



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *M. tuberculosis*
MDR UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MIRU-VNTR OBTENIDOS EN LA
ENCUESTA NACIONAL DE FARMACORRESISTENCIA EN
TUBERCULOSIS EN MÉXICO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LUNA BERNAL ALMA ISABEL

ASESORES

Dr. JOSÉ ARMANDO MARTÍNEZ GUARNEROS
M. en C. CARLOS ARTURO VÁZQUEZ CHACÓN
Dr. SALVADOR FONSECA CORONADO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**



Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

Caracterización molecular de aislados de M. tuberculosis MDR utilizando la técnica de MIRU-VNTR obtenidos en la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en Tuberculosis en México

Que presenta la pasante: **Alma Isabel Luna Bernal**

Con número de cuenta: **30311784-9** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Junio de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
VOCAL	QFB. Ladislao Palomar Morales	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er SUPLENTE	QFB. Dulce María Ruvalcaba Sil	
2do SUPLENTE	MVZ. Socorro Sandra Martínez Robles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Micobacterias del Departamento de Bacteriología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), en colaboración con el Laboratorio de Inmunobiología de Enfermedades Infecciosas de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Para la realización de la tesis se contó con el apoyo del proyecto CONACyT: SALUD-2010-C01-139760 Caracterización molecular de asilados de *Mycobacterium tuberculosis* multifarmacorresistentes (MDR) obtenidos durante la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia.

DEDICATORIAS

Dedico este proyecto de tesis a Dios y a mi familia.

*A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome
y dándome fortaleza para continuar.*

*A mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi
bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento.*

*A mis hermanos quienes me ofrecen su comprensión y ayuda
siempre.*

*A esta hermosa familia porque creyeron en mí y han depositando su
entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar en mí
ni un solo momento.*

Es por ellos que soy lo que soy ahora.

Los amo con mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a mis padres y hermanos, quienes me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Gracias a ustedes que han compartido mis desvelos, mis triunfos, mis alegrías y mis tristezas; es por eso que hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, el orgullo que sienten por mí fue lo que me hizo ir hasta el final.

Agradezco a la vida por otorgarme una gran mi familia que pese a todos esos obstáculos que nos ha puesto, juntos los hemos superado y hemos salir adelante, deseo de todo corazón que siempre estemos unidos en los buenos y malos momentos.

A mis asesores por su tiempo, paciencia, apoyo, consejos y dedicación a lo largo de la realización de este trabajo, pero sobre todo por permitirme conocerlos como personas y formar parte de este proyecto.

En fin, son muchas las personas a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, confianza y compañía en las diferentes etapas de mi vida; algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y mi corazón, a todos ustedes gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Sé que mil palabras no bastaran para agradecer; a todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valiosa, sincera e incondicional compañía.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Etiología y Patología de la TB	1
1.2. Epidemiología de la TB	3
1.3. Tratamientos en aislados de <i>M. tuberculosis</i>	6
1.4. Farmacorresistencia en aislados de <i>M. tuberculosis</i>	7
1.5. Mecanismos de acción y resistencia a Isoniazida	8
1.6. Mecanismos de acción y resistencia a Rifampicina	10
1.7. Métodos de diagnóstico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
1.7.1. Baciloscopía	11
1.7.2. Cultivo	12
1.7.3. Diagnóstico molecular de TB	13
1.7.3.1. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	13
1.7.3.2. Espoligotipificación	14
1.7.3.3. Genotipificación molecular por MIRU-VNTR	15
2. ANTECEDENTES	18
2.1. Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en Tuberculosis	18
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1. General	23
5.2. Particulares	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1. Extracción ADN genómico	25

6.2. Determinación de la mutación que confiere resistencia a isoniazida en aislados <i>M. tuberculosis</i> multifarmacorresistentes	26
6.3. Determinación de la mutación que confiere resistencia a rifampicina en aislados <i>M. tuberculosis</i> multifarmacorresistentes	27
6.4. Caracterización de aislados de <i>M. tuberculosis</i> por la amplificación de MIRU-VNTR	28
7. RESULTADOS	32
7.1. Datos epidemiológicos de los aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	32
7.2. Determinación de la mutación que le otorga resistencia a rifampicina <i>M. tuberculosis</i> .	36
7.3. Determinación de la mutación que le otorga resistencia a isoniazida en <i>M. tuberculosis</i>	39
7.4. Genotipificación mediante MIRU-VNTR	42
7.5. Agrupación en linajes de aislados de <i>M. tuberculosis</i> MDR por MIRU-VNTR	46
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	60
10. BIBLIOGRAFÍA	62
11. URLs	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Tuberculosis en todas sus formas y enfermedades asociadas, México 2011	4
2	Incidencia por Tuberculosis pulmonar, México 2012	5
3	Pirámide de tratamiento	6
4	Mecanismo de acción de INH	9
5	Posición de los 41 MIRUs en el cromosoma de <i>M. tuberculosis</i>	15
6	Selección de muestras de <i>M. tuberculosis</i> MDR en la ENFR 2008	18
7	Localización de los asilados <i>M. tuberculosis</i> MDR en la República Mexicana	20
8	Algoritmo general de trabajo	24
9	Distribución de <i>M. tuberculosis</i> farmacorresistente por grupos de edad	33
10	Distribución de los aislados de <i>M. tuberculosis</i> MDR por género de los pacientes	34
11	Distribución de aislados de <i>M. tuberculosis</i> por resistencia a SIREZ	34
12	Electroferograma representativo de la PCR-ARMS para el codón 516 del gen <i>rpoβ</i> .	36
13	Electroferograma representativo de la PCR-ARMS para el codón 526 del gen <i>rpoβ</i>	37
14	Electroferograma representativo de la PCR-ARMS para el codón 531 del gen <i>rpoβ</i>	37
15	Frecuencia de mutaciones en distintos codones del gen <i>rpoβ</i> utilizando una técnica de PCR alelo específica para detectar mutaciones	38

16	Frecuencia de mutaciones del gen <i>rpoβ</i> determinadas utilizando la PCR-ARMS	39
17	Electroferograma representativo de la PCR <i>multiplex</i> para los genes <i>katG</i> y el operón <i>mabA–inhA</i> en aislados de <i>M. tuberculosis</i> MDR	40
18	Frecuencia de mutaciones en gen <i>katG</i> y en el operón <i>mabA–inhA</i> , que confiere resistencia a INH en aislados de <i>M. tuberculosis</i> .	40
19	Electroferograma del gen <i>katG</i> digerido con la enzima <i>MspI</i>	41
20	Frecuencia de las mutaciones representativas que confieren resistencia a INH a cepas de <i>M. tuberculosis</i> MDR.	42
21	Electroferogramas de MIRUs representativos de las diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> MDR seleccionados en la ENFR.	43
22	Análisis genotípico de aislados MDR de <i>M. tuberculosis</i> con el programa MIRU-VNTR <i>plus</i> .	45
23	Aislados <i>M. tuberculosis</i> MDR identificados utilizando MIRU-VNTR <i>plus</i>	46
24	Frecuencia de los linajes de <i>M. tuberculosis</i> MDR	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Secuencias de iniciadores utilizados en la PCR <i>multiplex</i>	26
2	Secuencias de iniciadores utilizados en la PCR-ARMS	27
3	Secuencia de los iniciadores específicos de los MIRUs con mayor polimorfismo de <i>M. tuberculosis</i>	29
4	Mezcla de los componentes de la PCR para la amplificación de MIRU-VNTR de <i>M. tuberculosis</i>	30
5	Asignación del código numérico de acuerdo al número de copias encontradas en cada locus de <i>M. tuberculosis</i>	31
6	Distribución de los aislados de <i>M. tuberculosis</i> farmacorresistentes seleccionados	32
7	Patrón de resistencia a fármacos en aislados de <i>M. tuberculosis</i>	35
8	MIRU-VNTR de los 45 aislados <i>M. tuberculosis</i> MDR	44
9	Relación Linaje-Género	48
10	Relación Linaje-Grupo de edad	48
11	Relación Linaje-Patrón de Resistencia	49
12	Variabilidad de linajes en los estados seleccionados en la ENFR	50

ABREVIATURAS

A	Adenina
a. C.	Antes de Cristo
AAR	Ácido-alcohol resistencia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ARN	Ácido Ribonucleico
BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
BK	Bacilo de Koch
C	Citosina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CO₂	Dióxido de carbono
CTBA	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
DGE	Dirección General de Epidemiología
DOTS	Directly Observed Treatment, Short-Course
DR	Repeticiones Directas
E	Etambutol
EDTA	Ácido etilendiaminotetrácetico
ENTB	Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en Tuberculosis
FR	Farmacorresistente
G	Guanina
H	Histidina
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
INH	Isoniazida
L	Lisina
M	Molar
MDR	Multifarmacorresistente

MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MIRUs	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
mM	Milimolar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloruro de Sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso Molecular
R	Arginina
RFLP	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
RIF	Rifampicina
S	Serina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
T	Timina
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
TB	Tuberculosis
TBP	Tuberculosis Pulmonar
TE	Tris-EDTA
Y	Tirosina
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
XDR	Extensamente farmacorresistente
Z	Pirazinamida

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis*, es una enfermedad muy antigua. Existen evidencias paleopatológicas de TB vertebral en restos neolíticos precolombinos, así como en momias egipcias que datan aproximadamente del año 2400 a. C. (Torrico R., 2004) Se presume que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 1.5 millones de años. Un antepasado remoto de *M. tuberculosis* fue probablemente contemporáneo y co-evolucionó con los primeros homínidos en África oriental, hace tres millones de años. Los miembros del complejo *M. tuberculosis* parecen tener su origen en un antepasado común alrededor de 15000 – 35000 años. (Palomino JC y col., 2007)

