y en 461 aislados recuperados de pacientes del INCMNSZ durante 15 años (un aislado) [112]. Si bien, ninguno de estos pacientes tiene historia de viajes a Estados Unidos o a Asia, es posible que algún miembro de la familia hubiera migrado temporalmente a Estados Unidos por razones de empleo, lo cual es común entre las personas de esta región del país, hubiese enfermado y, posteriormente, transmitido la infección.

En otras regiones del mundo, este genotipo llega a ser tan prevalente que comprende hasta el 90% de los casos en varios países asiáticos como China, Vietnam, Indonesia y Hong Kong [24, 25, 26, 113]. En contraste en América, este genotipo se ha encontrado asociado con brotes en prisiones de Estado Unidos, además se ha observado en grupos pequeños de pacientes en los programas de vigilancia de Colombia, Perú y Cuba [102, 114, 103], así como en Argentina y Brasil [115].

Con esta metodología de manera sorprendente encontramos otro conglomerado compuesto por tres aislados de pacientes familiares con un espoligotipo característico del genotipo denominado familia Manila, común en Filipinas. Este genotipo se ha descrito en varias regiones del mundo en una proporción baja. En la base de datos internacional de espilgotipos (spolDB4) [116] compuesta por alrededor de 40,000 cepas que muestran 1,939 (ST) espilgotipos diferentes. Entre ellas se encuentran 500 aislados de la familia Manila con 23 patrones de

espoligotipo bien definidos. Uno de estos patrones está integrado por más de 300 aislados procedentes de Filipinas (132), Estados Unidos (183), Tailandia (8), Suecia (4), Vietnam (3), Surinam (1). En el caso de Estados Unidos, se han registrado 33 aislados más de la familia Manila con un espoligotipo diferente de los 183 aislados mencionados antes. En tanto que, en el caso de América Latina solo se han registrado dos aislados con este genotipo, uno en Cuba y otro en Venezuela. Hasta ahora éste es el primer reporte de cepas de la familia Manila en México, aunque recientemente (enero 2010), reportaron el hallazgo de tres aislados de esta familia en la ciudad de Monterrey [117]. Estos dos estudios confirman la diversidad de las cepas de *M. tuberculosis* en México.

Secuenciación del gen *pks15/1*: en los aislados incluidos para la secuenciación del gen *pks15/1* (14 con menos de 6 bandas de IS6110 y 36 con más de 6 bandas) fue de gran interés encontrar una región variable del gen *pks15/1* intacta en cinco de ellos (10%), 3 del conglomerado 4 (familia Manila) y dos del conglomerado 5 (familia Beijing); es decir linaje Indo-Oceánico y linaje del Este de Asia, respectivamente.

El linaje Indo-Oceánico corresponde a un grupo de cepas consideradas internacionalmente como ancestrales, ya que se separaron del probable ancestro común antes de la pérdida de la región cromosomal TbD1; dado que los organismos que aparecieron después de esta delección se les conoce como cepas “modernas”, evento que precede a la separación entre cepas modernas con gen *pks15/1* intacto (linaje del este de Asia) y cepas con gen *pks15/1* parcialmente deletado (linaje Euro americano y linaje Indo africano) [68].

Hasta hace algunos años, sólo se había descrito el gen *pks15/1* intacto en las cepas de la familia Beijing y su fenotipo hipervirulento, está asociado con la producción de PGL. En modelo *in vitro* y animal, utilizando cepas genéticamente modificadas (pérdida de la producción de PGL), se ha observado un incremento de la liberación de citocinas pro-inflamatorias (TNF α e interleucina 6 y 12); mientras que, cuando se manipula a las cepas para que tengan una sobreproducción de PGL, se inhibe la liberación de estos mediadores pro-

inflamatorios [118,119]. Sin embargo, en un reporte reciente describieron un grupo de aislados de casos de tuberculosis pulmonar y meníngea, con un número variable de copias del IS6110, que presentan el gen *pks15/1* intacto. El espoligotipo de estos aislados no fue descrito, pero otros autores han reportado la presencia de cepas Indo-Oceánicas en esta región [68, 120]. En este estudio llama la atención el elevado número de cepas obtenidas de infecciones en sistema nervioso central (aproximadamente el 50%) lo que apoya el concepto de asociación entre la capacidad de producción de PGL y un comportamiento clínico más agresivo [121]. La presencia del gen *pks15/1* intacto no es por sí misma evidencia de producción del PGL, sin embargo, el substrato genético para su producción es una relación común entre estos dos linajes, por lo que el papel de este fenómeno en el patrón de transmisión intrafamiliar y la progresión rápida a enfermedad merece futuras investigaciones.

***Pks15/1* BCG:** interesantemente 5 de los 11 pacientes en conglomerados intrafamiliares habían sido vacunados con BCG, cuatro de estos 5 pacientes fueron infectados por aislados de *M. tuberculosis* con un gen *pks15/1* intacto (familia Beijing un caso, familia Manila tres casos).

La explicación para la asociación de infección por cepas de la familia Beijing en pacientes con inmunización previa con BCG, aun no se conoce, sin embargo, la historia de vacunación con BCG en el sureste de Asia sugiere la hipótesis de que la vacunación pudo haber seleccionado una cepa de *M. tuberculosis* con alguna ventaja selectiva frente a la inmunización con BCG. En un estudio reciente analizaron la relación de cepas Beijing típicas y atípicas con el antecedente de vacunación con BCG. Los autores aislaron frecuentemente y de manera significativa más cepas Beijing típicas de pacientes vacunados con BCG que de pacientes no vacunados. Asimismo, encontraron que el aislamiento de estas cepas es significativamente menor entre pacientes mayores de 75 años, esto les permitió formular la hipótesis que la vacunación ha favorecido la diseminación de estas cepas [122]. En otro estudio, analizaron la capacidad para producir PGL entre los cinco subgrupos de la familia Beijing. Los aislados del grupo 1 se

conocen como cepas Beijing atípicas, mientras que los grupos 2 a 5 se conocen como Beijing típicas. Los autores encontraron que la síntesis de PGL fue exclusiva de las cepas Beijing de los subgrupos 3 (1/10), 4 (6/10) y 5 (8/10). Es necesario hacer notar que del grupo dos solo probaron 1 aislado [123]. Asimismo, encontraron que las cepas Indo-Oceánicas (probaron 5) no fueron capaces de producir PGL.

Así los resultados de los dos estudios previamente citados [122, 123] señalan que las cepas de la familia Beijing típicas suelen ser productoras de PGL y son las que infectan más a pacientes con historia de aplicación con BCG. Todo ello nos hace inferir que las cepas productoras de PGL tienen capacidad de modular la respuesta inmune y permitir con ello la supervivencia en las células activadas por el estímulo con la vacuna BCG como se ha visto en estudios experimentales en animales. Sin embargo, la comprobación de este fenómeno requiere de nuevos estudios.

Deligotipos: el análisis de las deleciones (deligotipificación) nos permitió observar que las cepas de *M. tuberculosis* muestran variabilidad en el patrón de las mismas en su genoma, como se ha descrito previamente en otras comunicaciones científicas [67]. Con esta metodología pudimos detectar, en los tres aislados del conglomerado 4, la deleción del Rv3651, la cual corresponde a la RD239 específica del linaje Indo-Oceánico, reconfirmando a estos aislados como miembros de este linaje.

El Rv1582c codifica una proteína relacionada con el fago phiRv1 es uno de los 14 marcos de lectura abierta (ORF) que forman parte de la RD3 de *M. tuberculosis* H37Rv [124]. Cinco de estos ORF codifican para proteínas con una secuencia similar a las proteínas de fagos incluyendo una subunidad de la cápside. Esta región *per se* es incapaz de formar partículas virales, sin embargo, es capaz de propiciar la movilidad de ese segmento del fago de una localización cromosomal a otra [125].

En otros 24 de los 50 aislados referidos se encontraron deleciones del Rv3425 (codifica para proteínas de la familia PPE) de manera aleatoria. *M. tuberculosis*

tiene regularmente 2 familias de genes únicos PE (proteínas con dominio N-terminal conservado con un motivo prolina-ácido glutámico) y PPE (proteínas con un dominio N-terminal con un motivo de prolina-prolina-ácido glutámico) las cuales comprenden cerca del 10% de la capacidad codificante del genoma y se han vinculado con un papel importante en la generación de variabilidad antigénica y por lo tanto, evasión de la respuesta inmune. Sin embargo, su papel exacto en la patogénesis de *M. tuberculosis* continúa en estudio [51, 126, 127, 128, 129, 130]. En otro grupo de 13 aislados de los 50 referidos, se encontraron deleciones de manera aleatoria en el Rv1355c, este Rv está involucrado en la biosíntesis de un cofactor molibdo (molibdopterinas) necesario para molibdo enzimas sin relacionarse con un papel significativo en la patogénesis por ahora.

El Rv1755c (gen *plcD* que codifica para una fosfolipasa C) se encontró deletado de manera aleatoria en 13 de los 50 aislados. La fosfolipasa C es un factor de virulencia importante en una gran variedad de bacterias incluyendo *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* [44]. En el caso de *M. tuberculosis* se encuentran habitualmente 4 genes *plc* (*plcA*, *B*, *C*, *D*) responsables de la actividad de fosfolipasa C [51]. En estudios previos se ha demostrado que la región *plcABCD* presenta polimorfismo generado por IS6110. El polimorfismo en *plcD* es más común que en *plcABC* [131]. Es incierto aun cómo la actividad de esta fosfolipasa puede influir en la patogénesis de la infección por *M. tuberculosis*.

Otras deleciones ocurrieron en el Rv1672c (proteína de transporte a través de la membrana) en los dos aislados de la familia Beijing. Otras deleciones observadas fueron: en el Rv0195 en un aislado y en el Rv1994c en seis aislados, ambos codifican proteínas de regulación transcripcional; en el Rv3084 (acetil hidrolasa estearasa) dos aislados; en el Rv3617 (epoxihidrolasas) en dos aislados. Asimismo, encontramos 50 deleciones aleatorias en distintos Rvs (proteínas hipotéticas) en 30 de los 50 aislados.

La mayoría de las deleciones detectadas, corresponden a proteínas hipotéticas, así como deleciones relacionadas a elementos móviles. Así mismo, se

encontraron deleciones de regiones que codifican para proteína que pueden estar relacionadas con virulencia. Sin embargo, estas deleciones se encuentran de manera azarosa, es decir no se encontró un patrón de deleciones que pueda asociarse con los diferentes fenotipos estudiados.

Microarreglos: con los microarreglos de los dos aislados de la familia Beijing pudimos detectar 42 Rvs deletados en 5 regiones diferentes (RD105, RD149, RD150, RD152, RD207). Estas deleciones han sido identificadas previamente en un grupo de cepas de esta familia, donde las definieron como LPSs comunes (RD105, RD149, RD152, RD207) dado que las encontraron en todas las cepas estudiadas, en tanto que la RD150 fue definida como variablemente deletada [69]. Las funciones de estas Rvs muestran en el Cuadro 7 y tienen las siguientes características generales.

Las RD149, RD152 y RD207 están asociadas con elementos móviles, profago y la IS6110 [69]. Estas deleciones probablemente ocurren de manera azarosa en diferentes cepas y probablemente no correspondan a eventos polimórficos únicos. La RD207 es la responsable del espoligotipo característico de las cepas de la familia Beijing típicas [26].

Por otro lado, las RD105 y RD150 no están asociadas a elementos móviles y suelen ser eventos únicos en sitios específicos. Estos datos nuevamente confirman que estos aislados pertenecen a la familia Beijing. Los dos aislados mostraron el mismo patrón de deleciones indicando que se trata de organismos clonales. El análisis con los microarreglos nos permitió realizar un estudio más fino de estos dos aislados dado que pudimos analizar a los 3924 genes descritos en la cepa H37Rv. Así con esta metodología pudimos detectar dos regiones más que no fueron detectadas con la deligotipificación, RD105 (Rv0071-Rv0074) y RD207 (Rv2814c-Rv2820c), sin embargo, pudimos corroborar el linaje de estos organismos, cuya aparición es inédita en México.

Uso potencial de esos hallazgos: la variabilidad observada en los LPSs de *M. tuberculosis* ha permitido construir árboles genéticos más precisos de la filogenia

de este microorganismo. Asimismo, este nuevo conocimiento ha permitido reconocer ciertas dificultades para generar nuevas vacunas o nuevas herramientas de diagnóstico.

La teoría evolutiva predice que la introducción de vacunas que van dirigidas únicamente a una proporción de la población de un patógeno específico ejercen una presión selectiva que promueve el escape de variantes o promueve cambios en la capacidad de virulencia [132,133, 134]. En varios patógenos bacterianos se ha establecido la importancia de la variabilidad entre las cepas y por lo tanto en la eficacia de la vacuna. Por ejemplo, la inmunización masiva contra meningococo en África, ocasionó el reemplazo de serogrupos de *Neisseria meningitidis* [135, 136]. La reemergencia de tosferina se ha asociado con un incremento en las variantes de *Bordetella pertussis* que son distintas a la incluida en la vacuna comúnmente usada [137, 138]. En vista de la estructura poblacional filogeográfica de *M. tuberculosis*, las diferencias genéticas entre las cepas pudiera ser responsable de la variación de la eficacia de la vacuna BCG. En soporte a esta hipótesis existen dos estudios recientes en donde se ha demostrado que los ratones vacunados con BCG y retados con la cepa Beijing se encuentran menos protegidos que los ratones vacunados con BCG y expuestos a la cepa de referencia H37Rv [32].