En 1882 Koch descubre el bacilo tuberculoso (*Mycobacterium tuberculosis*), demostrando así la etiología bacteriana de la enfermedad. En 1890 Koch desarrolla la prueba de diagnóstico de la tuberculina, tras la fallida pretensión de utilizarla como vacuna. (Atance PM y León V, 1998)

1.1. Etiología y Patología de la TB

Las micobacterias son unos bacilos delgados, rectos o ligeramente curvados, no presentan esporas, son resistentes al calor y a los cambios de pH, no son móviles y son aeróbicas. (Atance PM y León V, 1998) Una de las principales características de las micobacterias es que presentan una pared compleja, muy hidrófoba, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos, (Coll P. 2003) lo que les confiere un gran interés desde el punto de vista: taxonómico (son ácido-alcohol resistentes), epidemiológico (gran resistencia a la desecación y una elevada tasa de supervivencia en el medio ambiente) y patológico (capacidad de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos). (Atance PM y León V, 1998) Los bacilos presentes en las cavidades pulmonares se multiplican de forma activa en un ambiente aerobio; los que se encuentran en el interior de los macrófagos lo hacen en un ambiente

microaerofílico que induce la latencia, y los que se encuentran en el interior del caseum tienen sólo ocasionalmente un ciclo replicativo (crecimiento intermitente). (Coll P. 2003)

La TB es una enfermedad infecciosa, generalmente crónica, consecuencia de una infección provocada por un grupo de bacterias del orden Actinomicetales de la familia Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*: complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. pinnipedi*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. canettii*). Se transmite principalmente por contacto con personas enfermas bacilíferas, a través de la inhalación de material infectante, ingestión de leche de vaca infectada por dicho complejo o contacto con animales bovinos enfermos, estos últimos mecanismos de transmisión infrecuente. El *M. tuberculosis* también puede diseminarse a cualquier parte del organismo y afectar cualquier órgano (URL 4) aunque la TB pulmonar es la forma más común de la enfermedad que se presenta en más del 80% de los casos y es la principal forma infecciosa. (Sequeira IM, Barrera L. 2008)

Desde el punto de vista de la salud pública, *M. tuberculosis* y *M. africanum* son las especies de micobacterias más importantes porque son altamente patógenas para el hombre. La TB es una enfermedad pulmonar de progresión lenta. Una persona con la enfermedad pulmonar activa expelle una gran cantidad de bacilos al toser o estornudar. Las pequeñas gotas al ser inhaladas por una persona penetran hasta los alvéolos pulmonares, donde el microorganismo se multiplica. Los macrófagos alveolares fagocitan el bacilo, más este previene la fusión de los lisosomas y previenen la destrucción. De este modo es transportado e invade los nódulos linfáticos. Simultáneamente se inicia una respuesta inmune celular con activación de macrófagos, que al acumularse forman junto con las células epiteliales las lesiones características de la enfermedad llamadas tubérculos o cavitaciones. (Kumate y col. 1998) En esta fase conocida como primaria se desarrolla la hipersensibilidad, haciéndose positiva la prueba de la tuberculina. (Jensen y Wright, 1993)

Generalmente la lesión evoluciona a la curación tras la caseificación y calcificación de la cavidad, (*Kumate y col. 1998*) pero en pacientes inmunosuprimidos y niños principalmente puede seguir a su etapa diseminada. La infección alcanza el torrente sanguíneo provocando lesiones en ojos, huesos, cerebro, riñón, hígado o bazo (*Kumate y col. 1998*) o la muerte por sepsis bacteriana. Alternativamente los bacilos pueden permanecer latentes en las cavidades, reactivándose al haber una baja en el sistema inmune para causar una TB secundaria. (*Jensen y Wright, 1992*)

La infección primaria es generalmente asintomática, llegando a observarse fiebre vespertina y síntomas de infección en vías respiratorias superiores. Una TB crónica presenta malestar general, anorexia, pérdida de peso, fiebre vespertina y tos con esputo sanguinolento (hemoptisis). Las posibles complicaciones, especialmente en niños son: TB miliar, derrame pleural, linfadenitis periférica o TB meníngea. (*Kumate y col. 1998*)

1.2. Epidemiología de la TB

En 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la TB como enfermedad reemergente la cual se ve agravada por una serie de factores que inciden directamente o de manera tangencial, como son las enfermedades inmunodepresoras (infección por el virus de inmunodeficiencia humana [VIH], diabetes, desnutrición, adicciones, etc.), la explosión demográfica, la pobreza y los cada día más constantes movimientos migratorios; a esto también se le une el aumento de la resistencia del bacilo a los fármacos antituberculosis. Entre las enfermedades que mayormente se asocian a TB se encuentran: diabetes mellitus (21.4%), porcentaje que se incrementa en mayores de 40 años, desnutrición (15.6%), alcoholismo (6.8%) y VIH/SIDA (6%). (*URL 2*)

En México, para el año 2011 de acuerdo con la información preliminar de la Plataforma Única de Tuberculosis se registraron 19 445 casos de Tuberculosis en

todas sus formas (TBTF) y en todos los casos notificados la forma más frecuente de presentación es la pulmonar con 15 843 casos, en los cuales predomina en el sexo masculino, afectando a la población económicamente activa (18- 49 años). El 20.8% del total de los casos presentan Diabetes mellitus asociada y 7.8% se vincula a VIH/SIDA, Véase figura 1. (URL 9)

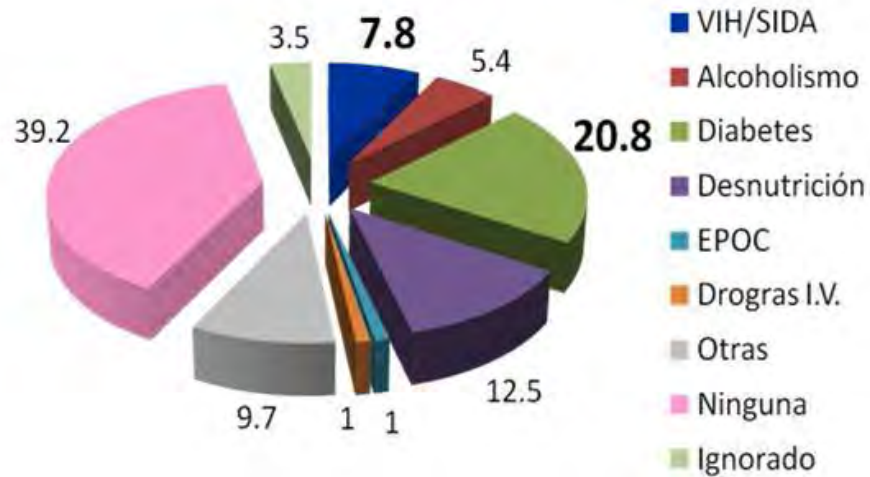


Fig. 1. Tuberculosis en todas sus formas y enfermedades asociadas, México 2011.
 Fuente: Plataforma única de información, modulo Tuberculosis.

Como puede observarse en la figura 2 la tasa de incidencia de Tuberculosis pulmonar (TBP) es de 14.5 por cada 100 000 habitantes. En 2010 fallecieron 2 414 personas por TBTF, con una tasa de 2.2 por cada 100 000 habitantes. (URL 9)

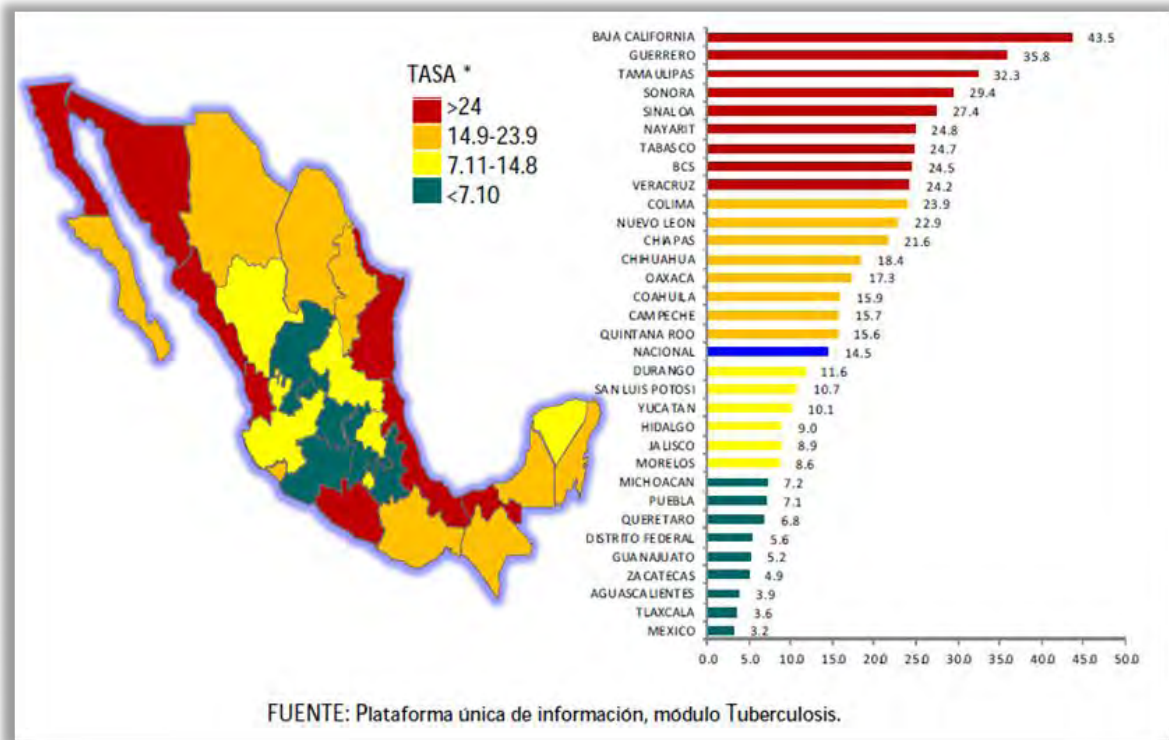


Fig. 2. Incidencia por Tuberculosis pulmonar, México 2012. Fuente: Plataforma única de información, módulo Tuberculosis.

La TB es una de las principales enfermedades causantes de muerte en el mundo, un tercio de la población mundial están infectados con el bacilo. De estas personas, una de cada 10 contraerá TB activa en algún momento de su vida. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el 2009 murieron de TB 1.7 millones de personas, lo que equivale a unas 4700 muertes al día. En este mismo año hubo 9.4 millones de casos nuevos de TB, de los que el 80% se produjo en sólo 22 países. La tasa de incidencia mundial de TB está disminuyendo, pero a un ritmo muy lento, menos del 1% cada año. La TB multifarmacorresistente (MDR, del inglés *multidrug-resistant*) es un tipo de TB que no responde a los tratamientos convencionales con fármacos de primera línea. La TB-MDR está presente en prácticamente la totalidad de los países. Se calcula que en 2008 se produjeron unos 440 000 casos nuevos de TB-MDR en todo el mundo. (URL 7)

1.3. Tratamiento en aislados de *M. tuberculosis*

M. tuberculosis puede multiplicarse en los tejidos, donde la penetración de los antibióticos es fácil, o bien encontrarse en cavidades pulmonares, pus o material caseoso, en donde la penetración de los antibióticos resulta más difícil. Los fármacos antituberculosis presentan un perfil de actividad diferenciado frente a cada una de estas localizaciones y poblaciones y es necesario asegurarse de que el tratamiento prescrito sea activo frente a todas ellas. (Coll P. 2003)

El principal objetivo del tratamiento antituberculosis es romper la cadena de transmisión de la TB, así como lograr la curación, eludir sus complicaciones y evitar la muerte. El esquema de tratamiento para curar la TB es sencillo y económico; (Caminero JA., 2004) la tuberculosis tiene un tratamiento eficaz que asegura, en los casos no complicados, una tasa de curación superior al 95%. (Coll P. 2003) Sin embargo, el mayor problema surge de la larga duración de los mismos, esto resulta un factor importante que facilita el abandono de la medicación. (Caminero JA., 2004) Las pautas de tratamiento y retratamiento a



Fig. 3. Pirámide de tratamiento. 1era línea: isoniazida (I), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E), estreptomina (S). 2da línea: kanamicina (Km), amikacina (Am), capreomicina (Cm), etionamida (Eto), protionamida (Pto), ofloxacina (Ofx), levofloxacino (Lfx) y cicloserina (Cs).

Nota: los números que preceden a la inicial del fármaco indican el tiempo en meses por el cual hay que administrarlo; las diagonales, el cambio de fase; los subíndices, el número de dosis del medicamento por semana. De no haber ningún número en forma de subíndice, el medicamento se administra diariamente.

seguir en un enfermo con TB se pueden observar en la figura 3.

Para combatir la enfermedad, la OMS lanzó en 1990 la estrategia DOTS (del inglés: “Directly Observed Treatment, Short-Course”) que se traduce como TAES es español (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) cuya utilización en la mayoría de los programas de control de la TB de los países, ha logrado un importante impacto en el control de la enfermedad en términos de disminución de la incidencia.

La coinfección TB/Diabetes, TB/VIH, la multifarmacorresistencia y el incremento de las poblaciones en riesgo (migrantes, privados de libertad, y trabajadores de salud, grupos étnicos en riesgo) representan nuevas situaciones que hacen necesario reforzar los elementos de TAES. (*Varela-Martínez C., 2010*) Además de la reducida disponibilidad de fármacos con acción frente a *M. tuberculosis*, la gran mayoría de ellos son relativamente poco eficaces, aceptándose que tan sólo existen dos de elevada eficacia, muy superior al resto. Estos dos fármacos son isoniazida (INH) y rifampicina (RIF), por lo que lo ideal es que formen parte de todos los esquemas que se diseñen para el tratamiento de la TB. La imposibilidad del uso de uno de ellos complica enormemente el manejo de los enfermos, situación que se vuelve aún más compleja cuando no se puede emplear ninguno de los dos. (*Caminero JA., 2004*)

1.4. Farmacorresistencia en aislados de *M. tuberculosis*

La farmacorresistencia es producida principalmente cuando un paciente con TB cursa una recaída, abandona el esquema de tratamiento, la vigilancia hacia el tratamiento es insuficiente o por la selección de un régimen farmacológico inapropiado.

La TB farmacorresistente (FR) tiene 4 variantes.

1. **Monorresistente:** Resistente al menos a un fármaco antituberculosis.

2. **Multifarmacorresistentes (MDR):** Resistente al menos a la isoniazida (INH) y a la rifampicina (RIF), ambos considerados como los medicamentos más efectivos contra la TB.

3. **Polirresistente:** Resistente a más de un medicamento contra la TB, pero no a la combinación de INH con RIF.

4. **Extensamente farmacorresistente (XDR):** Resistente a INH y RIF, a cualquier quinolona y al menos a uno de tres medicamentos inyectables de segunda línea (amikacina, kanamicina o capreomicina). (URL 3.)

Aunado al problema de resistencia a cualquier fármaco y de multifarmacorresistencia, se ha acuñado el término XDR-TB para un tipo de resistencia aún más preocupante. La XDR se detectó de manera inicial a principios de 2005, pero se considera que se encuentra presente en todas las regiones del mundo. (García ML., 2007)

1.5. Mecanismo de acción y resistencia a Isoniazida

La INH (hidrazida del ácido isonicotínico) es un agente antimicrobiano sintético introducido en 1952 para el tratamiento de la TB, (Luna AC., 1998 y Coll P. 2003) que tiene acción bactericida marcadamente específica y potente contra el bacilo tuberculoso, e inactiva con rapidez a los microorganismos tanto extracelulares como intracelulares. Se considera piedra angular del tratamiento de la TB y se debe incluir en todos los regímenes, excepto en los casos en que la resistencia a la INH es elevada y además el régimen farmacológico incluye RIF. (Luna AC., 1998)

La resistencia de la micobacteria a la INH se empezó a investigar a partir de 1954, cuando Middlebrook observó que las cepas de *M. tuberculosis* altamente resistentes a INH carecían o tenían una importante disminución en la actividad de la catalasa. Este descubrimiento y evidencia bioquímica implicando a la catalasa-peroxidasa en la actividad antituberculosa de la INH, llevó a una serie de investigaciones sobre el gen *katG* que codifica para esta enzima. (Luna AC., 1998)

La INH requiere una activación *in vivo* que producirá un potente derivado, capaz de oxidar o acilar grupos proteicos, que finalmente actuará en la síntesis de los ácidos micólicos de la pared de *M. tuberculosis*. (Coll P. 2003)

El mecanismo de acción de la INH (véase figura 4) se debe a su activación por una catalasa-peroxidasa micobacteriana (codificada por el gen *katG*), que al entrar en contacto con la INH la oxida. Después, la INH oxidada inhibe la actividad de la enoil-ACP reductasa (codificada por el gen *inhA*) que participa en la síntesis de ácidos micólicos α -aluil- β -hidroxiácidos de 70 a 90 átomos de carbono componentes de la pared celular de la micobacteria. Así, un descenso en la actividad de esta enzima genera la muerte del microorganismo al quedar incompleta su pared celular. Adicionalmente, la enzima alquilhidroperóxido reductasa participa en la detoxificación del intermediario activo de la INH. El gen que codifica para esta enzima (*ahpC*) está controlado por el gen *oxyR*, quien a su vez está regulado por un estrés oxidativo. Este último gen no es funcional en *M. tuberculosis* y *M. bovis*, mientras que permanece activo en otras micobacterias, justificando así la susceptibilidad mayor de *M. tuberculosis* y *M. bovis* a la INH. (Luna AC., 1998)

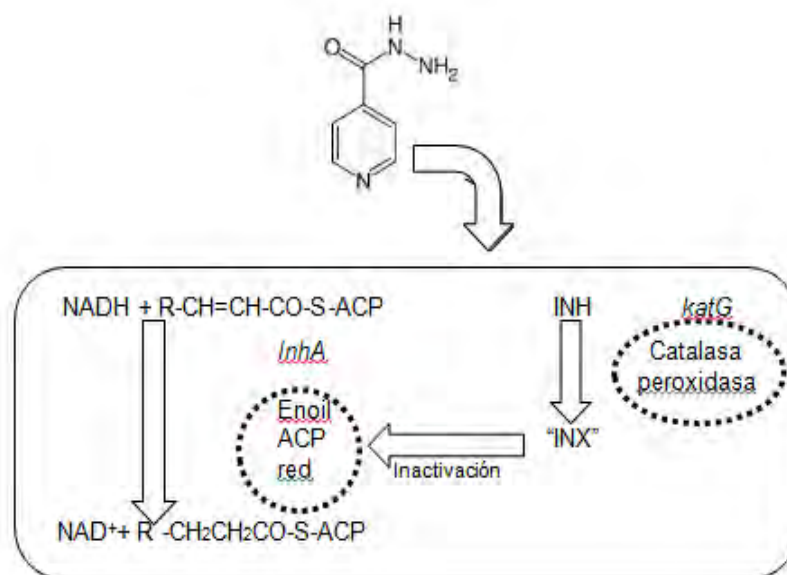


Fig. 4. Mecanismo de acción de INH. La INH entra a la micobacteria, es activada por una catalasa-peroxidasa, la INH activada inhibe la actividad de la enoil-ACP reductasa que participa en la síntesis de ácidos micólicos componentes de la pared celular de la micobacteria, lo que origina la muerte del microorganismo. (Luna AC., 1998)