Recientemente se ha utilizado la variabilidad genética de *M. tuberculosis* para seleccionar blancos para pruebas diagnósticas. Así, se han reportado dos nuevos antígenos, Rv2653c y Rv2654c, con potencial diagnóstico específico para *M. tuberculosis*. Sin embargo, el análisis de deleciones genómicas reveló la ausencia de estos genes en una gran proporción de cepas del sur y sureste de Asia [140, 67, 68]. Por otro lado, un estudio en Gambia mostró que los pacientes con tuberculosis y sus contactos intradomiciliarios infectados con cepas del linaje 6 (*M. africanum*), tienen una respuesta atenuada al Early Secreted Antigenic Target 6 (ESAT6) [141]. Esto tiene implicaciones importantes dado que ESAT-6 es uno de los antígenos claves en el desarrollo de nuevas técnicas para diagnóstico y desarrollo de vacunas [142, 143]. Sin duda, uno de los aspectos a considerar en la producción de nuevas vacunas así como el diseño de nuevas pruebas diagnósticas, es la variabilidad genética observada en *M. tuberculosis*.

Limitaciones del estudio: una de las principales limitantes de estos estudios es que no se puede afirmar que los aislados únicos realmente lo sean ya que los contactos enfermos bien pudieran haber migrado, o simplemente no acudieron al médico, o aún no presentan la enfermedad. Sin embargo, otra posibilidad más es que simplemente se nos hayan escapado a la ventana de tiempo que se seleccionó. Con respecto a esto último, consideramos que estos eventos son aislados y la plausibilidad biológica de pertenecer a una cadena de transmisión reciente es mínima.

El método que utilizamos para la búsqueda de estas diferencias (deligotipo) solo considera la posibilidad de analizar la presencia o ausencia de ciertos genes o regiones. No nos permite analizar otro tipo de cambios (deleciones pequeñas, mutaciones puntuales, deleciones de regiones intergenicas, re-arreglos genéticos) que pueden jugar un papel importante en la virulencia de *M. tuberculosis*.

Otra de las metodologías que utilizamos fue la de los microarreglos, la cual nos permitió probar los 3924 genes descritos en la cepa H37Rv, sin embargo, los pudimos utilizar solo en las cepas de la familia Beijing. Con estos microarreglos, pudimos detectar la ausencia de determinadas regiones del genoma de los aislados Beijing en comparación a H37Rv, sin embargo, lo opuesto no lo podemos saber.

Los estudios de mutaciones dirigidas, secuenciación y genómica comparativa han mostrado que las diferencias probablemente relacionadas con virulencia incluyen mutaciones puntuales, deleciones pequeñas, pérdida de grandes regiones genómicas, inserciones o duplicaciones.

La comparación de la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* H37Ra (cepa no virulenta) con la de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa virulenta) reveló que *M. tuberculosis* H37Ra es 8,445 pb más grande que H37Rv, y existen 198 variaciones nucleotídicas. Entre estas mutaciones se encuentran las que afectan a genes que codifican para factores de transcripción, reguladores metabólicos, genes relacionados con componentes de pared celular, familia de genes PE/PPE-

PGRS. En particular, se ha descrito que *M. tuberculosis* H37Ra cuenta con una mutación puntual en el gen que codifica para el sistema de dos componentes PhoP, y se ha demostrado que este gen es un factor importante de virulencia en *M. tuberculosis*. Estas mutaciones pueden en parte, ser las responsables del fenotipo no virulento *M. tuberculosis* H37Ra [144].

Por otro lado, se ha señalado que deleciones pequeñas también juegan un papel importante. *M. tuberculosis* requiere del gen *pks15/1* intacto para la biosíntesis de glicolípidos fenólicos (PGL-tb), la producción de éstos, por aislados clínicos, se ha correlacionado con virulencia[28].

Existe variabilidad en la eficacia de la vacuna BCG para proteger contra tuberculosis. Cuando se compararon los genomas (con microarreglos) de *M. bovis* y *M. tuberculosis* con las diferentes cepas de *M. bovis* BCG usadas como vacunas, encontraron 16 regiones variablemente deletadas en *M. bovis* y las diferentes *M. bovis* BCG en relación a *M. tuberculosis* H37Rv. Con estos resultados los autores postularon que las diferencias genéticas entre estas cepas pueden en parte explicar la eficacia de las diferentes vacunas [64].

En un estudio reciente se reportó que algunos miembros de la familia Beijing cuentan con una duplicación masiva de DNA (350 kb, que comprenden más de 300 genes), probablemente debido a recombinación entre secuencias de inserción. Entre los genes duplicados se encuentra el que codifica para DosR, quien activa la transcripción de genes en respuesta a la reducción de oxígeno. Sin embargo, aún no se han evaluado las implicaciones de esta duplicación en cuanto a la transmisión y desarrollo de tuberculosis activa[145].

Dado estos antecedentes, podemos sospechar que si existen diferencias genéticas entre diferentes fenotipos de *M. tuberculosis*, que le permiten adaptarse a las condiciones adversas generadas por el hospedero. Por lo que es necesario considerar la posibilidad de analizar la secuencia completa y más aún, llevar a cabo análisis de expresión.

CONCLUSIONES

Después de la caracterización, con los métodos moleculares previamente descritos, de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* recuperados de pacientes de nuestra región de estudio, no encontramos diferencias genómicas que sustenten el comportamiento biológico propuesto en nuestra hipótesis de trabajo (aislados con predilección por individuos vacunados con BCG y con capacidad de involucrarse en cadenas de transmisión reciente).

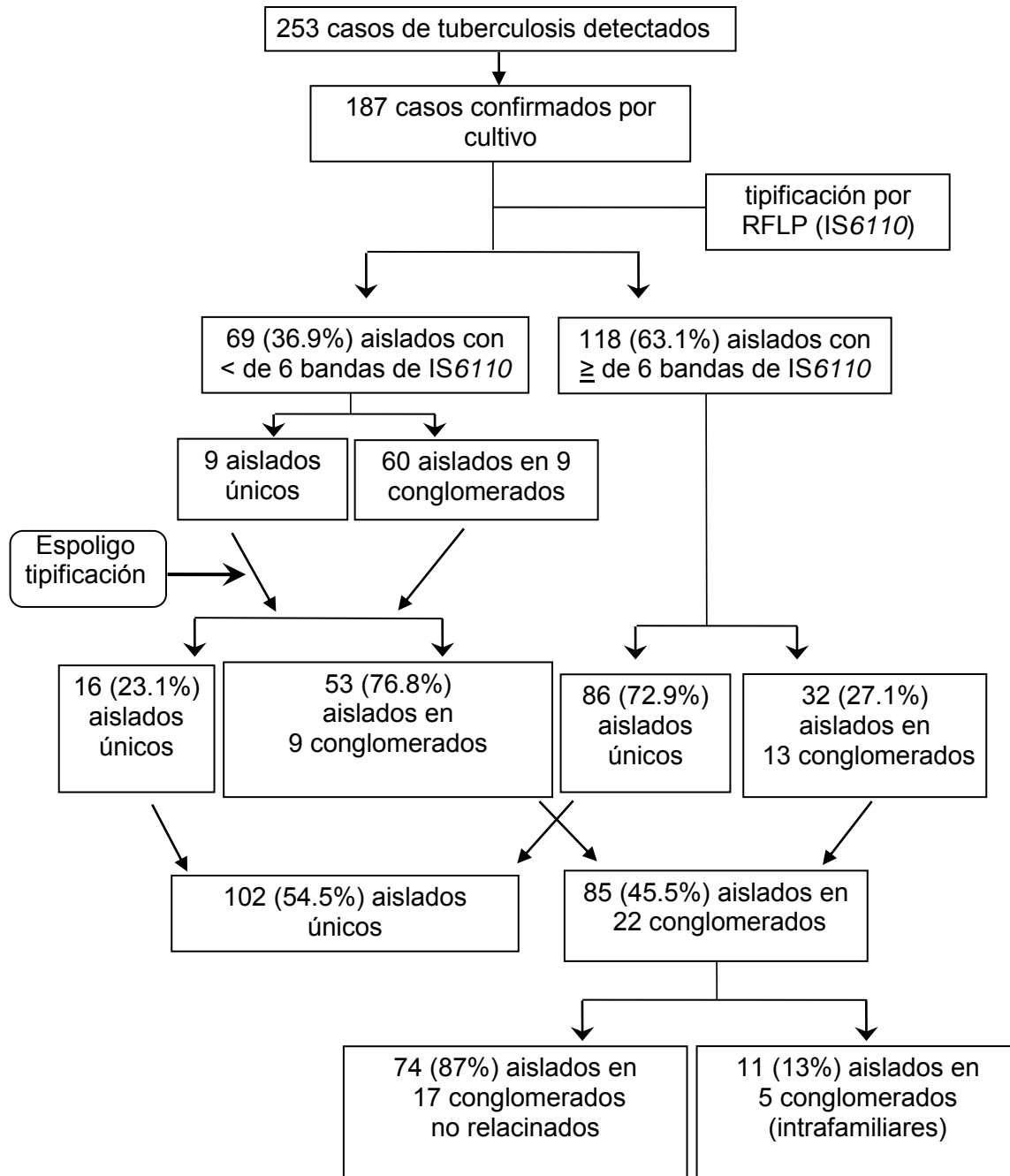
Cerca de la mitad de los casos de tuberculosis diagnosticados en nuestra población de estudio, fueron consecuencia de transmisión reciente con progresión rápida a enfermedad. Esto implica un gran reto para las autoridades de salud ya que uno de los objetivos principales, de los programas para el control de la tuberculosis, es la detección temprana y el tratamiento oportuno para interrumpir las cadenas de transmisión.

Los linajes Indo-Oceánico y del Este de Asia, no son comunes en México. La presencia de éstos en México debe llamar la atención de las autoridades de salud ya que al menos el linaje Beijing ha demostrado ser altamente virulento y con tendencia a generar resistencia a las drogas anti-tuberculosis. Aunque hasta ahora no existen datos donde se analice la virulencia del linaje Indo-Oceánico, estos comparten un marcador de virulencia con las cepas de la familia Beijing.

El descubrimiento de factores de virulencia es un aspecto importante para entender la patogénesis bacteriana y su interacción con el hospedero. El descubrimiento de estos factores nos puede llevar al desarrollo de medicamentos contra nuevos blancos o el desarrollo de nuevas vacunas.

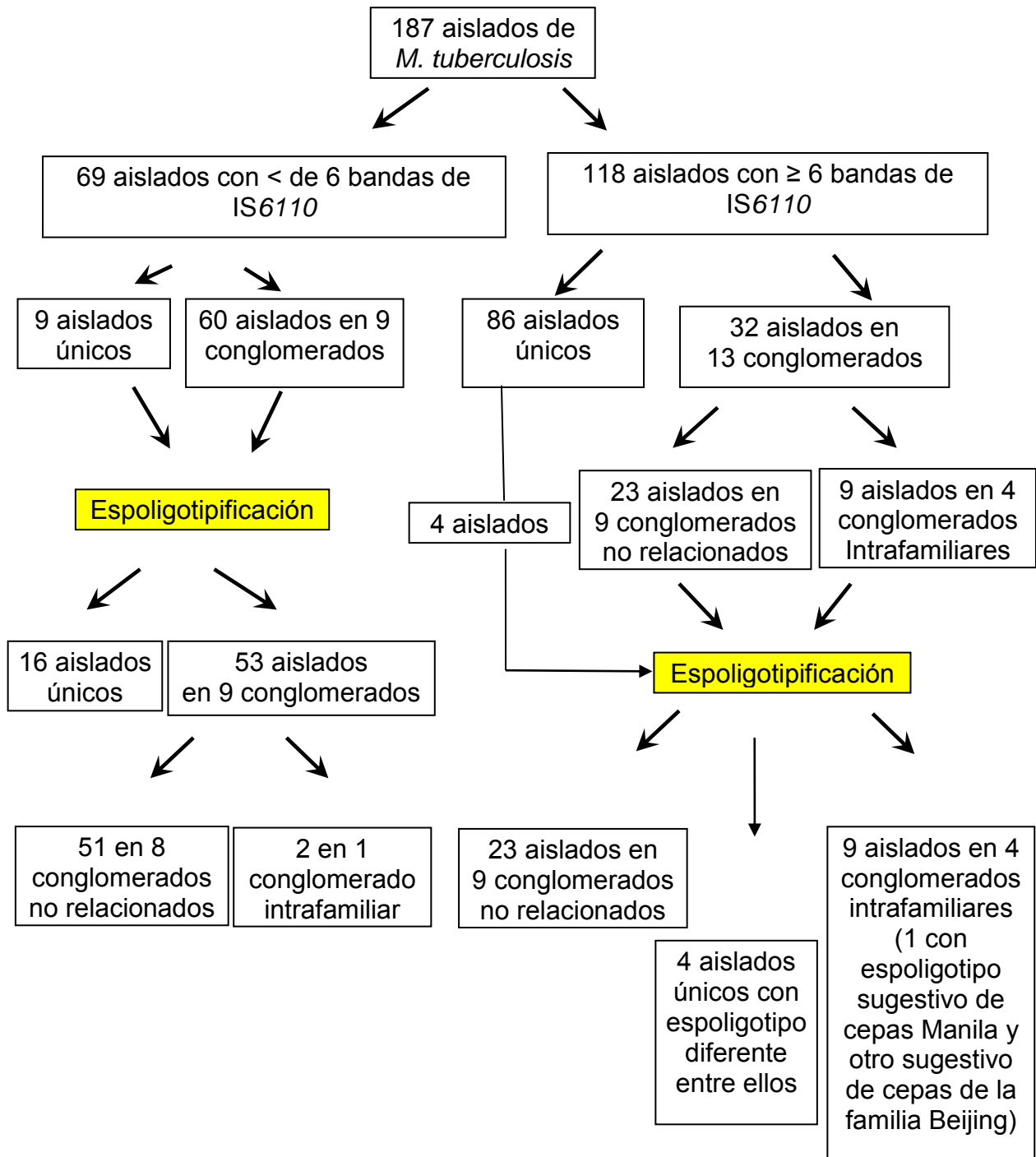
La variabilidad observada en los fenotipos de *M. tuberculosis*, debe ser resultado de una serie de eventos genéticos, de expresión y regulación, a los que *M. tuberculosis* debe adaptarse con el fin de responder y evadir a los mecanismos de defensa del organismo, por lo que para un mejor entendimiento de esta compleja interacción, se debe incluir la combinación de estudios de genómica (secuenciación completa), transcriptoma y proteómica.