La enzima KatG de *M. tuberculosis* es una proteína de 80kDa, compuesta por 740 aminoácidos y posee una protoporfirina IX en su sitio activo. Es codificada por el gen *katG* que se encuentra en una región relativamente inestable, haciéndolo susceptible a sufrir deleciones y mutaciones sin sentido. (Slayden y Barry, 2000)

Al secuenciarse el gen *katG* de aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a INH se han encontrado numerosas mutaciones. Las dos mutaciones más frecuentes encontradas son R463L y S315T. La mutación R463L es un polimorfismo, siendo las cepas que poseen leucina en dicha posición ancestros de las que tienen arginina. La mutación S315T se encuentra en aproximadamente el 50% de los aislados clínicos. (Saint-Joanis y cols. 1999) Debido a que proporciona resistencia considerable a la INH y a que la enzima conserva su actividad de catalasa-peroxidasa. (Wengenack y cols. 1998)

1.6. Mecanismo de acción y resistencia de Rifampicina.

La rifampicina (RIF) es el segundo agente antituberculoso en orden de importancia, y el segundo frente al cual la micobacteria presenta con más frecuencia resistencia, fue introducida en 1968 como un potente agente antituberculoso, es activa contra una amplia variedad de bacterias no-ácido alcohol resistentes y otras micobacterias de crecimiento lento. Es extremadamente efectiva contra *M. tuberculosis* (MIC 0.1-0.2 g/ml) y de actividad bactericida rápida, actúa inhibiendo específicamente la elongación de transcritos de la micobacteria, al unirse al presunto centro catalítico de la RNA polimerasa, lo que origina la muerte del microorganismo. (Luna AC., 1998)

La resistencia de *M. tuberculosis* a RIF es conferida por un grupo de mutaciones dentro de una región determinante para la resistencia a la rifampicina (RRDR, por sus siglas en Inglés) o región “*hot spot*” de 81pb del gen *rpoβ*, el cual codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa de la micobacterias. Los aislamientos clínicos resistentes a RIF poseen mutaciones dentro de la región *hot*

spot de 81pb del gen *rpoβ*. Se han descrito más de 35 mutaciones dentro de esa región correlacionadas con la resistencia a RIF, siendo la mayoría de ellas simples cambios nucleotídicos que originan sustituciones aminoacídicas, inserciones o deleciones. Se cree que todas las mutaciones se encuentran entre los aminoácidos 511 al 533, esta región de la RNA polimerasa corresponde al sitio de unión con la RIF. Aproximadamente el 60% de todas las mutaciones son una sustitución de la S 531 por L, originada por el cambio nucleotídico de TGC→TTG, o de H a 526 por T, originada por el cambio nucleotídico de CAG →TAG. Estas mutaciones puntuales no están involucradas en la aparición o desaparición de un sitio de restricción, por lo que para detectarlas es necesario emplear técnicas acopladas a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (Luna AC., 1998)

1.7. Métodos de diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*

Es posible realizar el diagnóstico de TB por distintos métodos, pero el más confiable es el aislamiento del agente etiológico de distintos fluidos corporales (en especial del esputo), su observación al microscopio mediante la tinción de Ziehl-Neelsen y su cultivo en medio de Middlebrook o Löwenstein-Jensen. Se usa también las placas de rayos X que permiten observar las cavidades en los pulmones. Una tercera opción es la prueba de la sensibilidad cutánea a la tuberculina, el más sencillo; la limitación de este método, es que las personas vacunadas con el BCG (bacilo de Calmette-Guerin) darán resultados positivos. (Kumate y col. 1998)

1.7.1. Baciloscopia

La baciloscopia, además de ser, el procedimiento más simple, barato y rápido, además es la primera aproximación en el diagnóstico de la TB, (Alcaide F., 2005) aunque no distingue la TB-FR. (URL 5) Las micobacterias son microorganismos difíciles de teñir con los colorantes básicos habituales. Esto se debe al alto contenido de lípidos de su pared celular, en especial ácidos grasos de cadena

larga (ácidos micólicos). Para lograr la penetración del colorante primario al interior de la micobacteria se debe recurrir al calor o a determinados detergentes según el método utilizado. Una vez dentro, el colorante no podrá ser extraído tras la exposición al alcohol-ácido o ácidos minerales. Esta propiedad se denomina ácido-alcohol resistencia (AAR) y es útil para la visualización de este grupo específico de bacterias. (*Alcaide F., 2005*)

Los métodos más utilizados para determinar los BAAR (bacilos ácido-alcohol resistentes) son las tinciones basadas en la utilización de fucsina fenicada (carbolfucsina) como colorante primario; esta es la clásica tinción de Ziehl-Neelsen o variantes como la de Kinyoun, donde los microorganismos se tiñen de rojo sobre un fondo azul o verde, dependiendo del contra colorante utilizado. (*Alcaide F., 2005*)

1.7.2. Cultivo

Es el "patrón de oro" en el diagnóstico y seguimiento de los casos de TB. Permite el aislamiento y la identificación de la micobacteria y la posterior determinación de sensibilidad a fármacos. Tiene mayor sensibilidad que la baciloscopia y por lo tanto permite diagnosticar casos menos avanzados. (*URL 5*)

El aislamiento de micobacterias a partir del cultivo de muestras clínicas continúa siendo fundamental para el diagnóstico específico de las infecciones por estos microorganismos. El cultivo ha demostrado ser más sensible (10^1 - 10^2 bacterias viables/mL) que el examen microscópico. Además, el aislamiento del agente causal permite la identificación de la especie, los posteriores estudios de sensibilidad frente a los antimicrobianos, así como la monitorización del tratamiento y curación del paciente. (*Alcaide F. y col., 2005*)

Se disponen de diferentes tipos de medios de cultivo adecuados para el aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas. Los más utilizados son

los que tienen como base el huevo (Löwenstein-Jensen, Petragnani, Coletsos, Ogawa, etc.) y los semisintéticos con agar (7H10 y 7H11 de Middlebrook). (Alcaide F. y col., 2005) La incubación de los medios sembrados en una atmósfera enriquecida con un 5-10% de CO₂ favorece el crecimiento de *M. tuberculosis*. Cualquiera que sea el medio de cultivo utilizado, el tiempo transcurrido entre la recepción de la muestra y la emisión del resultado suele ser de 3 a 6 semanas. (Caminero JA., 2004)

1.7.3. Diagnóstico molecular de TB

Este tipo de pruebas se apoyan en la amplificación de ADN o ARN de *M. tuberculosis* por medio de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR); lo cual se realiza en laboratorios de referencia certificados y es útil para el diagnóstico de TB extrapulmonar. La PCR identifica el ADN o ARN de *M. tuberculosis* en muestras clínicas o permite confirmar que los BAAR observados o aislados son efectivamente *M. tuberculosis*. (URL2)

1.7.3.1. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Esta técnica se utiliza en estudios de epidemiología molecular para establecer relaciones genéticas entre cepas aisladas en distintos pacientes de una o más localidades, por lo que se emplean cepas puras de *M. tuberculosis*. (Balandramo CS y col, 1996)

Es la técnica de tipificación más conocida y utilizada. El método se basa en el variable número de copias de la secuencia de inserción IS6110 que presentan las diferentes cepas (de 0 a 25) y en su posición en el genoma. (Alcaide F. y col., 2005 y Acosta R. 2009) La técnica se inicia con la extracción de ADN de la bacteria y su digestión con la enzima PvuII, que posee una única diana en los 1355 pb de la IS6110. Los fragmentos se separan en agarosa por electroforesis,

se transfiere a una membrana de nitrocelulosa y se lleva a cabo la hibridación con una sonda para IS6110 marcada radiactivamente, en la actualidad puede emplearse un marcador no radioactivo, como biotina o digoxigenina. (*Palma N y Bocanegra G. 2007*) El patrón de hibridación puede revelarse mediante una autorradiografía. Los patrones obtenidos se comparan entre sí para establecer las relaciones genéticas de las cepas en estudio para el producto amplificado. (*Alcaide F. y col., 2005*)

El RFLP con la secuencia de inserción IS6110 continúa siendo el método estándar internacional para estudios epidemiológicos. (*Acosta SR. 2009*) Sin embargo, este método es muy laborioso, lento y difícil de normalizar inter-experimento e inter-laboratorio. (*URL 5*)

1.7.3.2. Espoligotipificación

La técnica de *spoligotyping* (*spacer oligonucleotide typing*), basada en la presencia o ausencia de alguna de las 43 secuencias espaciadoras localizadas en la región de las repeticiones directas (DR) de *M. tuberculosis*, es utilizada en el mundo como herramienta en investigaciones epidemiológicas y desarrollo de programas de prevención. (*Mancilla EM. y col., 2006 y Salinas AR. 2009*) Este procedimiento es ventajoso por cuanto permite rastrear y comparar rápidamente el genotipo con los existentes en la base de datos internacional SpolDB320. (*Mancilla EM. y col., 2006*)

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el concierto internacional para apoyar programas epidemiológicos en tuberculosis humana. Una ventaja importante de esta metodología es que permite analizar, de manera simultánea, un número importante de cepas. Una segunda ventaja es la disponibilidad de las bases de datos internacionales, SpolDB3 y SpolDB4, las cuales contienen la colección más completa y actualizada de los espoligotipos de *M. tuberculosis* encontrados en distintos países. (*Mancilla EM. y col., 2006*)

1.7.3.3. Genotipificación molecular por MIRU-VNTR

MIRU-VNTR (del inglés *variable number of tandem repeats – mycobacterial interspersed repetitive units*). Los MIRUs son unidades de repetición intergénica de 40 a 100 pb los cuales se han encontrado como repeticiones contiguas dentro del genoma del complejo *M. tuberculosis*. El cromosoma de *M. tuberculosis* contiene 41 MIRUs localizados en diferentes loci, de los cuales 12 loci presentan mayor polimorfismo en el número de copias contiguas a cada locus descrito, como se observa en la figura 5. (Martínez G. 2010).