Diagrama 1. Epidemiología molecular de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis*



RFLP: Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción

Diagrama 2. Espoligotipificación de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis*



Cuadro 1. Resistencia antimicrobiana de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis*

	Total	S (%)	I (%)	R (%)	E (%)
Aislados únicos	102	6 (5.9)	17 (16.6)	7 (6.8)	0
Aislados en conglomerados no relacionados	74	5 (6.7)	7 (9.5)	3 (4)	1 (1.3)
Aislados en conglomerados intrafamiliares	11	0	3 (27.3%)	0	0
Total	187	11 (5.9)	27 (15.5)	10 (5.3)	1 (0.6)

S: Estreptomina, I: Isoniacida, R: Rifampicina, E: Etambutol

Cuadro 2. Antecedente de vacunación, con BCG, de los pacientes en quienes se recuperaron los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* incluidos en el estudio

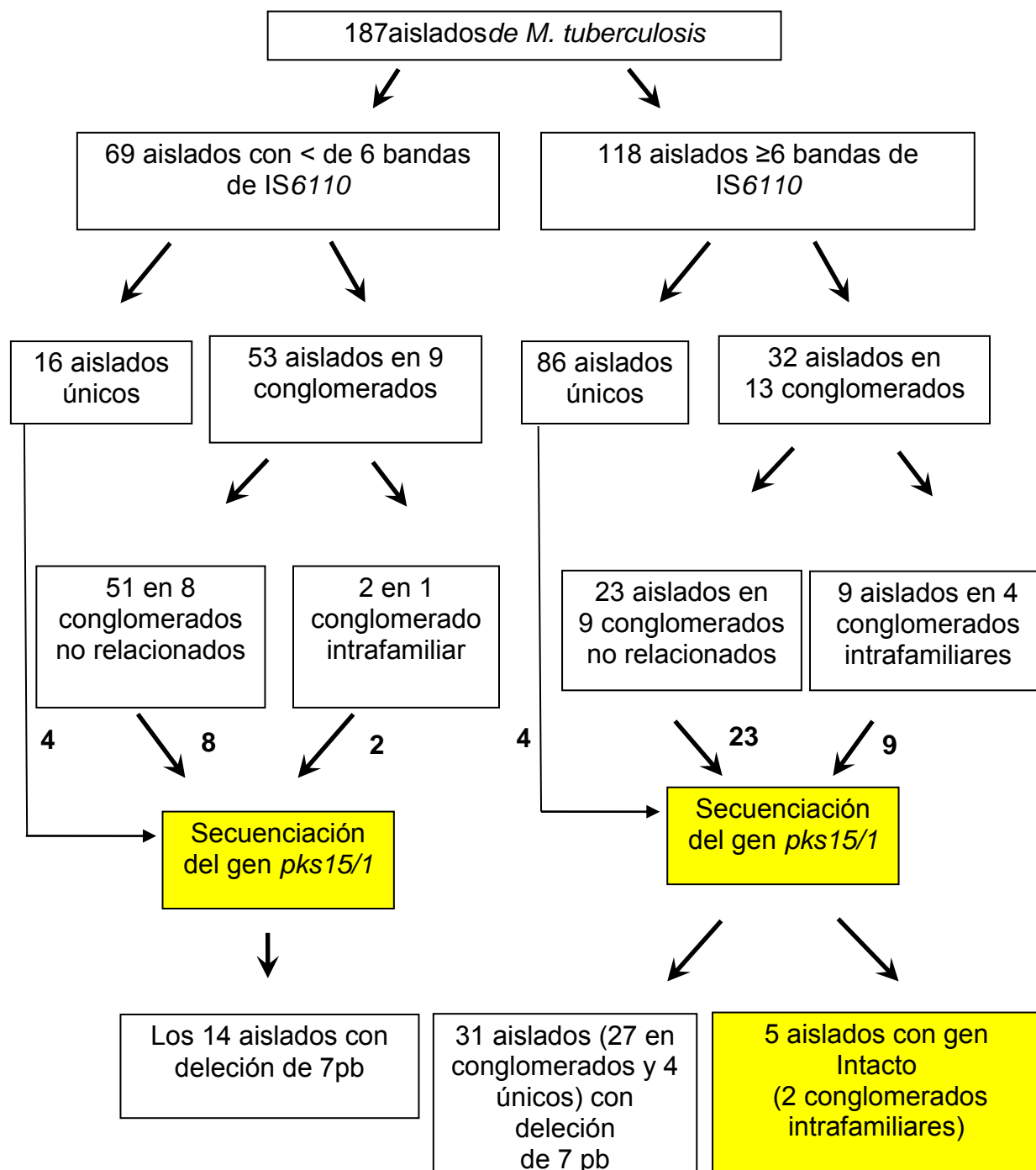
	con BCG (%)	sin BCG (%)	sin dato (%)	Total
Aislados únicos	52 (59.7)	35 (40.3)	15	102
Aislados en 17 conglomerados no relacionados	49 (71)	20 (29)	5	74
Aislados en 5 conglomerados intrafamiliares	5 (45.5)	6 (54.5)	0	11
Total	106 (63.5)	61 (36.5)	20	187

Cuadro 3. Datos clínicos de los pacientes en quienes se recuperaron los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* analizados

		Únicos (n=102)	Conglomerados no relacionados (n=74)	Conglomerados intrafamiliares (n=11)
Masculino		67 (65.7%)	42 (56.7%)	5 (45%)
Edad (años)		14-82	16-88	18-68
Mediana (años)		53	49	22
Fiebre	NO	24	29	2
	SI	61 (71.7%)	39 (57.3%)	7 (77.7%)
	SD	17	6	2
Hemoptisis	NO	52	45	4
	SI	33 (38.8%)	23 (33.8%)	6 (60%)
	SD	17	6	1
Tos con flema	NO	60	38	6
	SI	25 (29.4%)	29 (42.6%)	4 (40%)
	SD	17	7	1
Pérdida de peso	NO	15	16	0
	SI	70 (82.3%)	52 (76.4%)	10 (100%)
	SD	17	6	1

SD: Sin dato.

Diagrama 3. Secuenciación del gen *pks15/1* de aislados de *Mycobacterium tuberculosis* seleccionados



Cuadro 4. Descripción del antecedente de vacunación con BCG de los pacientes en quienes se recuperaron los aislados de *Mycobacterium tuberculosis*, y la identificación de la secuencia de la región variable del gen *pks15/1* en los mismos aislados

		con BCG	sin BCG	sin dato
Grupo A: 14 aislados (< 6 bandas IS6110)	Únicos (4)	2	2	
	Intrafamiliares (2)		2	
	Conglomerados no relacionados (8)	4	4	
Grupo B: 32 aislados en conglomerados (≥ 6 bandas IS6110)	Sin relación (23)	17	5	1
	Intrafamiliares (9)	5	4	
Grupo C: 4 aislados (≥ 6 bandas IS6110)	Aislados únicos (4)	2	2	
Total	50	30	19	1

4 con el gen *pks15/1* intacto

1 con el gen *pks15/1* intacto

Cuadro 6. Descripción de las sondas (Rv) impresas en la membrana de deligotipificación

Sonda en la membrana	Nombre	Número de Rv o secuencia intergénica	Proteína	Función	Número de aislados con la delección
1					
2	HT0921	921	Resolvasa	Previene la co-integración de DNA extraño antes de la integración al cromosoma	
3	HT2812	2812	Transposasa	Requerido para la transposición del elemento IS 1604.	
4	DMT0676	cttcactacgacccggg ctggtggaaca			3
5	DMT1360	catctcaaggatccctag caaggcgatacc			13
6	DS110	195	Proteína de regulación transcripcional de dos componentes	Posiblemente parte de un sensor de un sistema de dos componentes	1
7	DS117	405	Policétido sintetasa de unión a membrana	Posiblemente involucrada en la síntesis de lípidos	
8	DS121	571c	Proteína hipotética	Función no conocida	3
9	RD16	3901c	Proteína hipotética	Función no conocida	1
10	RD18BCG	1189	Factor sigma SigI RNA polimerasa	Factor de iniciación que promueve la unión de la RNA polimerasa a sitios de iniciación específicos	
11	DS145	1355c	Proteína hipotética	Función involucrada en la biosíntesis de un cofactor necesario para molibdoenzimas	13
12	RD6BCG	1512	Epimerase epiA	Función no conocida	
13	RD5	1582	Proteína de un fago phiRv1	Función no conocida	28
14	DS150	1672	Proteína de transporte	Función involucrada en el transporte de sustratos no determinados a través de la membrana.	2
15	RD6I	1755	PlcD	Probable Fosfolipasa C	15
16	RD6a	1761c	Proteína hipotética	Función no conocida	12
17	DS163	1878	Glutamino sintetasa	Involucrada en la biosíntesis de Glutamina	
18	DS165	1895	Deshidrogenasa	No conocida, probablemente involucrada en el metabolismo celular	
19	DS167	1927	Proteína hipotética	Función no conocida	
20	RD15BCG	1976c	Proteína hipotética	Función no conocida	3
21	RD2BCG	1985c	Proteína de inhibición de la replicación cromosomal	Involucrada en actividad transcripcional	
22	DS7a	cggctagtcggtctacctc agggtctttg			3
23	DS174C	1994	Proteína de regulación transcripcional	Involucrada en mecanismos transcripcionales	6
24	DS174A	2000	Proteína hipotética	Función no conocida	

25	RD20	2124c	Metiltetrahidro folato-homocisteina metiltransferasa	Involucrada en la biosíntesis de Metionina	
26	DS182	2275	Proteína hipotética	Función no conocida	9
27	DS183	2314c	Proteína hipotética	Función no conocida	1
28	RD9	2349c	Fosfolipasa C	Hidroliza esfingomielina y fosfatidilcolina. Probable factor de virulencia implicada en la patogénesis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a nivel de sobrevivencia intracelular, por la alteración de eventos de señalización o por citotoxicidad directa	
29	ORD9	gctgagtcaggaagc aggcaagtgag			
30	RD33	2406c	Proteína hipotética	Función no conocida	5
31	DS198a	agaggtcactggttcaat cccagtatcgcg			1
32	RD19	3084	Acetil hidrolasa estearasa	Enzima lipolítica involucrada en el metabolismo celular	2
33	RD5BCG	3121	Citocromo P450	Oxidan una variedad de componentes estructuralmente no relacionados, incluyendo esteroides, ácidos grasos y geobióticos	
34	RD16BCG	3402c	Proteína hipotética	No conocida, aunque parece estar involucrada en procesos celulares	
35	RD13	3425	Familia PPE,	Función no conocida	29
36	RD11BCG	3429	Familia PPE	Función no conocida	1
37	L27	3519	Proteína hipotética	Función no conocida	
38	RD14BCG	1769	Proteína hipotética		
39	DS236	attcggcgtcgaagcgg ggcgctctcat			
40	RD21	3617	Epoxi hidrolasa EphA	Involucrada en reacciones de des-intoxicación seguidas de daño oxidativo a lípidos	2
41	DS239	3651	Proteína hipotética	Función no conocida	3
42	RD25BCG	aactaccccctgcgtcac tcctcgactc			
43	RD18	3766	Proteína hipotética	Función no conocida	
44	RD1BCG	3875	ESAT-6 Blanco antigénico de secreción temprana	Función no conocida. Causa altos niveles de IFN gama a partir de las células de memoria durante la primera fase de la respuesta inmune protectora	

Cuadro 7. Descripción de los Rv encontrados como deletados en los dos aislados de la familia Beijing

RD	Rv	Proteína	Función
105	0071	Madurasa	Función no conocida
	0072 y 0073	Proteínas transmembranales de transporte ABC	Transporte activo de glutamina a través de la membrana
	0074	Proteína hipotética	Función no conocida
149	1572c	Proteína hipotética	Función no conocida
	1573-1585c	Proteína relacionada a fago phiRV1	Función no conocida
	1586c	Integrasa del fago phiRv1	Integrar el fago dentro del cromosoma
	1587	Familia de proteínas REP13E12	Función no conocida
150	1671	Proteína hipotética, probable proteína de membrana	Función no conocida
	1672c	Proteína de transporte a través de la membrana	Responsable para la translocación de sustratos no determinados a través de la membrana
	1673c y 1674	Proteína hipotética	Función no conocida
152	1755	Fosfolipasa C	Hidroliza esfingomielina además de fosfatidil colina. Probable factor de virulencia implicado en la patogénesis de <i>M. tuberculosis</i> en la sobrevivencia intracelular por la alteración de eventos de señalización celular o por citotoxicidad directa
	1756c y 1757c	Probable transposasa	Requerida para la transposición de IS6110
	1758	Cutinasa	Hidrólisis de la cutina
	1759c	Proteínas de la familia PE_PGRS	Función no conocida, tiene actividad de unión a fibronectina, por lo tanto debe mediar la unión bacteriana a la célula del hospedero
	1760-1762c	Proteína hipotética	Función no conocida
	1763 y 1764	Probable transposasa	Requerida para la transposición de IS6110
	1765c	Proteína hipotética	Función no conocida
207	2814c y 2815c	Probable transposasa	Requerida para la transposición de IS6110
	2816c-2820c	Proteína hipotética	Función no conocida

RD: Región de diferencia

Anexos

ORIGINAL ARTICLE

Molecular Analysis of Mycobacterium tuberculosis Strains with an Intact pks15/1 Gene in a Rural Community of Mexico

Arelí Martínez-Gamboa,^a Alfredo Ponce-de-León,^a Arturo Galindo-Fraga,^a Miriam Bobadilla-del-Valle,^a Midori Kato-Maeda,^b Brian D. Robertson,^c Douglas B. Young,^c Peter M. Small,^d and José Sifuentes-Osornio^a

^aLaboratory of Clinical Microbiology, Salvador Zubiran National Institute for Medical Sciences and Nutrition, Mexico, D.F., Mexico

^bDivision of Pulmonary and Critical Care Medicine, San Francisco General Hospital, San Francisco, CA

^cCentre for Molecular Microbiology and Infection, Imperial College, London, UK ^dTuberculosis Global Health Program

Received for publication July 8, 2008; accepted August 25, 2008 (ARCMED-D-08-00292).

Background. Mycobacterium tuberculosis (MTB) is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide and infects $\frac{1}{3}$ of the human population, but only 10% of all infected individuals will ever develop the disease and half of these may result in a rapid progression to disease during the first 2 years after being infected. On the other hand, some phenotypic differences among mycobacterial strains contribute to variations in the outcome of the infection, e.g., the hypervirulent phenotype described in the Beijing family has been associated with the production of a phenolic glycolipid, which reduces the production of Th1 cytokines in the experimental model and requires the activity of a polyketide synthase enzyme encoded by the pks15/1 gene.

Methods. We analyzed clinical isolates characterized by recent transmission and rapid progression to disease to identify factors that may influence such behavior from a rural and semi-urban community in eastern Mexico.

Results. Using various typing tools, we were able to identify intrafamilial clusters which belonged to the East Asian lineage of MTB isolates (Beijing family) and another that belonged to the Indo-Oceanic lineage (Manila family). All isolates within these two clusters showed an intact pks15/1 gene sequence. Additionally, we identified three more family clusters that belonged to the Euro-American lineage and showed the typical 7-bp deletion of the pks15/1 gene. This 7-bp deletion was also found in the remaining 23 cases from non-family clusters.

Conclusions. This is the first report of cases caused by strains with an intact pks15/1 gene in Mexico. Interestingly, we identified the three main mycobacterial lineages described so far: East-Asian, Indo-Oceanic, and Euro-American in a human population with almost no present-day migration. © 2008 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Tuberculosis, Tuberculosis lineages, pks15/1, Phenolglycolipids.

Introduction

Mycobacterium tuberculosis is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide and infects $\frac{1}{3}$ of the human population, causing ≈ 2 million deaths. There are ≈ 10

million new cases every year (1). Of all the infected individuals, only 10% will ever develop active disease and half of them may do so during the first 2 years (recent infection with rapid progression to disease) after being infected (2).

In addition, there are groups of patients who apparently have a greater probability of transmitting the infection as measured by protein purified derivative (PPD) reactivity among their close contacts, as well as others who do not seem to infect any contacts, even though they share the same risk factors and exposure (3e5).

It is possible that phenotypic differences among mycobacterial strains contribute to variations in the outcome of

Address reprint requests to: Alfredo Ponce-de-León, M.D., Laboratory of Clinical Microbiology, Department of Infectious Diseases, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, Vasco de Quiroga 15, Col. Sección XVI, Mexico, D.F. 14000, Mexico; E-mail: alfredop@quetzal.innsz.mx

infection, and several different experimental models have been developed to test this hypothesis with different mycobacterial genotypes (6,7). For example, *Mycobacterium tuberculosis* strains with diverse genotypes show differences in immunopathogenicity in the mouse model of disease (6). Recently, a hypervirulent phenotype was observed for an isolate that belongs to the Beijing family of strains. This hypervirulence was associated with production of a phenolic glycolipid (PGL), which dose-dependently reduces the production of Th1 cytokines (TNF- α and interleukins 6 and 12) in in vitro and in in vivo models (8). Production of PGL requires a metabolic pathway that involves a polyketide synthase enzyme encoded by the *pks15/1* gene. In the major Euro-American lineage of *M. tuberculosis* (9), which includes well-characterized sequenced strains such as H37Rv, *pks15/1* has been disrupted by a 7-bp deletion that renders these strains unable to produce PGL (10,11). It has been suggested that the presence or absence of an intact *pks15/1* gene may contribute to differences in biological behavior observed among the different isolates (8,12).

The aim of the present study was to search for genotypic markers that may be shared by strains of *M. tuberculosis* involved in efficient transmission and rapid progression to disease within families in the eastern Sierra Madre in Mexico. Five intrafamilial clusters were identified. An intact *pks15/1* gene was found in two of the family clusters; one belonging to the East Asian lineage and the other to the Indo-Oceanic lineage (9). In the remaining family and non-familial clusters of the region, the 7-bp deletion in *pks15/1* was found, characteristic of the Euro-American lineage of MTB strains.

Materials and Methods

Patients and Setting

Between July 1998 and December 2002, we prospectively conducted a resistance-surveillance study of tuberculosis in the most populated areas of sanitary jurisdiction No. 1 of Huauchinango, Puebla, Mexico (13). The community under surveillance was comprised by 216,863 inhabitants according to the National Census 2000 (www.inegi.gob.mx). We conducted an active search of all tuberculosis cases in patients with chronic cough who attended primary care clinics. Once identified, and after informed consent, three sputum samples and a standardized questionnaire for registry of the demographic and clinical variables were taken. The epidemiologic information for each patient in a cluster was analyzed to determine the plausibility of recent transmission. In-depth interviews were performed by one of the investigators (MKM) in all clustered cases in order to identify

transmission links among them. All cases were referred to the National Program for Tuberculosis Control to receive proper treatment. The study was reviewed and accepted by the Institutional Review Board Ethics Committee of the Salvador Zubiran National Institute of Medical Sciences and Nutrition.

Microbiological Analysis

Acid-fast smear exam and culture of the sputum samples were performed. The samples were digested and decontaminated by the N-acetylcysteine-sodium hydroxide method (14) and inoculated in Löwenstein-Jensen and BACTEC 12B (BACTEC TB460, Becton Dickinson, Cockeysville, MD) broth; positive cultures were identified as *M. tuberculosis* by conventional biochemical tests, and/or DNA probing (Accuprobe, GEN-PROBE, San Diego, CA) (15).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis

We performed RFLP analysis of all culture-positive tuberculosis cases. RFLP was done according to standardized procedures (16,17). In brief, DNA was digested with PvuII and electrophoresed in a 0.8% agarose gel at 60 V for 14 h. A Southern blot was then performed and the resulting nylon membrane hybridized with the IS-6110 sequence as a probe. RFLP patterns were analyzed and compared with the BioImage software (MY, Ann Arbor, MI) and visually confirmed. Strains were considered to be clustered when they shared an identical IS6110 fingerprint. In each experiment we used *M. tuberculosis* H37Rv as controls for both automated and visually assisted comparisons.

Spoligotyping

We performed spoligotyping for all clustered cases independently of the number of IS6110 copies. The direct repeat (DR) region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then analyzed according to the spoligotyping protocol, as described elsewhere (18). We used as controls *M. tuberculosis* H37Rv and *M. bovis* BCGP3.

pks15/1 Polymorphic Segment Sequencing

We amplified a 383-bp fragment in the variable region described previously (11) for all clustered cases. Amplification was made in a final volume of 25 mL using a mixture of deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs, Gibco BRL, Grand Island, NY) 100 mM; MgCl₂ 2 mM; Taq polymerase 1 U (Gibco BRL), 10 pmol of primer R 5'-CTGCCAGG-AAACACGAC-3' and primer F 5'-GTGTCCTCCTTTGG-GATCAG-3' and 10 ng of DNA. The program consisted of a cycle at 95 C for 5 min followed by 30 cycles with the following temperatures: 95 C for 45 sec; 60 C for 45 sec; 72 C for 45 sec and a final cycle at 72 C for 8 min.

M. tuberculosis H37Rv and CDC1551 strains were used as controls for the 7-bp deletion and strains characterized as W/Beijing group as controls for the complete gene (wild type) kindly provided by Dr. R. Hernandez-Pando. PCR products were visualized in an agarose gel (Gibco BRL). For the sequencing of amplified products, DNA was purified with a commercial kit (Qiaquick DNA Gel Extraction Kit, Qiagen, Stanford, CA). The amplification of products was made with a commercial kit (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied BioSystems, Perkin Elmer, Foster City, CA), and sequencing was done using an Applied BioSystems 3100 (Perkin Elmer) system according to the manufacturer's instructions.

Lineage Determination

We used large sequence polymorphism (LPS) to determine the lineage of all intrafamilial clustered cases as previously described (9). Briefly, we used multiplex real-time PCR (Stratagene Mx 3000P, La Jolla, CA) to determine the presence or absence of RD105 (absent in the East Asian lineage) and RD239 (absent in the Indo-Oceanic lineage). We used the following primers and probes: RD105-F 5'-aacgaactgcactgaactc-3'; RD105-R 5'-tcccgcaccggtgag-3'; RD105-probe, 5'-FAM-agagtggacagtttcg-MGBNFQ-3'; RD239-F' 5'-cgagctcaatccgaacgaaa-3'; RD239-R, 5'-ccggcttgctttaactg-3'; RD239-probe, 5'-VIC ccagtgcttgccatg-MGBNFQ-3'. Samples with no increase in fluorescence of either FAM or VIC were considered deleted for the corresponding region of interest.

Criteria for Typing Clinical Isolates

We performed conventional IS6110-based genotyping in all isolates (187 strains). On those isolates with ≥ 6 copies of IS6110, spoligotyping was automatically performed. However, for the purposes of this investigation, we also performed spoligotyping in all clustered cases, independently of the

number of IS6110 elements (34 strains). For further analysis, i.e., DNA sequence analysis of the variable region of the *pks15/1* gene, we selected all clustered and non-clustered intrafamilial cases of tuberculosis (34 strains). Furthermore, to corroborate the lineage of all clustered intrafamilial cases, we performed LPS analysis to all clustered and non-clustered intrafamilial strains (34 strains).

Results

During the 54-month study period, we detected 253 tuberculosis cases; 187 (74%) of them were culture confirmed. All isolates were typed by IS6110-based RFLP. Thirty four isolates were identified as members of 14 clusters indicative of recently transmitted disease. For five of the clusters (11 cases in all), transmission occurred among family members (Table 1, Figure 1). We performed spoligotyping in all 34 clustered cases and identified a total of 12 distinct spoligotypes (Figure 2). All members of each IS6110-based RFLP clusters had the same spoligotype, indicating a common ancestor (clonal organism). One spoligotype corresponded to type 1, characteristic of members of the Beijing family (19) and belonging to the East Asian lineage. A second cluster corresponded to the international type 19, also known as the Manila family (20). These strains are members of the Indo-Oceanic lineage, confirmed by the absence of RD239 (9).