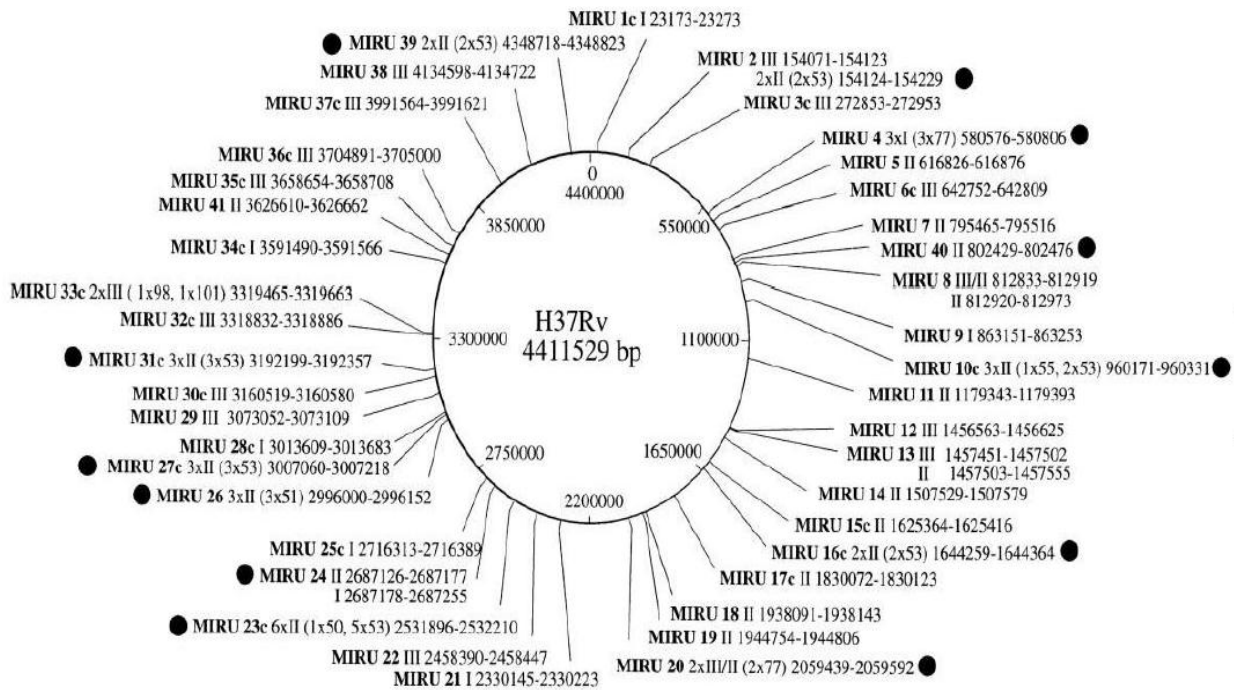


Fig. 5. Posición de los 41 MIRUs en el cromosoma de *M. tuberculosis*. Los puntos negros indican las posiciones de los 12 MIRUs que presentan un mayor polimorfismo. Tomado de Supply y col.; 2000.

Los VNTR son secuencias repetidas en tándem de número variable dispersas en el genoma, cuyo polimorfismo se origina por adición o delección de secuencias repetidas. Estos marcadores genéticos, antes denominados minisatélites, se identificaron inicialmente en seres humanos, donde han tenido su mayor aplicación en pruebas forenses y de paternidad. (Acosta SR, 2009) En los diferentes conjuntos de loci de MIRU-VNTR descritos para la tipificación de

aislados de *M. tuberculosis*, un sistema basado en 12 loci es actualmente el más utilizado y se ha integrado en los sistemas de control de la tuberculosis a nivel nacional. (*Supply y col. 2006*)

Para identificar un VNTR se amplifica su secuencia por PCR con oligonucleótidos complementarios a secuencias específicas en sus flancos. El tamaño del amplicón, después de la migración electroforética, revela el polimorfismo del VNTR y puede expresarse como el número de secuencias repetidas que contiene; al conocer la longitud de las unidades de repetición en pares de bases se refleja el número de repeticiones de cada locus. El resultado final es un código numérico de los 12 MIRU–VNTR más polimórficos, el cual puede ser utilizado para comparar muestras. (*URL www.miru-vntrplus.org*) Usando VNTR se han genotipificado diversos microorganismos, entre ellos: *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. bovis*, *Brucella abortus*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*. (*Acosta SR, 2009; URL www.miru-vntrplus.org*)

La genotipificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* contribuye el control de TB, lo que indica posibles vínculos epidemiológicos en los pacientes con TB, la detección de brotes sospechosos, contaminación cruzada de laboratorio y distinguir la reinfección exógena de la reactivación endógena en los casos de recaída. (*Supply y col. 2006*) Para estos fines RFLP basado en la IS6110 se ha usado como método de referencia por más de una década. Sin embargo, este método es laborioso, requiere de semanas para el cultivo de cepas y la posterior purificación de ADN, y suelen aparecer problemas de interpretación. (*Acosta SR, 2009*) Además, no se ofrece la discriminación suficiente entre los aislados con baja número de copias de IS6110, un problema que solo es superado en parte mediante el uso de espoligotipificación basada en PCR. La genotipificación basada en MIRU-VNTR es cada vez más utilizada para resolver estos problemas. Es más rápido tipificar con esta técnica, comparada con la con RFLP utilizando la IS6110, puesto que se pueden aplicar extractos de ADN sin purificación desde

principios de cultivo de micobacterias, y se ha adoptado a las condiciones de alto rendimiento. Además, los resultados se expresan con códigos numéricos, y por lo tanto es muy fácil de comparar. (*Supply y col. 2006*)

2. ANTECEDENTES

2.1. Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en Tuberculosis

En 2008 se inició en México el levantamiento de la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en Tuberculosis (ENFR), cuyo objetivo principal fue estimar de manera representativa la frecuencia en el plano nacional de este problema en pacientes con tuberculosis pulmonar (TBP), con y sin tratamiento previo. El InDRE participó en la encuesta teniendo a cargo las pruebas de sensibilidad a medicamentos antituberculosis.

Lo que motivo a México para realizar la ENFR, fue la falta de información representativa en el plano nacional de la frecuencia de FR en el país.

El objetivo principal de la encuesta fue estimar la frecuencia de FR en casos de TBP en México, con y sin tratamiento antituberculosis previo. Para esto se evaluaron la resistencia a uno o más medicamentos de primera línea y en particular la MDR, definida como resistencia simultánea a isoniazida y rifampicina.

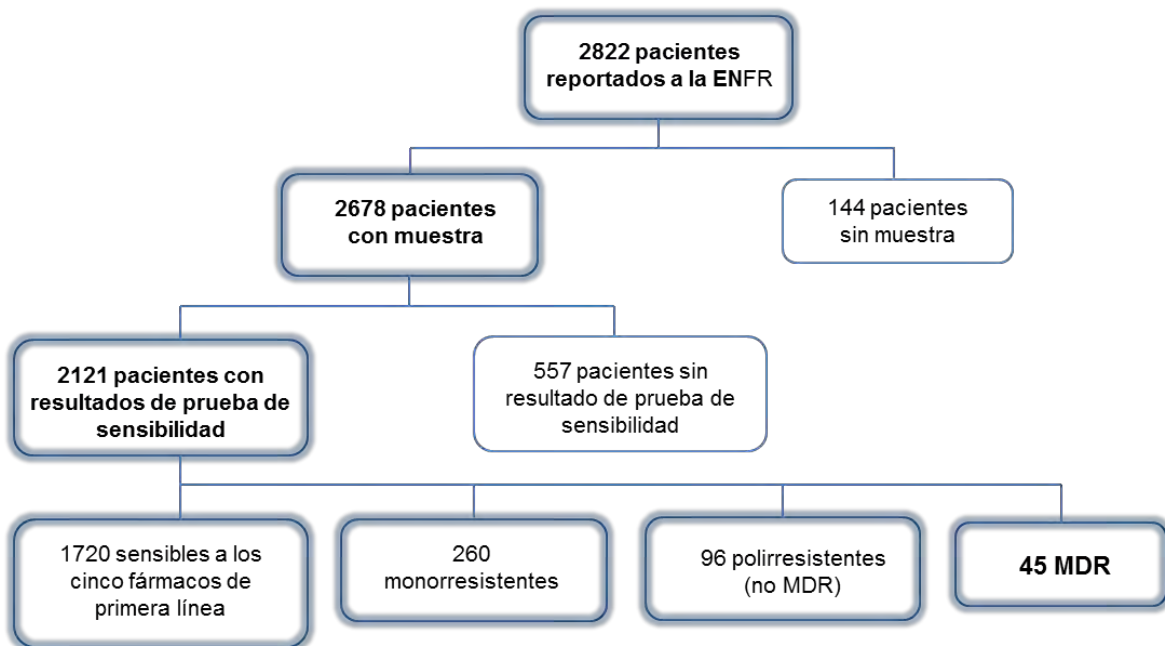


Fig. 6. Selección de muestras de *M. tuberculosis* MDR en la ENFR 2008.