We then performed DNA sequence analysis of the variable region of the *pks15/1* gene in the 34 clustered isolates. In 29, we found a 7-bp deletion identical to that observed in H37Rv and the majority of other non-Beijing *M. tuberculosis* strains. The *pks15/1* gene was intact in the remaining five isolates: two isolates that showed a Beijing spoligotype within an intrafamilial cluster and three more isolates that belonged to the Manila family of strains and that also belonged to an intrafamilial cluster. Sequence analysis of the *pks15/1* gene in the three remaining family clusters (six cases) showed a 7-bp deletion. As expected, in all of these 29 isolates, large sequence

Table 1. Molecular characteristics of the isolates of intrafamilial transmission

Cluster number	Isolate ID	Number of IS-6110 ^a copies in RFLP ^b	Spoligotyping pattern ^c	<i>pks15/1</i> gene polymorphic region sequence	Diagnosis	Age/ Sex	Family relationship
1	5055	16	777 777 607 760 771	7-bp deletion	Sep 1998	68/M	Father
1	5311	16	777 777 607 760 771	7-bp deletion	Dec 1999	18/M	Son
2	5411	10	577 777 777 760 771	7-bp deletion	Apr 1999	49/M	Father
2	5104	10	577 777 777 760 771	7-bp deletion	Sep 2000	20/F	Daughter
3	24774	5	777 777 777 760 771	7-bp deletion	Dec 2001	65/M	Husband
3	5501	5	777 777 777 760 771	7-bp deletion	Feb 2002	65/F	Wife
4	11408	10	677 777 477 413 771	Intact	Mar 2002	21/M	Brother
4	9114	10	677 777 477 413 771	Intact	Mar 2002	22/F	Sister
4	31874	10	677 777 477 413 771	Intact	Sep 2002	20/F	Sister
5	5322	19	000 000 000 003 771	Intact	Sep 1998	28/F	Sister
5	5208	19	000 000 000 003 771	Intact	Sep 1999	20/F	Sister

^aIS-6110, insertion sequence 6110.

^bRFLP, restriction fragment length polymorphism.

^cNumbers in the spoligotyping column correspond to the lecture of the pattern according to the octagonal code.

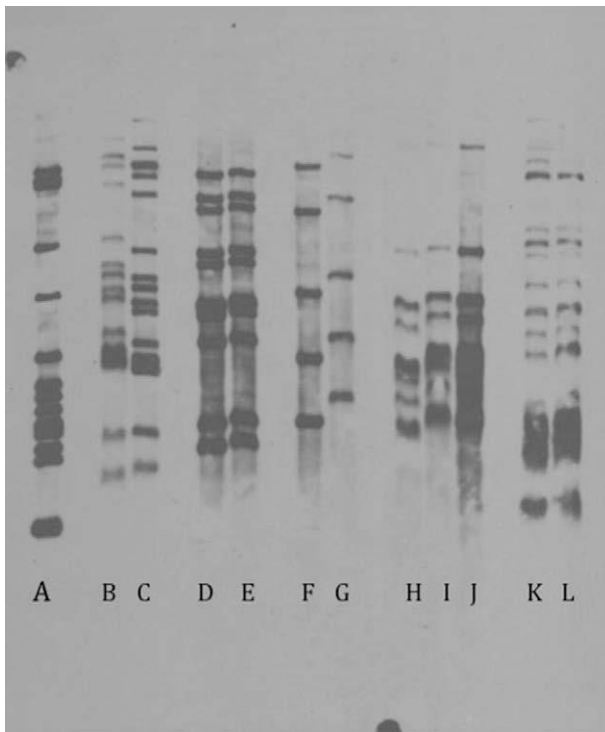


Figure 1. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) from the intrafamilial transmission isolates. Lane A: H37Rv reference strain; Lane B: isolate 5055; Lane C: isolate 5311; Lane D: isolate 5411; Lane E: isolate 5104; Lane F: 24774 isolate; Lane G: isolate 5501; Lane H: isolate 11408; Lane I: isolate 9114; Lane J: isolate 31874; Lane K: isolate 5322; Lane L: isolate 5208.

polymorphism analysis to determine their lineage showed that they belonged to the Euro-American lineage.

Discussion

This study provides the first report of a Beijing-type isolate being transmitted in Mexico. This genotype is very frequent in different regions of the world (50-80%) such as China, Vietnam, and Indonesia, whereas it is very uncommon in other populations such as in Senegal, Iran and Belarus, regions with similar social and economic characteristics. (21-23). In contrast, in the Americas the Beijing family

has been found mainly in outbreaks in prisons in the U.S. and in smaller proportions in community surveillance programs performed in Colombia (24), Argentina (25,26), and Cuba (27). The initial screening method for detection of Beijing strains is spoligotyping. This method provides an octal code that can easily be traced without intensive mathematical procedures, as described by Dale et al (28).

It has been suggested that members of the Beijing family have a particular tendency to develop drug resistance (23,29-32). One Beijing isolate identified in this study was fully drug susceptible, and the second one was only isoniazid resistant; it will be important to alert public health authorities to the presence of these strains in Mexico. In addition to the Beijing cluster, we identified a second family cluster that involved strains with an intact *pkas15/1* gene. Spoligotype and the absence of RD239 confirms that these three strains belong to the Indo-Oceanic lineage; this lineage diverged from “modern” strains before the TbD1 deletion event that pre-dated the division of modern strains into intact and disrupted *pkas15/1* lineages. It is interesting to note that Chai-prasert et al. recently described the presence of an intact *pkas15/1* gene in non-Beijing clinical isolates recovered from cerebrospinal fluid and sputum of patients in Thailand (33). The spoligotype pattern was not described for these isolates, but other authors have reported the presence of Indo-Oceanic strains in this region (9,34). Our observation and others suggest that at least some of the Indo-Oceanic lineage strains also have an intact *pkas15/1* gene.

The observation that 2/5 family clusters were caused by strains with two distinct *pkas15/1*-intact lineages supports the idea that the bacterial phenotype may influence the pattern of disease transmission, as suggested by Gagneux (9). East-Asian and Indo-Oceanic lineages are not common in Mexico. Molecular epidemiological studies of close to 3000 *M. tuberculosis* clinical isolates performed by our group in three different regions of Mexico have detected very few isolates of the East-Asian lineage (not more than 10 in total), and the question remains unanswered as to how these people could have been infected with such strains (unpublished data). Although none of our patients had a history of travel abroad, it is possible that family members temporarily migrated to the eastern region of the U.S., which is



Figure 2. Spoligotyping patterns in the intrafamilial transmission isolates. Lane A: H37Rv reference strain; Lane B: Mycobacterium bovis BCG P3; Lane C: isolate 5055; Lane D: isolate 5311; Lane E: isolate 5411; Lane F: isolate 5104; Lane G: 24774 isolate; Lane H: isolate 5501; Lane I: isolate 11408; Lane J: isolate 9114; Lane K: isolate 31874; Lane L: isolate 5322; Lane M: isolate 5208.

common among peasants living in these rural areas of the country. However, no firm conclusion could be drawn from the information given to us by these patients. The same could be said for the Indo-Oceanic lineage strains that we identified. However, the characteristic spoligotype of this lineage is also seldom found in our collection of Mexican strains. The family history of this set of strains is even more obscure. Three young siblings shared the same strain but could not identify who they may have been in contact with who had a chronic cough. Again, no history of traveling to the U.S. or any other region of our country could be found.

Other authors have suggested that specific lineages of *M. tuberculosis* have adapted to specific populations (9,34,35), and that these lineages reflect the epidemiology of tuberculosis even after migrating to other countries.

Although this is possible, the genetic background of the Mexican population is quite restricted (35), especially in this region that is mainly composed of an indigenous population (36), making it almost impossible for these particular families to have ancestors from either East Asia or from the Indian subcontinent (34). Thus, we believe that the most plausible biological explanation is that some members of these particular communities migrated to the eastern U.S. and became infected with these clones and then returned to their homes and infected their families. The presence of an intact *pks15/1* gene is not in itself evidence that PGL is actually produced by these strains, but the potential for PGL production is a common link between these two very diverse lineages. Its possible contribution to the observed pattern of family transmission and rapid progression to disease warrants further investigation.

Analysis of clustered family outbreaks of TB in a Mexican rural setting identified involvement of strains belonging to three separate lineages, two of them Asian and both characterized by the presence of an intact *pks15/1* gene. The association of unusual strain lineage and the potential contribution of PGL to TB pathogenesis warrant further investigation.

Acknowledgments

We thank Dr. Laura Ongay, Sequencing Unit Head, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico, for her collaboration with the sequencing of the segment of the variable region of the *pks15/1* gene and Marta Stefanidou for her collaboration in the *pks15/1* PCR amplification methodology.

This work was supported by grants of the following institutions: Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología, México, project No. 4987-M9406, G26264-M, and scholarships No. 96087 (MKM), No. 138547 (AGM) and No. 202924 (AGF); Fogarty International Research Center Award (NIH) PA-95-011 (PMS, APL); and the Wellcome Trust Grant Ref. 059125/Z/99/C.

References

1. WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2005. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2005.349).
2. Daley CL, Small PM, Schechter GF, Schoolnik GR, McAdam RA, Jacobs WR Jr, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med* 1992;326:231-235.
3. Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, Singh SP, Murphy MJ, Desmond E, et al. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* 1993;328:1137-1144.
4. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994;16:1703-1709.
5. Bradford WZ, Martin JN, Reingold AL, Schechter GF, Hopewell PC, Small PM. The changing epidemiology of acquired drug-resistant tuberculosis in San Francisco, U.S.A. *Lancet* 1996;348:928-931.
6. Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003;133:30-37.
7. Manabe YC, Dannenberg AM Jr, Tyagi SK, Hatem CL, Yoder M, Woolwine SC, et al. Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* cause various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis. *Infect Immun* 2003;71:6004-6011.
8. Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, et al. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 2004;431:84-87.
9. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2869-2873.
10. Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Laneelle MA, Triccas JA, Gicquel B, et al. Analysis of the phthiocerol dimycoserate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem* 2001;276:19845-19854.
11. Constant P, Perez E, Malaga W, Laneelle MA, Saurel O, Daffé M, et al. Role of the *pks15/1* gene in the biosynthesis of phenolglycolipids on the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Biol Chem* 2002;277:38148-38158.
12. Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, et al. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis* 2005;192:98-106.
13. Kato-Maeda M, Sifuentes-Osornio J, Bobadilla-del-Valle M, Ruiz-Palacios GM, Ponce-de León A. Drug resistance among acid-fast bacilli. *Lancet* 1999;353:1709.
14. Nolte FS, Metchock B. *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press; 1995. 400-437.
15. Siddiqi SH. *Bactec tuberculosis system*. Product and Procedure Manual. Towson, MD: Becton Dickinson Diagnostic Instrument System; 1989.
16. van Soolingen D, de Haas PEW, Kremer K. Isolation of high molecular weight genomic DNA from *Mycobacteria*. In: *Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria*. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands. November 2002 version.
17. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-409.
18. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-914.

19. http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html, base SPOLDB4 Accessed July 2007.
20. Douglas JT, Qian L, Montoya JC, Musser JM, van Embden JD, van Soolingen D, et al. Characterization of the Manila family of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003;41:2723-2726.
21. Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NT, van Gorkom T, Kremer K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2000;6:302-305.
22. Qian L, van Embden JD, Van Der Zanden AG, Weltevreden EF, Duanmu H, Douglas JT. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. *J Clin Microbiol* 1999;37:471-474.
23. European concerted action on new generation genetic markers and techniques for the epidemiology and control of tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 2006;12:736-743.
24. Laserson KF, Osorio L, Sheppard JD, Hernández H, Benitez AM, Brim S, et al. Clinical and programmatic mismanagement rather than community outbreak as the cause of chronic, drug-resistant tuberculosis in Buenaventura, Colombia, 1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:673-683.
25. Morcillo N, Di Giulio B, Chirico C, Kuriger A, Dolmann A, Alito A, et al. First description of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Argentina. *Rev Argen Microbiol* 2005;37:92-95.
26. Garcia de Viedma D, Chaves F, Iñigo J. New route of importation of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Emerg Infect Dis* 2006;12:169-170.
27. Diaz R, Kremer K, de Haas PE, Gomez RI, Marrero A, Valdivia JA, 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;2:743-750.
28. Dale JW, Brittain D, Cataldi A, Cousins D, Crawford JT, Driscoll J, et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendation for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:216-219.
29. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. World-wide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002;8:843-849.
30. Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, Moghazeh SL, Shopsin B, Tempalski B, et al. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* 1999;282:2321-2327.
31. Agerton TB, Valway SE, Blinkhorn RJ, Shilkret KL, Reves R, Schluter WW, et al. Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*, across the United States. *Clin Infect Dis* 1999;29:85-92.
32. Toungousova OS, Mariandyshev A, Bjune G, Sandven P, Caugant DA. Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Archangel prison in Russia: predominance of the W-Beijing clone family. *Clin Infect Dis* 2003;37:665-672.
33. Chairprasert A, Yorsangsukkamol J, Prammananan T, Palittapongpim P, Leechawengwong M, Dhiraputra C. Intact pks15/l in non-W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Emerg Infect Dis* 2006;12:772-774.
34. Flores L, Van T, Narayanan S, DeRiemer K, Kato-Maeda M, Gagneux S. Large sequence polymorphisms classify *Mycobacterium tuberculosis* strains with ancestral spoligotyping patterns. *J Clin Microbiol* 2007;45:3393-3395.
35. Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4871-4876.
36. Vargas-Alarcon G, Hernandez-Pacheco G, Zuñiga J, Rodriguez-Perez JM, Perez-Hernandez N, Rangel C, et al. Distribution of HLA-B alleles in Mexican Amerindian populations. *Immunogenetics* 2003;54:756-770.

Los conocimientos adquiridos durante la realización del doctorado me permitieron contribuir en los siguientes trabajos de investigación que han sido publicados en diferentes revistas científicas.

Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model

Brenda Marquina-Castillo,¹ Lourdes García-García,^{2*} Alfredo Ponce-de-León,^{3*} Maria-Eugenia Jimenez-Corona,² Miriam Bobadilla-del Valle,³ Bulmaro Cano-Arellano,² Sergio Canizales-Quintero,² Areli Martínez-Gamboa,³ Midori Kato-Maeda,⁴ Brian Robertson,⁵ Douglas Young,⁵ Peter Small,⁶ Gary Schoolnik,⁷ Jose Sifuentes-Osornio³ and Rogelio Hernandez-Pando¹

¹Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición, Salvador Zubiran, Mexico, ²Unidad de Tuberculosis, Instituto Nacional de Salud Publica, Mexico, ³Laboratorio de Microbiología Clínica, Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición, Salvador Zubiran, Mexico, ⁴San Francisco General Hospital, University of California, San Francisco, CA, USA, ⁵Imperial College London, South Kensington Campus, London, UK, ⁶Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA, USA, and ⁷Department of Microbiology and Immunology, Stanford University, Stanford, CA, USA

doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03004.x

Received 6 September 2008; revised 21 October 2008; accepted 27 October 2008.

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence: L. García-García, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad # 655, Col. Sta. María Ahuacatlán, C.P. 62508, Cuernavaca, Morelos, Mexico.
Email: garcigarml@gmail.com
Senior author: Rogelio Hernandez-Pando, email: rhpando@quetzal.innsz.mx

Introduction

Tuberculosis (TB) remains a major public health problem, with almost two million deaths annually, and a third of the global population latently infected. In the developed world, TB is a prototypical re-emerging infectious

Summary

After encounter with *Mycobacterium tuberculosis*, a series of non-uniform immune responses are triggered that define the course of the infection. Eight *M. tuberculosis* strains were selected from a prospective population-based study of pulmonary tuberculosis patients (1995–2003) based on relevant clinical/epidemiological patterns and tested in a well-characterized BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. In addition, a new mouse model of transmissibility consisting of prolonged cohousing (up to 60 days) of infected and naïve animals was tested. Four phenotypes were defined based on strain virulence (mouse survival, lung bacillary load and tissue damage), immunology response (cytokine expression determined by real-time polymerase chain reaction) and transmissibility (lung bacillary loads and cutaneous delayed-type hypersensitivity in naïve animals). We identified four clearly defined strain phenotypes: (1) hyper-virulent strain with non-protective immune response and highly transmissible; (2) virulent strain, associated with high expression of proinflammatory cytokines (tumour necrosis factor and interferon) and very low anti-inflammatory cytokine expression (interleukins 4 and 10), which induced accelerated death by immunopathology; (3) strain inducing efficient protective immunity with lower virulence, and (4) strain demonstrating strong and early macrophage activation (innate immunity) with delayed participation of acquired immunity (interferon expression). We were able to correlate virulent and transmissible phenotypes in the mouse model and markers of community transmission such as tuberculin reactivity among contacts, rapid progression to disease and cluster status. However, we were not able to find correlation with the other two phenotypes. Our new transmission model supported the hypothesis that among these strains increased virulence was linked to increased transmission.

Keywords: immunogenicity; immunopathology; molecular epidemiology; murine model; transmission; tuberculosis

disease, while in the developing nations TB is a devastating health problem.¹

After encounter with *Mycobacterium tuberculosis*, a series of immune responses are triggered that define the course of the infection. However, this host response is not uniform in exposed people. Indeed, the vast majority

Does DOTS work in populations with drug-resistant tuberculosis?

Kathryn DeRiemer, Lourdes Garcia-Garcia, Miriam Bobadilla-del-Valle, Manuel Palacios-Martinez, Areli Martinez-Gambao, Peter M Small, José Sifuentes-Osorio, Alfredo Ponce-de-León

Lancet 2005; 365: 1239–45

See Comment page 1206

Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine, Stanford University Medical Center, Stanford, CA, USA (K DeRiemer, PhD, P M Small, MD); Tuberculosis Unit, Instituto Nacional de Salud Pública, Avenida Universidad 655, Colonia Sta María Ahuacatlán, Cuernavaca, Mexico CP 62508, Mexico (L Garcia-Garcia, MD, M Palacios-Martinez, MD); Department of Infectious Diseases, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición "Salvador Zubirán", Mexico DF, Mexico (M Bobadilla-del-Valle, PhD, A Martínez-Gambao, MSc, J Sifuentes-Osorio, MD, A Ponce-de-León, MD); Bill and Melinda Gates Foundation, Seattle, WA, USA (P M Small); and Universidad Panamericana Medical School, Mexico DF, Mexico (A Ponce-de-León)

Correspondence to: Dr Lourdes Garcia-Garcia garcigar@correo.insp.mx

Summary

Background Directly observed therapy (DOTS) is the main strategy for prevention and control of tuberculosis worldwide. However, its effect on tuberculosis transmission in populations with moderate rates of drug-resistant disease is not known.

Methods This population-based prospective study in southern Mexico between March, 1995, and February, 2000, was based on passive case finding and detection of acid-fast bacilli in sputum samples to diagnose pulmonary tuberculosis. We also used cultures, drug-susceptibility testing, bacterial genotyping, and monitoring of treatment outcomes.

Findings We enrolled 436 patients; the HIV seroprevalence rate was 2%. We used three indicators to monitor continuing tuberculosis transmission: the incidence rate of pulmonary tuberculosis, which decreased by 54.4% between 1995 and 2000, from 42.1 to 19.2 per 10⁵ population ($p=0.00048$); the percentage of clustered pulmonary tuberculosis cases, which decreased by 62.6% from 22% to 8% ($p=0.02$); and the rate of primary drug resistance, which decreased by 84.0% from 9.4 to 1.5 per 10⁵ population ($p=0.004$). Rates of multidrug-resistant (MDR) tuberculosis also decreased ($p=0.0001$). The case-fatality ratio was 12% for MDR tuberculosis (five of 41), 7% for strains resistant to at least one drug after exclusion of MDR (four of 55), and 3% for pansusceptible strains (nine of 272). There were 13 treatment failures (11% in 1995 and one (2%) in 2000 ($p=0.012$).

Interpretation Even in settings with moderate rates of MDR tuberculosis, DOTS can rapidly reduce the transmission and incidence of both drug-susceptible and drug-resistant tuberculosis. However, further interventions, such as drug-susceptibility testing and standardised or individualised treatment regimens, are needed to reduce mortality rates for MDR tuberculosis.

Introduction

Coincident with expanded efforts to strengthen tuberculosis prevention and control programmes worldwide, there is growing concern about currently reported and potential future rates of multidrug-resistant (MDR) tuberculosis.^{1,2} Although there is consensus about the desirability of optimum treatment for all patients with tuberculosis, including those who have resistant organisms, there are few data to guide policy on how best to control and prevent the disease in areas where drug resistance is prevalent. WHO and the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease have adopted DOTS (directly observed therapy, short course) as the main strategy for programmatic tuberculosis control. DOTS consists of five main elements: political commitment; case detection by sputum microscopy; directly observed therapy of a standard short-course regimen; uninterrupted supply of all essential drugs; and a standard recording and reporting system that allows assessment of treatment results and overall programme performance. DOTS does not include specific therapy for patients with drug-resistant tuberculosis, but a surge in drug-resistant tuberculosis in several parts of the world requires effective implementation of the DOTS strategy to prevent the occurrence of new MDR tuberculosis cases and to reduce transmission of *Mycobacterium tuberculosis*.³

Since 1995, we have carried out a population-based molecular epidemiological study of tuberculosis in a health jurisdiction in southern Mexico. Although a national tuberculosis control programme was implemented in Mexico before 1996, a programme review by the WHO Global Tuberculosis Programme identified inadequate technical policies and management deficiencies.⁴ The main problems were excessive emphasis on case detection to the detriment of case holding, policy differences between the Ministry of Health and social security services, and inadequate information systems to monitor essential programme activities such as use of antituberculosis drugs and treatment outcomes. To bring the programme in line with the WHO-recommended DOTS strategy, changes were initiated in 1996 in pilot areas including the Orizaba Health Jurisdiction, to be gradually extended nationwide.⁵ There were major improvements to the five elements of the WHO DOTS strategy for tuberculosis control in Mexico, including sustained government commitment to tuberculosis control by modification and standardisation of the guidelines for the national tuberculosis control programme, standardisation of programme procedures nationwide, and training of health-care workers to implement the DOTS programme. The programme standardised

Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area

M-E Jiménez-Corona, L García-García, K DeRiemer, L Ferreyra-Reyes, M Bobadilla-del-Valle, B Cano-Arellano, S Canizales-Quintero, A Martínez-Gamboa, P M Small, J Sifuentes-Osorio, A Ponce-de-León



Thorax 2006;61:348-353. doi: 10.1136/thx.2005.049452

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to: Dr L García-García, Director of the Tuberculosis Unit, Instituto Nacional de Salud Pública, 7^a Cerrada de Fray Pedro de Cante No 50, Col. Sección XVI, Deleg Tlalpan, México, DF México; C.P. 14000; garcigar@correo.insp.mx

Received 18 July 2005
Accepted 23 January 2006
Published Online First
31 January 2006

Background: In most low income countries there are twice as many cases of tuberculosis (TB) reported among men than among women, a difference commonly attributed to biological and epidemiological characteristics as well as socioeconomic and cultural barriers in access to health care. The World Health Organization has encouraged gender specific comparisons in TB rates to determine whether women with TB are less likely than men with TB to be diagnosed, reported, and treated. A study was undertaken to identify gender based differences in patients with pulmonary TB and to use this information to improve TB control efforts.

Methods: Individuals with a cough for more than 2 weeks in southern Mexico were screened from March 1995 to April 2003. Clinical and mycobacteriological information (isolation, identification, drug susceptibility testing and IS6110 based genotyping and spoligotyping) was collected from those with bacteriologically confirmed pulmonary TB. Patients were treated in accordance with official norms and followed to ascertain treatment outcome, retreatment, and vital status.

Results: 623 patients with pulmonary TB were enrolled. The male:female incidence rate ratio for overall, reactivated, and recently transmitted disease was 1.58 (95% CI 1.34 to 1.86), 1.64 (95% CI 1.36 to 1.98), and 1.41 (95% CI 1.01 to 1.96), respectively. Men were more likely than women to default from treatment (adjusted OR 3.30, 95% CI 1.46 to 7.43), to be retreated (hazard ratio (HR) 3.15, 95% CI 1.38 to 7.22), and to die from TB (HR 2.23, 95% CI 1.25 to 3.99).

Conclusions: Higher rates of transmitted and reactivated disease and poorer treatment outcomes among men are indicators of gender differentials in the diagnosis and treatment of pulmonary TB, and suggest specific strategies in endemic settings.

Tuberculosis (TB) is the leading cause of death from an infectious disease in women worldwide.¹ In most low income countries twice as many cases of TB are reported among men than among women,² a difference commonly attributed to biological and epidemiological characteristics³⁻⁵ as well as socioeconomic and cultural barriers in access to health care.⁶ The World Health Organization (WHO) has encouraged gender specific comparisons in TB rates to determine whether women with TB are less likely than men with TB to be diagnosed, reported, and treated.⁷

We have been conducting a population based prospective study of pulmonary TB in southern Mexico since 1995. According to the 2000 census, women have less literacy, fewer years of formal education, and higher rates of unemployment in the study area. These indicators are comparable to the state and nationwide rates.⁸ Individuals who report a cough (>2 weeks) are detected and screened and, if they are diagnosed with TB, they are referred to an appropriate healthcare provider for treatment. In this study we sought to determine whether there were gender differences in the incidence rates of bacteriologically proven pulmonary TB, the percentage of pulmonary TB cases due to recent transmission versus reactivation of latent infection, and the treatment outcomes of patients with bacteriologically proven pulmonary TB.