La ENFR recabó información de pacientes que recibieron atención en todas las instituciones de los servicios públicos de salud, seleccionados mediante un esquema de muestreo probabilístico y con un tamaño de muestra calculado para contar con resultados representativos en el ámbito nacional. Se incluyeron en la muestra todos los pacientes que tuvieron diagnóstico positivo de TB pulmonar por BK en las entidades federativas y jurisdicciones participantes, hasta cubrir el tamaño de muestra requerido, como se observa en la figura 6. Se obtuvieron muestras de expectoración de estos pacientes para la realización de prueba de sensibilidad. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Micobacteriosis del InDRE, y se contó con control de calidad por parte del Laboratorio de Micobacteriología, División de Eliminación de la Tuberculosis, de CDC de Atlanta Georgia, EUA.

El levantamiento en campo de la ENFR se llevó a cabo de febrero de 2008 a marzo de 2009 en nueve estados seleccionados de manera probabilística: Baja California, Chihuahua, Estado de México, Guanajuato, Morelos, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa y Yucatán, obsérvese figura 7.



Fig. 7. Localización de los aislados de *M. tuberculosis* MDR en la República Mexicana.
Fuente: Secretaría de Salud, Encuesta Nacional de Tuberculosis farmacorresistente, 2008-2009.

En este estudio se caracterizaron los aislados de *M. tuberculosis* MDR aislados en el ENFR con el fin de poder conocer los diferentes linajes de micobacterias circulantes en la República Mexicana, todo esto apoyados en la técnica de MIRU-VNTR.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la TB es considerada una de las enfermedades reemergentes más importantes como problema de salud pública y representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. La TB es una enfermedad prevenible y curable, sin embargo, el desapego del tratamiento da lugar a la generación de cepas resistente a los diferentes medicamentos que se utilizan para su cura. En el presente estudio se presenta información de distintas cepas de TB-MDR seleccionados durante la ENFR, estudiando características genéticas relacionadas con la resistencia a fármacos de primera línea y sus genotipos para conocer los principales factores genéticos causantes de la farmacorresistencia y determinar cuales son los principales linajes de TB circulantes en la República Mexicana, todo esto apoyándonos de la técnica MIRU-VNTR, la cual es un procedimiento rápido y de fácil interpretación. Esta información puede apoyar la instrumentación de mejores estrategias de prevención y control de los grupos de riesgo involucrados en la diseminación de cepas farmacorresistentes dentro del país y de esta forma contribuir al control de la TB-MDR.

4. HIPÓTESIS

Mediante el análisis de los patrones genéticos obtenidos con la técnica MIRU-VNTR de aislados de pacientes con TB-MDR obtenidos en el ENFR, se determinará la distribución y diseminación de linajes de bacilos MDR y su relación con grupos de riesgo de los estados analizados.

5. OBJETIVOS

5.1. General:

Correlacionar el perfil de farmacorresistencia de aislados de *M. tuberculosis* MDR con sus patrones genéticos, así como los factores de riesgo de los pacientes (edad, sexo y lugar de origen) que determinan la diseminación de los bacilos farmacorresistentes en la República Mexicana.

5.2. Particulares:

- Seleccionar los aislados de *M. tuberculosis* MDR provenientes de los estados participantes en la ENFR.

- Caracterizar genéticamente los aislados de *M. tuberculosis* MDR, mediante la técnica de MIRU-VNTR.

- Correlacionar los patrones genéticos más frecuentes en los aislados farmacorresistentes con las variables demográficas de los pacientes.

- Analizar la distribución de los patrones genéticos de los aislados farmacorresistentes con respecto a los lugares de origen y a la frecuencia de linajes circulantes en la república.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se eligieron 45 aislados de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes (TB-MDR) seleccionados por la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en Tuberculosis (ENFR) procedentes de 9 estados de la República Mexicana durante el 2008-2009, los cuales se sembraron en medio de Middlebrook 7H9 y 7H10 para su posterior obtención de DNA genómico por el método de lisozima-proteínasa K, con el fin de ser caracterizados a nivel molecular mediante la técnica de MIRU-VNTR, así como la identificación de los genes de resistencia a isoniazida (*katG*, *inhA*), mediante la técnica de PCR-RFLP y PCR *multiplex*; y los genes de resistencia para rifampicina (*rpoB*), a través de la técnica de PCR-ARMS, véase figura 8.

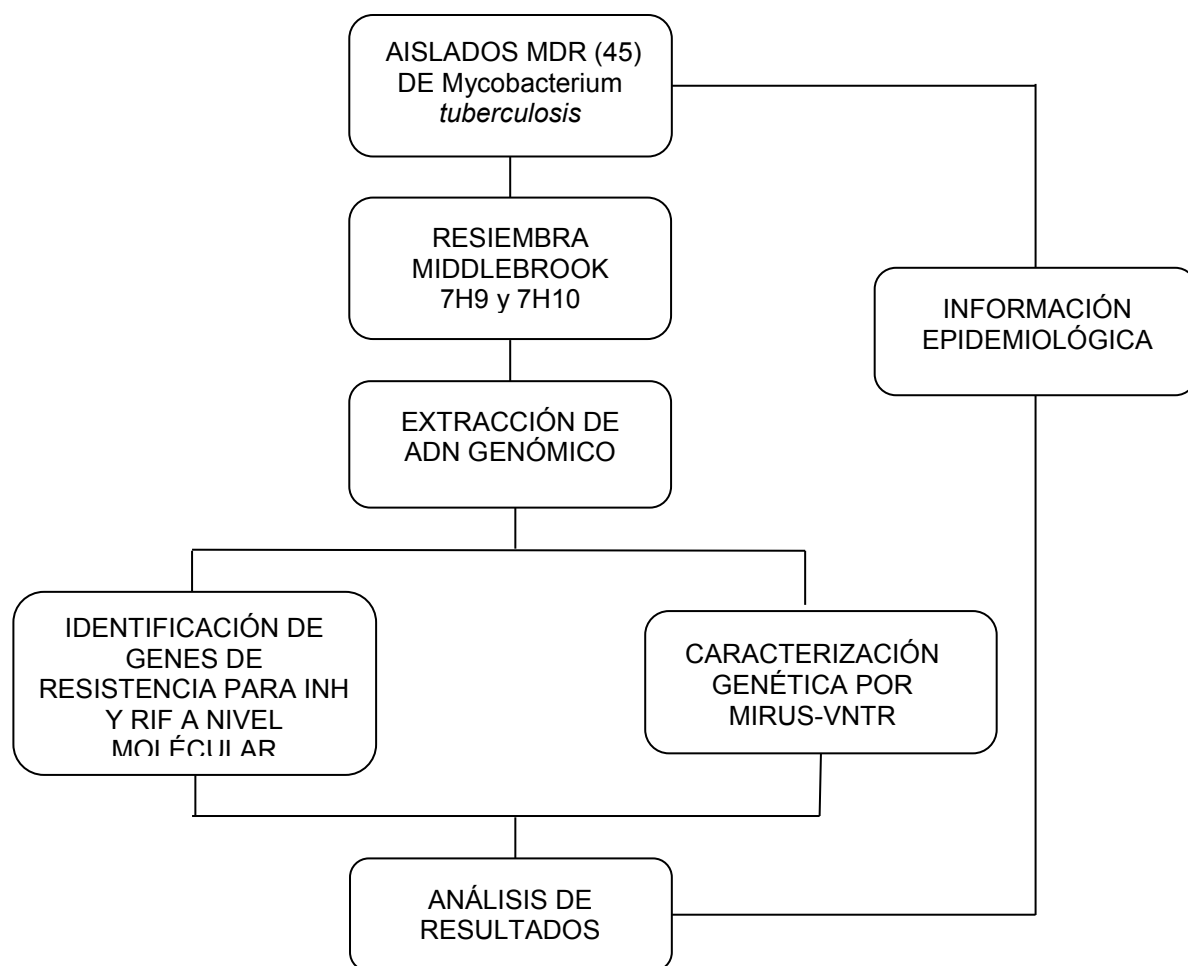


Fig. 8. Algoritmo general de trabajo

6.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de *M. tuberculosis*, se realizó centrifugando 5mL del cultivo a 4500g por 15min. La pastilla se resuspendió en 400µL de TE 1X, se transfirió a un microtubo, al cual se llevo a inactivación con 3 ciclos en donde se calentó a ebullición por 10min, dejándose enfriar a 4°C. Posteriormente se adicionaron 50µL de lisozima (100mg/mL, resuspendida en agua), se agitaron en vórtex por 30seg y se incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente se adicionaron 70µL de una mezcla de SDS al 10% y 6µL de proteinasa K (10mg/mL, resuspendida en agua). Se agitaron en vórtex y se incubaron a 65°C 10 min; se adicionaron 100µL de NaCl 5M y 100µL de solución de CTAB/NaCl (precalentada a 65°C). Se homogenizó en vórtex hasta que el líquido se torno lechoso y se incubó a 65°C 10 min. Se añadieron 600µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se agitaron en vórtex 10 min y se centrifugó a 12000rpm por 10 min; a partir de aquí se trabajó en hielo. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio sin tomar la interfase; posteriormente se adicionaron 600µL de isopropanol y se colocaron durante 30min a -20°C. La muestras se centrifugó a 12000rpm/10min y el sobrenadante se desechó. La pastilla se resuspendió en 600µL de etanol 70% frío, se agitó con vórtex rápidamente y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 10 min; el sobrenadante se desechó. Se añadieron 600 µL de alcohol absoluto y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 10 min. Finalmente, la pastilla se secó a temperatura ambiente por 30 min y se resuspendió en 20 µL del amortiguador TE 1X (Tris 10mM, EDTA 1mM).