METHODS

Study population and enrolment

The study site and enrolment procedures have been described previously.⁷ Briefly, the study area includes 12 municipalities

in the Orizaba Health Jurisdiction in Veracruz State, Mexico. The study area is 618.11 km² and has 369 235 inhabitants, 14.9% of them in rural communities.⁹ The incidence rate of

TB in the state of Veracruz during 2000 (28.0 cases per 100 000 population) was higher than the incidence rate nationwide (15.9 cases per 100 000 population).¹⁰ We performed passive case finding supported by community based health workers and screened persons who reported coughing for more than 15 days. Collaboration was established with local health and political authorities for recruitment of participants. The register of TB patients was reviewed periodically to identify patients with pulmonary TB who might have been missed by recruiters.

Between March 1995 and April 2003, patients with acid fast bacilli (AFB) or Mycobacterium tuberculosis in sputum samples were evaluated using a standardised questionnaire, physical examination, chest radiography, and HIV testing to determine their epidemiological, clinical, and mycobacteriological characteristics. Treatment was provided using the official norms of Mexico's national TB control program.¹¹ Annual follow up was performed to ascertain treatment outcome and vital status, as previously described.¹¹ Deaths were attributed to TB based on two of the following: death certificate with TB as the main cause of death; interview with a close caregiver who identified TB as a probable cause of death; or bacteriologically confirmed TB at the time of death.¹²

Agradecimientos:

Agradecemos a Lorena Chávez, José Luis Santillán, Simón Guzmán y al Dr. Jorge Ramírez, de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología celular de la UNAM por el proceso y lectura de los microarreglos.

Agradecemos a la Dra. Marta Stefanidou por su colaboración en la metodología de la amplificación por PCR de la región variable del gen *pks15/1*.

Agradecemos a la Dra. Laura Ongay, Unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología celular de la UNAM, y a la Q.F.B. Julia Martínez López del departamento de Infectología del INCMNSZ por su colaboración con la secuenciación de los segmentos de la región variable del gen *pks15/1*.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de las siguientes instituciones: CONACYT, México, proyecto No. 4987-M9406, G26264-M, y las becas No. 96087 (MKM), No. 138547 (AGM) y No. 202924 (AGF); FIRCA Award (NIH) PA-95-011 (PMS, APL); y el Wellcome Trust Grant Ref 059125/Z/99/C

Referencias:

1. Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee OY, Gernaey AM, Galili E, Eshed V, Greenblatt CL, Lemma E, Bar-Gal GK, Spigelman M. Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. PLoS One. 2008;3:e3426.
2. Hass F, Haas SS. The Origins of Mycobacterium tuberculosis and the notion of its contagiousness. En William N. Rom, Stuart Garay (eds), Tuberculosis. Primera edición. United States of America. Little, Brown and Company (Inc). 1996, pag. 3-7.
3. Hass F, Haas SS. The Origins of Mycobacterium tuberculosis and the notion of its contagiousness. En William N. Rom, Stuart Garay (eds), Tuberculosis. Primera edición. United States of America. Little, Brown and Company (Inc). 1996, pag. 12.
4. Gaby E. Pfyffer. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. En Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. (eds), Manual of Clinical Microbiology. 9th edición. Washington, D.C. American Society of Microbiology Press. 2007, pag. 543-544.
5. Amadio A, Romano MI, Bigi F, Etchehoury I, Kubica T, Niemann S, Cataldi A, Caimi K. Identification and characterization of genomic variations between Mycobacterium bovis and M. tuberculosis H37Rv. J Clin Microbiol 2005;43:2481-2484.
6. Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. Mol Microbiol 1999;32:643-655.
7. Pfyffer GE. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. En Murray PR., Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. (eds) Manual of Clinical Microbiology. 9th edición. Washington, D.C. ASM Press. 2007, pag. 543-544
8. WHO. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2009.426).

9. Willy F. Piessens, Edward A. Nardell. En Pathogenesis of tuberculosis. Lee B. Reichman, Earl S. Hershfield (eds). Tuberculosis a comprehensive international approach. Second edition, revised and expanded. New York, NY. Marcel Dekker, Inc. 2000. Pag 241-255.
10. Comstock GW. Frost revisited: the modern epidemiology of tuberculosis. *Am J Epidemiol* 1975;101:363-382.
11. Gustafson P, Lisse I, Gomes V, Vieira CS, Lienhardt C, Naclér A, Jensen H, Aaby P. Risk factor for positive tuberculin skin test in Guinea-Bissau. *Epidemiology* 2007;18:340-347.
12. Podewils LJ, Holtz T, Riekstina V, Skripconoka V, Zarovska E, Kirvelaite G, Kreigere E, Leimane V. Impact of malnutrition on clinical presentation, clinical course, and mortality in MDR-TB patients. *Epidemiol Infect.* 2010;30:1-8.
13. Talat N, Perry S, Parsonnet J, Dawood G, Hussain R. Vitamin d deficiency and tuberculosis progression. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:853-855
14. Fiske CT, Hamilton CD, Stout JE. Alcohol use and clinical manifestations of tuberculosis. *J Infect.* 2008;57:385-391.
15. Inghammar M, Ekblom A, Engström G, Ljungberg B, Romanus V, Löfdahl CG, Egesten A. COPD and the risk of tuberculosis--a population-based cohort study. *PLoS One.* 2010;5:e10138.
16. Lopez de Castilla D, Schluger NW. Tuberculosis following solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2010;12:106-112.
17. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 2003;163:1009-1021.
18. Wilkinson RJ, Llewyn M, Toosi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, Wright D, Latif M, Davidson RN. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 2000;355:618-621.
19. Malik AN, Godfrey-Faussett P. Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. *Lancet Infect Dis* 2005;5:174-183.

20. Bishai WR, Dannenberg AM Jr, Parrish N, Ruiz R, Chen P, Zook BC, Johnson W, Boles JW, Pitt ML. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* CDC 1551 and H37Rv in rabbits evaluated by Lurie's pulmonary tubercle count method. *Infect. Immun* 1999;67:4931-4934.
21. Manca C, Tsenova L, Barry CE 3rd, Bergtold A, Freeman S, Haslett PA, Musser JM, Freedman VH, Kaplan G. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J. Immunol* 1999;162:6740-6746.
22. Friedman CR, Quinn GC, Kreiswirth BN, Perlman DC, Salomon N, Schluger N, Lutfey M, Berger J, Poltoratskaia N, Riley LW. Widespread dissemination of a drug-susceptible strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis* 1997;176:478-484.
23. Haas DW, Milton S, Kreiswirth BN, Brinsko VL, Bifani PJ, Schaffner W. Nosocomial transmission of a drug-sensitive W-variant *Mycobacterium tuberculosis* strain among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Tennessee. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19:635-639.
24. Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NT, van Gorkom T, Kremer K, van Soolingen D. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2000;6:302-305.
25. Qian L, Van Embden JD, Van Der Zanden AG, Weltevreden EF, Duanmu H, Douglas JT. Retrospective analysis of the Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* in preserved lung tissues. *J Clin Microbiol* 1999;37:471-474.
26. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden JD. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995;33:3234-3238.
27. Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, Moghazeh SL, Shopsis B, Tempalski B, Driscoll J, Frothingham R, Musser JM, Alcabes P, Kreiswirth BN. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* 1999;282:2321-2327.

28. Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE 3rd. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 2004;431:84-87.
29. Manca C, Reed MB, Freeman S, Mathema B, Kreiswirth B, Barry CE 3rd, Kaplan G. Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect Immun* 2004;72:5511-5514.
30. Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE 3rd, Freedman VH, Kaplan G. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- α / β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5752-5757.
31. Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, Barry C, Kaplan G. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25:694-701.
32. López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando R, Huygen K, van Soolingen D. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003;133:30-37.
33. Manabe YC, Dannenberg AM Jr, Tyagi SK, Hatem CL, Yoder M, Woolwine SC, Zook BC, Pitt ML, Bishai WR. Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* cause various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis. *Infect Immun* 2003;71:6004-6011.
34. Theus SA, Cave MD, Eisenach KD. Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *J Infect Dis* 2005;191:453-460.
35. Garcia de Viedma D, Lorenzo G, Cardona PJ, Rodriguez NA, Gordillo S, Serrano MJ, Bouza E. Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrapulmonary infection. *J. infect Dis* 2005;192:2059-2065.

36. Marquina-Castillo B, García-García L, Ponce-de-León A, Jimenez-Corona ME, Bobadilla-Del Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martinez-Gamboa A, Kato-Maeda M, Robertson B, Young D, Small P, Schoolnik G, Sifuentes-Osornio J, Hernandez-Pando R. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology* 2009;128:123-133.
37. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2003;83:91-97.
38. Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun.* 1991;59:1755-1761.
39. Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science.* 1997;276:1420-1422.
40. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell.* 2000;103:511-524.
41. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK: Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996;178:1274-1282.
42. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, Marks CB, Padiyar J, Goulding C, Gingery M, Eisenberg D, Russell RG, Derrick SC, Collins FM, Morris SL, King CH, Jacobs WR Jr: The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12420-12425.
43. Ganguly N, Giang PH, Basu SK, Mir FA, Siddiqui I, Sharma P: *Mycobacterium tuberculosis* 6-kDa early secreted antigenic target (ESAT-6) protein downregulates lipopolysaccharide induced *c-myc* expression by modulating the extracellular signal regulated kinases 1/2. *BMC Immunology* 2007;8:24.

44. Songer JG. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* 1997;5:156-161.
45. Raynaud C, Guilhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, Manganelli R, Smith I, Gicquel B, Jackson M. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2002;45:203-217.
46. Bakala N'goma JC, Schué M, Carrière F, Geerlof A, Canaan S. Evidence for the cytotoxic effects of *Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C towards macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801:1305-1313.
47. Rodriguez GM, Smith I. Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. *Mol Microbiol*. 2003;47:1485-1494.
48. Rodriguez GM, Smith I. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 2006;188:424-430.
49. Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, Laval F, Daffe M, Smith I. The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol*. 2006;60:312-330.
50. McKinney JD, Höner zu Bentrop K, Muñoz-Elías EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr, Russell DG. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*. 2000;406:735-738.
51. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-544.

52. Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, Liao R, Harrell MI, Schoolnik GK. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha -crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:7534-7539.
53. Boon C, Dick T. *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. *J Bacteriol*. 2002;184:6760-6767.
54. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94:9869-9874.
55. Musser JM, Amin A, Ramaswamy S. Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. *Genetics*. 2000;155:7-16.
56. Kapur V, Whittam TS, Musser JM. Is *M. tuberculosis* 15,000 years old? *Journal Infectious Diseases*. 1994;170:1348-1349.
57. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol*. 1993;31:1987-1995.
58. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cell Probes*. 1991;5:73-80.
59. van Soolingen D, and Hermans PW. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. *Eur. Respir. J* 1995;8:649-656.
60. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-409.
61. Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun* 1991;59:2695-2705.

62. Yuen LK, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J. Clin. Microbiol* 1993;31:1615–1618.
63. Ross BC, Raios K, Jackson K, Dwyer B. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 1992;30:942-946.
64. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999;284:1520-1523.
65. Jiménez-Corona ME, García-García L, León AP, Bobadilla-del Valle M, Torres M, Canizales-Quintero S, Palacios-Merino C, Molina-Hernández S, Martínez-Gamboa RA, Juárez-Sandino L, Cano-Arellano B, Ferreyra-Reyes L, Cruz-Hervert LP, Báez-Saldaña R, Ferreira-Guerrero E, Sada E, Marquina B, Sifuentes-Osornio J. Research on conventional and molecular epidemiology of tuberculosis in Orizaba, Veracruz, 1995-2008. *Salud Publica Mex.* 2009;51:S470-S478
66. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon H, Drenkow J, Smittipat N, Small PM. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* 2001;11:547-554. Erratum in: *Genome Res* 2001;11:1796.
67. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, Goguet de la Salmoniere YO, Aman K, Kato-Maeda M, Small PM. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:4865-4870.
68. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad. Sci U S A* 2006;103:2869-2873.
69. Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, Goguet de la Salmoniere YO, Kreiswirth BN, Van Soolingen D, Small PM. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2005;43:3185-3191.

70. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:3684-3689.
71. Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes N, Vincent V, Glaser P, Cole ST, Brosch R. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2004;150:483-496.
72. Mostowy S, Onipede A, Gagneux S, Niemann S, Kremer K, Desmond EP, Kato-Maeda M, Behr M. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol* 2004;42:3594-3599.
73. Saxena P, Yadav G, Mohanty D, Gokhale RS. A new family of type III polyketide synthases in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2003;278:44780-44790.
74. Constant P, Perez E, Malaga W, Lan elle MA, Saurel O, Daff  M, Guilhot C. Role of the *pks15/1* gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated *p*-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the *pks15/1* gene. *J Biol Chem* 2002;277:38148-38158.
75. Cardona PJ, Juli n E, Vall s X, Gordillo S, Mu oz M, Luquin M, Ausina V. Production of antibodies against glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall in aerosol murine models of tuberculosis. *Scand J Immunol* 2002;55:639-645.
76. Dubey VS, Sirakova TD, Kolattukudy PE. Disruption of *msl3* abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation. *Mol Microbiol* 2002;45:1451-1459.
77. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous

88. Cattamanchi A, Hopewell PC, Gonzalez LC, Osmond DH, Masae Kawamura L, Daley CL, Jasmer RM. A 13-year molecular epidemiological analysis of tuberculosis in San Francisco. *San Francisco Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:297-304.
89. Driver CR, Kreiswirth B, Macaraig M, Clark C, Munsiff SS, Driscoll J, Zhao B. Molecular epidemiology of tuberculosis after declining incidence, New York City, 2001-2003. *Epidemiol Infect* 2007;135:634-643.
90. Hayward AC, Goss S, Drobniewski F, Saunders N, Shaw RJ, Goyal M, Swan A, Uttley A, Pozniak A, Grace-Parker J, Watson JM. The molecular epidemiology of tuberculosis in inner London. *Epidemiol Infect* 2002;128:175-184.
91. Kurepina NE, Kreiswirth BN, Shaskina E, Driscoll JR, Polanecký V, Kozáková B, Mezenský L, Kubín M. Molecular epidemiology of tuberculosis in Prague and South Moravia, Czech Republic: genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by IS6110-RFLP fingerprinting and spoligotyping. *Cent Eur J Public Health* 2004;12:141-150.
92. Durmaz R, Zozio T, Gunal S, Allix C, Fauville-Dufaux M, Rastogi N. Population-based molecular epidemiological study of tuberculosis in Malatya, Turkey. *J Clin Microbiol* 2007;45:4027-4035.
93. Affolabi D, Anyo G, Faïhun F, Sanoussi N, Shamputa IC, Rigouts L, Kestens L, Anagonou S, Portaels F. First molecular epidemiological study of tuberculosis in Benin. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:317-322.
94. Asiimwe BB, Joloba ML, Ghebremichael S, Koivula T, Kateete DP, Katabazi FA, Pennhag A, Petersson R, Kallenius G. DNA restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-seropositive and HIV-seronegative patients in Kampala, Uganda. *BMC Infect Dis* 2009;9:12.
95. Middelkoop K, Bekker LG, Mathema B, Shashkina E, Kurepina N, Whitelaw A, Fallows D, Morrow C, Kreiswirth B, Kaplan G, Wood R. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in a South African community with high HIV prevalence. *J Infect Dis* 2009;200:1207-1211

96. Smithtikarn S, Akarasewi P, Chaiprasert A, Palittapongarnpim P. Restriction fragment length polymorphism study of nationwide samples of *Mycobacterium tuberculosis* in Thailand, 1997-1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:576-81
97. Chan-Yeung M, Kam KM, Leung CC, Wang J, Yew WW, Lam CW, Tam CM. Population-based prospective molecular and conventional epidemiological study of tuberculosis in Hong Kong. *Respirology*. 2006;11:442-448.
98. Narayanan S, Das S, Garg R, Hari L, Rao VB, Frieden TR, Narayanan PR. Molecular epidemiology of tuberculosis in a rural area of high prevalence in South India: implications for disease control and prevention. *J Clin Microbiol* 2002;40:4785-4788.
99. Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, Varnerot A, Zarifi AZ, Tabatabaee J, Douraghei M, Ghazisaeedi K, Mansorri D, Bahadori M, Vincent V, Gutierrez C, Velayati AA. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods. *J Infect* 2004;49:94-101.
100. Morcillo N, Zumarraga M, Imperiale B, Di Giulio B, Chirico C, Kuriger A, Alito A, Kremer K, Cataldi A. Tuberculosis transmission of predominant genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in northern suburbs of Buenos Aires city region. *Rev Argent Microbiol* 2007;39:145-150.
101. Valim AR, Possuelo LG, Cafrune PI, Borges M, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A. Evaluation and genotyping of multidrug-resistant cases of tuberculosis in southern Brazil. *Microb Drug Resist* 2006;12:186-191.
102. Laserson KF, Osorio L, Sheppard JD, Hernández H, Benitez AM, Brim S, Woodley CL, Hazbón MH, Villegas MV, Castaño MC, Henriquez N, Rodriguez E, Metchock B, Binkin NJ. Clinical and programmatic mismanagement rather than community outbreak as the cause of chronic, drug-resistant tuberculosis in Buenaventura, Colombia, 1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:673-683.
103. Diaz R, Kremer K, de Haas PE, Gomez RI, Marrero A, Valdivia JA, van Embden JD, van Soolingen D. 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;2:743-

104. Maes M, Kremer K, van Soolingen D, Takiff H, de Waard JH. 24-locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. *Tuberculosis* 2008;88:490-494.
105. García-García ML, Ponce de León A, Jiménez-Corona ME, Jiménez-Corona A, Palacios-Martínez M, Balandrano-Campos S, Ferreyra-Reyes L, Juárez-Sandino L, Sifuentes-Osornio J, Olivera-Díaz H, Valdespino-Gómez JL, Small PM. Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. *Arch Intern Med* 2000;160:630-636.
106. Yang ZH, Rendon A, Flores A, Medina R, Ijaz K, Llaca J, Eisenach KD, Bates JH, Villarreal A, Cave MD. A Clinic-based molecular epidemiologic study of tuberculosis in Monterrey, Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:313-320.
107. Jiménez-Corona ME, García-García L, DeRiemer K, Ferreyra-Reyes L, Bobadilla-del-Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martínez-Gamboa A, Small PM, Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-León A. Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax* 2006;61:348-353.
108. Borrell S, Español M, Orcau A, Tudó G, March F, Caylà JA, Jansà JM, Alcaide F, Martín-Casabona N, Salvadó M, Martínez JA, Vidal R, Sánchez F, Altet N, Coll P, González-Martín J. Factors associated with differences between conventional contact tracing and molecular epidemiology in study of tuberculosis transmission and analysis in the city of Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol* 2009;47:198-204.
109. van Deutekom H, Gerritsen JJ, van Soolingen D, van Ameijden EJ, van Embden JD, and Coutinho RA. A molecular epidemiological approach to studying the transmission of tuberculosis in Amsterdam. *Clin. Infect. Dis* 1997;25:1071–1077.
110. van Deutekom, H., S. P. Hoijng, P. E. de Haas, M. W. Langendam, A. Horsman, D. van Soolingen, and R. A. Coutinho. Clustered tuberculosis cases: do they represent recent transmission and can they be detected earlier? *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2004;169:806–810.

111. García-García M, Palacios-Martínez M, Ponce-de-León A, Jiménez-Corona ME, Jiménez-Corona A, Balandrano-Campos S, Olivera-Díaz H, Valdespino-Gómez JL, Small PM. The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:12-17.
112. Hallazgo de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* del genotipo Beijing en México". Martínez Gamboa A*, Bobadilla Del Valle M, Kato Maeda M, Chávez Mazari B, García García ML, Molina Hernández S, Ponce de León A, Sifuentes Osornio J. XXX Congreso de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, X Congreso de la Asociación Mexicana para el estudio de las Infecciones Nosocomiales, XII Congreso Nacional de Antibióticos y Quimioterapia. Mérida, Yucatán. México, 6-9 de Julio de 2005.
113. Chan MY, Borgdorff M, Yip CW, de Haas PE, Wong WS, Kam KM, Van Soolingen D. Seventy percent of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype. *Epidemiol Infect* 2001;127:169-171.
114. Escalante P, Ramaswamy S, Sanabria H, Soini H, Pan X, Valiente-Castillo O, Musser JM. Genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Peru. *Tuber Lung Dis* 1998;79:111-118.
115. Ritacco V, López B, Cafrune PI, Ferrazoli L, Suffys PN, Candia N, Vásquez L, Realpe T, Fernández J, Lima KV, Zurita J, Robledo J, Rossetti ML, Kritski AL, Telles MA, Palomino JC, Heersma H, van Soolingen D, Kremer K, Barrera L. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:489-492.
116. http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html, base SPOLDB4 accessed on July, 2007.
117. Molina-Torres CA, Moreno-Torres E, Ocampo-Candiani J, Rendon A, Blackwood K, Kremer K, Rastogi N, Welsh O, Vera-Cabrera L. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *J Clin Microbiol* 2010;48:448-
118. Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, Mathema B, Barry CE 3rd, Kaplan G. Virulence of selected *Mycobacterium*

- tuberculosis clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Dis* 2005;192:98-106.
119. Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE 3rd. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 2004;431:84-87.
 120. Flores L, Van T, Narayanan S, DeRiemer K, Kato-Maeda M, Gagneux S. Large sequence polymorphisms classify *Mycobacterium tuberculosis* strains with ancestral spoligotyping patterns. *J Clin Microbiol* 2007;45:3393-3395.
 121. Chaiprasert A, Yorsangsukkamol J, Prammananan T, Palittapongarnpim P, Leechawengwong M, Dhiraputra C. Intact pks15/1 in non-W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Emerg Infect Dis* 2006;12:772-774.
 122. Kremer K, van-der-Werf MJ, Au BK, Anh DD, Kam KM, van-Doorn HR, Borgdorff MW, van-Soolingen D. Vaccine-induced immunity circumvented by typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains. *Emerg Infect Dis* 2009;15:335-339.
 123. Reed MB, Gagneux S, Deriemer K, Small PM, Barry CE 3rd. The W-Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated. *J Bacteriol* 2007;189:2583-2589.
 124. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996;178:1274-1282.
 125. Bibb LA, Hatfull GF. Integration and excision of the *Mycobacterium tuberculosis* prophage-like element, phiRv1. *Mol Microbiol* 2002;45:1515-1526.
 126. Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, Bardarov S, Kriakov J, Alavi M, Jacobs WR Jr. Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun* 2001;69:7326-7333.
 127. Banu S, Honoré N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prévost MC, Cole ST. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol Microbiol* 2002;44:9-19.

128. Abdallah AM, Verboom T, Hannes F, Safi M, Strong M, Eisenberg D, Musters RJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk BJ, Luirink J, Bitter W. A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol* 2006;62:667-679.
129. Li Y, Miltner E, Wu M, Petrofsky M, Bermudez LE. A *Mycobacterium avium* PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice. *Cell Microbiol.* 2005;7:539-548.
130. Choudhary RK, Mukhopadhyay S, Chakhaiyar P, Sharma N, Murthy KJ, Katoch VM, Hasnain SE. PPE antigen Rv2430c of *Mycobacterium tuberculosis* induces a strong B-cell response. *Infect Immun* 2003;71:6338-6343.
131. Talarico S, Durmaz R, Yang Z. Insertion- and deletion-associated genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C-encoding genes among 106 clinical isolates from Turkey. *J Clin Microbiol* 2005;43:533-538.
132. Lipsitch M. Bacterial vaccines and serotype replacement: lessons from *Haemophilus influenzae* and prospects for *Streptococcus pneumoniae*. *Emerg Infect Dis* 1999;5:336-345.
133. Gandon S, Mackinnon MJ, Nee S, Read AF. Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature* 2001;414:751-756.
134. Maiden MC, Spratt BG. Meningococcal conjugate vaccines: new opportunities and new challenges. *Lancet* 1999;354:615-616.
135. Gagneux SP, Hodgson A, Smith TA, Wirth T, Ehrhard I, Morelli G, Genton B, Binka FN, Achtman M, Pluschke G. Prospective study of a serogroup X *Neisseria meningitidis* outbreak in northern Ghana. *J Infect Dis* 2002;185:618-626.
136. Nicolas P, Djibo S, Moussa A, Tenebray B, Boisier P, Chanteau S. Molecular epidemiology of meningococci isolated in Niger in 2003 shows serogroup A sequence type (ST)-7 and serogroup W135 ST-11 or ST-2881 strains. *J Clin Microbiol* 2005;43:1437-1438.
137. Elomaa A, Advani A, Donnelly D, Antila M, Mertsola J, Hallander H, He Q. Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years. *J Clin Microbiol*

2005;43:3681-3687.

138. Van Loo IH, Mooi FR. Changes in the Dutch *Bordetella pertussis* population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines. *Microbiology* 2002;148:2011-2018.
139. Aagaard C, Brock I, Olsen A, Ottenhoff TH, Weldingh K, Andersen P. Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654: two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis* 2004;189:812-819.
140. Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4871-4876.
141. de Jong BC, Hill PC, Brookes RH, Gagneux S, Jeffries DJ, Otu JK, Donkor SA, Fox A, McAdam KP, Small PM, Adegbola RA. *Mycobacterium africanum* elicits an attenuated T cell response to early secreted antigenic target, 6 kDa, in patients with tuberculosis and their household contacts. *J Infect Dis* 2006;193:1279-1286.
142. Doherty TM, Andersen P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:687-702.
143. Pai M, Riley LW, Colford JM Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004;4:761-776.
144. Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, Shi W, Zhang L, Wang H, Wang S, Zhao G, Zhang Y. Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One*. 2008;3:e2375.
145. Domenech P, Kolly GS, Leon-Solis L, Fallow A, Reed MB. Massive gene duplication event among clinical isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* W/Beijing family. *J Bacteriol*. 2010;192:4562-4570.