6.2. Determinación de la mutación que confiere resistencia a isoniazida en aislados de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes

La determinación de la mutación que otorga resistencia a isoniazida se llevó a cabo a través de una PCR *multiplex*, la cual es capaz de detectar la mutación AGC → ACC en el codón 315 del gen *katG*, así como la mutación en la posición -15 del extremo 5' de la región promotora/operadora *mabA-inhA*.

Los iniciadores diseñados en esta reacción se emplean para determinar cada una de las mutaciones presentes tanto en *katG* como en *inhA*, la tabla 1 muestra los iniciadores que se utilizan para llevar a cabo la PCR *multiplex*. Por lo tanto, si existe la mutación en el gen *katG* se obtiene un fragmento de amplificación de 269 pb, mientras que si existe la mutación en *inhA* se amplifica un fragmento de 146 pb. En la ausencia de la mutación en cualquiera de los genes, no se obtiene producto de amplificación. Por ello, la reacción utiliza un tercer par de iniciadores los cuales, amplifican una banda de aproximadamente 1020 pb que corresponde al gen que codifica para la subunidad β de la girasa de *M. tuberculosis*. Este producto de amplificación se utiliza como testigo de reacción, por lo que su ausencia invalida la reacción de PCR.

Tabla 1. Secuencias de iniciadores utilizados en la PCR *multiplex*

Gen blanco	Iniciador	Secuencia 5'→3'	Tamaño de amplicon (pb)
<i>gyrB</i>	MTUBf MTUBr	TCGGACGCGTATGCGATATC ACATACAGTTCGGACTTGCG	1020
<i>katG</i>	<i>Katg</i> 0f R315 mut	GCAGATGGGGCTGATCTACG TCCATACGACCTCGATGCCAG	296
<i>mabA-inhA</i>	MabAF <i>inhA</i> Rmut	CGAAGTGTGCTGAGTCACACCG AGTCACCCCGACAACCTATTA	146

Herrera-León y col., 2005.

Se trabajó con un volumen de 25 µL por reacción, la concentración final de los componentes fue: Tris HCl 10 mM, pH9; MgCl₂ 1.5 mM; KCl 50 mM; dNTP's 200 µM y Taq DNA polimerasa 2.5 U. La concentración final de cada iniciador fue de 1 µM por reacción. Se utilizó una desnaturalización inicial 94°C por 5 minutos a,

seguida de 30 ciclos de desnaturalización de 95°C por 1 minuto, alineamiento de 68°C por 1 minuto y extensión de 72°C por 45 segundos, seguida de una extensión final de 72°C por 10 minutos .

Una vez terminada la PCR, los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 90 minutos a 100V, para posteriormente teñir el gen en bromuro de etidio, los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador de luz UV digitalizando la imagen obtenida.

6.3. Determinación de la mutación que confiere resistencia a rifampicina en aislados de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes

Para la determinación de las mutaciones que confieren resistencia para rifampicina se trabajo una PCR alelo específico, la cual es llamada ARMS (del inglés *Amplification Refractory Mutation System*); en este método se utilizan tres iniciadores, véase en la tabla 2, un par de ellos que amplifica una banda de 537 pb como control interno, que incluye la región “*hot spot*” de 81 pb, y un tercer iniciador que no amplificara en señal de que existe la mutación en los codones 516, 526 y 531 pb; estas reacciones se realizan de manera independiente en cada cepa.

Tabla 2. Secuencias de iniciadores utilizados en la PCR-ARMS

Codón	Secuencia 5' → 3'	Tamaño de la banda
Control	CGAATATCTGGTCCGCTTGC GTCGACCACCTTGCGGTACG	537
516	CAGCTGAGCCAATTCACGGA GTCGACCACCTTGCGGTACG	261
526	CGCTGTCGGGGTGGTCCC GTCGACCACCTTGCGGTACG	230
531	ACCCACAAGCGCCGACAGTC GTCGACCACCTTGCGGTACG	216

Fan y col., 2005.

Para la reacción de amplificación se trabajó con un volumen final de 25 µL por reacción, la concentración final de los componentes fue: Tris HCl 10 mM, pH9; MgCl₂ 1.5 mM; KCl 50 mM; dNTP's 200 volumen final de 25 µL: Tris HCl 10 mM,

pH 9; MgCl₂ 1.5 mM; KCl 50 mM; dNTP's 200 µM y Taq DNA polimerasa 1 U. La concentración final de cada iniciador fue de 1 µM por reacción. Se utilizó una desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización de 94°C a 35 segundos, alineamiento de 56°C por 35 segundos y extensión de 72°C por 35 segundos, seguida de una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Una vez terminada la PCR, los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 90 minutos a 100V, para posteriormente teñir en bromuro de etidio. Los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador de luz UV digitalizando la imagen obtenida.

6.4. Caracterización de aislados de *M. tuberculosis* por la amplificación de MIRU-VNTR.

La caracterización de los aislados se realizó con la amplificación de los MIRU-VNTR utilizando los 12 pares de iniciadores que amplifica cada uno de los 12 loci génicos MIRUs más polimórficos, obsérvese tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de los iniciadores específicos de los MIRUs con mayor polimorfismo de *M. tuberculosis*

Locus	Secuencias de <i>primers</i> (5'-3')
MIRU 2	2F - TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT 2R - TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
MIRU 4	4F - GCGCGAGAGCCCGAACTGC 4R - GCGCAGCAGAAACGTCAGC
MIRU 10	10F - GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC 10R - GCCACCTTCCTGATCAGCTACCT
MIRU 16	16F - TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA 16R - CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
MIRU 20	20F - TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG 20R - GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
MIRU 23	23F - CTGTGATGGCCGCAACAAAACG 23R - AGCTCAACGGGTTCGCCCTTTTGTC
MIRU 24	24F - CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT 24R - GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
MIRU 26	26F - TAGGTCTACCGTCAAATCTGTGAC 26R - CATAGGCGACCAGGCGAATAG
MIRU 27	27F - TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA 27R - GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU 31	31F - ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA 31R - GTGCCGACGTGGTCTTGAT
MIRU 39	39F - CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC 39R - CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU 40	40F - GGGTTGCTGGATGACAACGTGT 40R - GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA

Tomado de Supply y col. 2000.

En la tabla 4 se muestran los componentes utilizados para este tipo de PCR, en donde cada reacción se llevó en un volumen final de 50µl, donde la concentración de MgCl₂ difiere de acuerdo al locus.

- La mezcla 1 correspondió a los MIRUs 2, 4, 10, 16, 31 y 40.
- La mezcla 2 correspondió a los MIRUs 23 y 39.
- La mezcla 3 correspondió a los MIRUs 20, 24, 26 y 27.

Tabla 4. Mezcla de los componentes de la PCR para la amplificación de los MIRU-VNTR de *M. tuberculosis*.

Reactivos (para 1 reacción)	Mezcla tipo 1 (2mM MgCl ₂)	Mezcla tipo 2 (2.5 mM MgCl ₂)	Mezcla tipo 3 (1.5 mM MgCl ₂)
H ₂ O	25.8 µL	24.8 µL	26.8 µL
Amortiguador 10 X	5 µL	5 µL	5 µL
Sol. Q 5X	10 µL	10 µL	10 µL
MgC ₂ 25 mM	1 µL	2 µL	-
dNTPs (5 mM/ cada uno)	1 µL	1 µL	1 µL
Iniciador sentido	1 µL	1 µL	1 µL
Iniciador contrasentido	1 µL	1 µL	1 µL
Enzima "Hot Star" polimerasa (5 U/mL)	0.2 µL	0.2 µL	0.2 µL
DNA	5 µL	5 µL	5 µL

De esta manera se llevaron a cabo 12 reacciones de PCR para cada cepa con un desnaturalización inicial de 95°C 15 min a, seguida de 40 ciclos desnaturalización de 1 min a 94°C, alineamiento de 1 min a 59°C y extensión de 1.5 min a 72°C, seguida de una extensión final de 10 min a 72°C. Una vez concluida la PCR, los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 90 min a 100V, para posteriormente teñir el gel con bromuro de etidio a una concentración de 0.7µg/ml. Posteriormente, el gel se visualizó en un transiluminador de luz UV a una longitud de onda de 302 nm, digitalizando la imagen obtenido.

Con la imagen obtenida en la electroforesis en gel, se obtuvo el tamaño de cada una de las bandas para posteriormente realizar la asignación del código del MIRUs correspondiente de acuerdo al número de copias encontradas para cada uno de ellos, como se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Asignación del código numérico de acuerdo al número de copias encontradas en cada locus de *M. tuberculosis*.

No. copias	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40
0	402	175	482	565	437	150	395	285	489	492	540	354
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	438	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678
7	773	714	855	36	976	518	771	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1053	571	825	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330	1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164

** El MIRUs 04, presenta un alelo representado como MIRU 04' que tiene un locus génico de 193 pb y el tamaño de cada unidad de repetición intergénica es de 77 pb. Este MIRU se representa en la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, en BCG y en el 1% de los aislados clínicos (Supply y col.).

7. RESULTADOS

7.1. Datos epidemiológicos de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*

Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron 45 aislados de *M. tuberculosis* multifarmacorresistentes (TB-MDR) provenientes de los diferentes estados de la República Mexicana, obtenidos de la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en México durante el 2008-2009.

La tabla 6 nos muestra los aislados estudiados de las diferentes entidades federativas en donde observamos que la mayoría de ellos se concentran en los estados de Baja California con un porcentaje del 24.4% y el Estado de México con un porcentaje de 22.22%. Los estados que presentaron un porcentaje intermedio fueron Sinaloa con 15.5%, Guanajuato 11.11%, Yucatán 8.88%, San Luis Potosí y Chihuahua estos últimos con un 6.66%; y los estados que presentan un menor porcentaje son Querétaro y Morelos, ambos con un 2.22%.

Tabla 6. Distribución de los aislados de *M. tuberculosis* farmacorresistentes seleccionados.

ESTADO	NUMERO	%
Baja California	11	24.4
Estado de México	10	22.22
Sinaloa	7	15.5
Guanajuato	5	11.11
Yucatán	4	8.88
Chihuahua	3	6.66
San Luis Potosí	3	6.66
Morelos	1	2.22
Querétaro	1	2.22

La edad de los pacientes se encuentra en un rango de 18-81 años, con una edad promedio de 45.8 años. En la figura 9 se muestra el número de aislados TB-MDR que se reportaron en la ENFR, de los cuales ningún seleccionado se encontraba en la etapa de la infancia (0-11 años), el 2.2% de los seleccionados se encontraba en la etapa de la adolescencia (12-18 años), 6.6% de los seleccionados pertenecía a la etapa de la juventud (19-25 años), 17.7% seleccionados se encontraban en el período de la vejez (mayores a 60 años), y en donde se encontró un porcentaje de aislados de TB-MDR seleccionados fue en la etapa de la adultez (26-60 años) con un 73.3%.

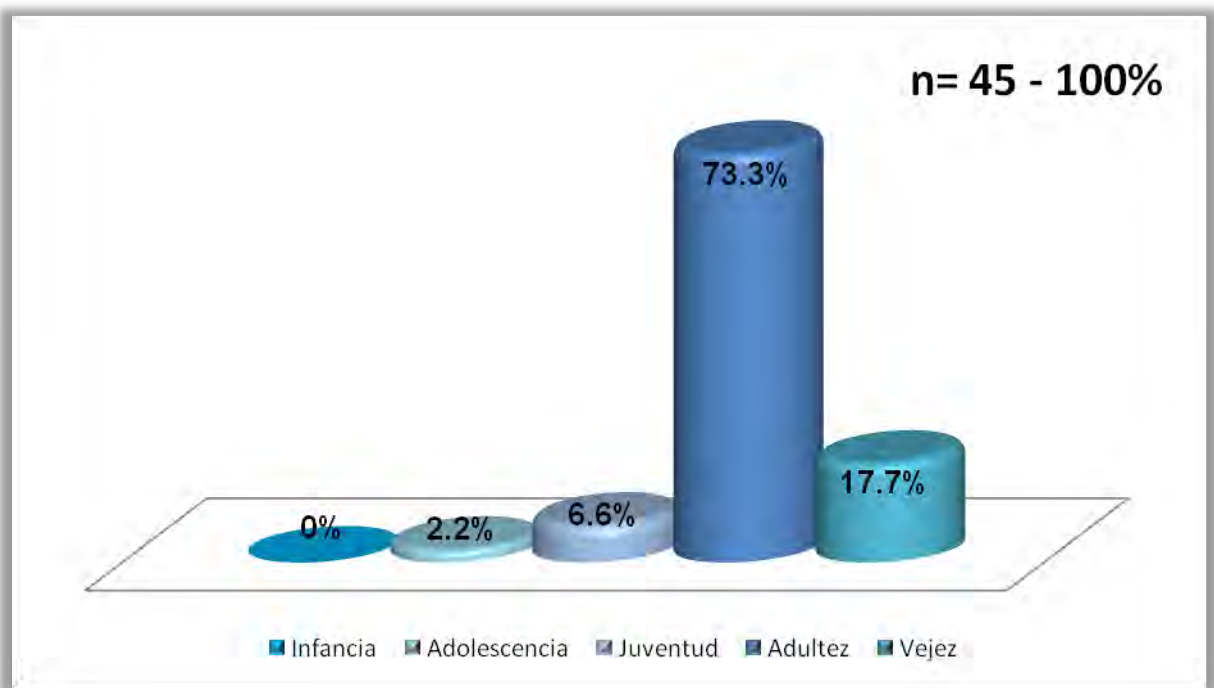


Fig. 9 Distribución de *M. tuberculosis* farmacorresistente por grupos de edad.

De los 45 aislados de TB-MDR; 29 correspondían a pacientes pertenecientes al sexo masculino, lo que representa un porcentaje del 64%; los 16 aislados restantes pertenecieron a pacientes del sexo femenino mostrando un menor porcentaje con un 34%, como se muestra en la figura 10.



Fig. 10. Distribución de los aislados de *M. tuberculosis* MDR por género de los pacientes.

En la figura 11 se observa que un 40% (18 aislados) mostraron resistencia a 2 fármacos de primera línea, 35.5% (16 aislados) a 3 fármacos, un 15.5% (7 aislados) tienen resistencia a 4 fármacos y un 8.8% (4 aislados) son resistentes a los 5 fármacos que conforman el esquema de primera línea.

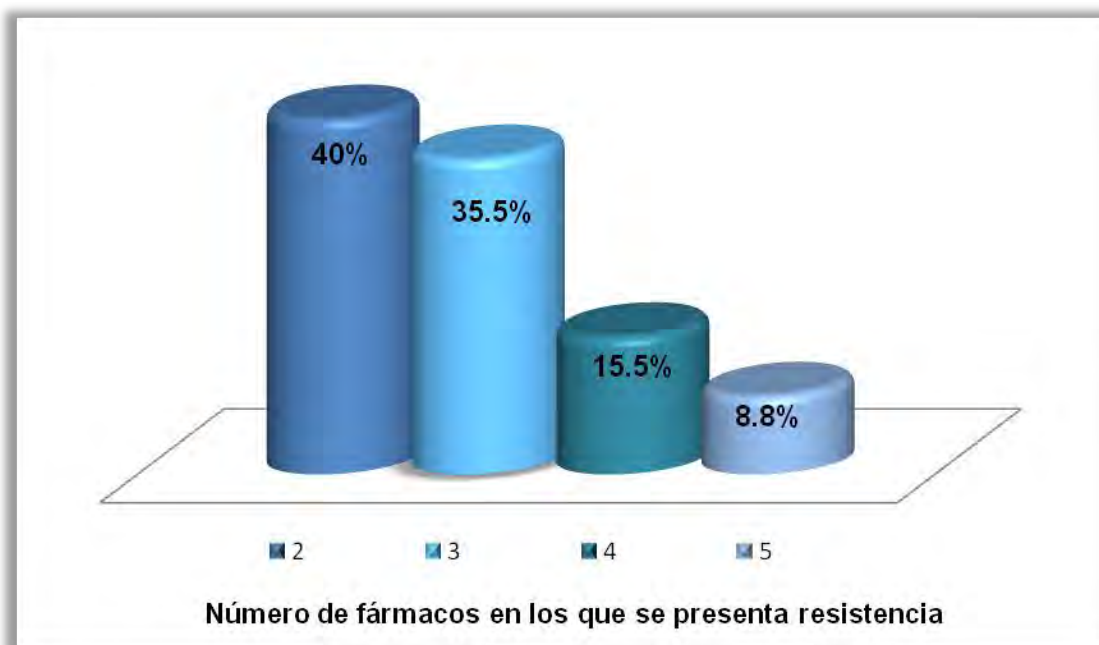


Figura 11. Distribución de aislados de *M. tuberculosis* por resistencia a SIREZ. 2R= dos resistencias, 3R= tres resistencias, 4R= cuatro resistencias, 5R= cinco resistencias.

De los 45 aislados estudiados, el 40% solo eran MDR, es decir, solo mostraron resistencia a isoniazida y rifampicina a la vez; el resto de los aislados aparte de ser MDR presentaron resistencia a uno, dos o tres de los fármacos restantes en el tratamiento de primera línea, 21.7% eran MDR y expresaban también resistencia a estreptomicina; un 6.5% de los aislados tuvieron resistencia MDR + etambutol, un 6.5% fueron MDR + resistencia a pirazinamida, un 6.5% fueron MDR + resistencia a estreptomicina y pirazinamida, un 4.3% fue MDR + estreptomicina y etambutol, un 4.3% de los aislados seleccionados fueron MDR + resistencia a estreptomicina y pirazinamida; solo el 8.6% de los aislados TB-MDR fueron resistentes a los 5 fármacos que conforman el esquema de tratamiento de primera línea, es decir, eran resistentes a rifampicina, isoniazida, estreptomicina, etambutol y pirazinamida; todo esto puede verse en la tabla 7.

Tabla 7. Patrón de resistencia a fármacos en aislados de *M. tuberculosis*.

Resistencia	No.	%	Patrón de Resistencia
2	18	40	I + R
3	10	21.7	S + I + R
3	3	6.5	I + R + E
3	3	6.5	I + R + Z
4	2	4.3	S + I + R + E
4	3	6.5	S + I + R + Z
4	2	4.3	I + R + E + Z
5	4	8.6	S + I + R + E + Z

45 MDR

Patrón de resistencia de aislados de *M. tuberculosis* SIREZ (S: Estreptomicina, I: Isoniazida, R: Rifampicina, E: Etambutol, Z: Pirazinamida).

7.2. Determinación de la mutación que le confiere resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis*.

En el electroferograma de la figura 12 se muestran algunos aislados que presentan mutaciones en el codón 516 del gen *rpoβ*, la cual se ve representada por la ausencia de la banda de talla molecular de 260 pb y la presencia de la banda control de 537 pb.

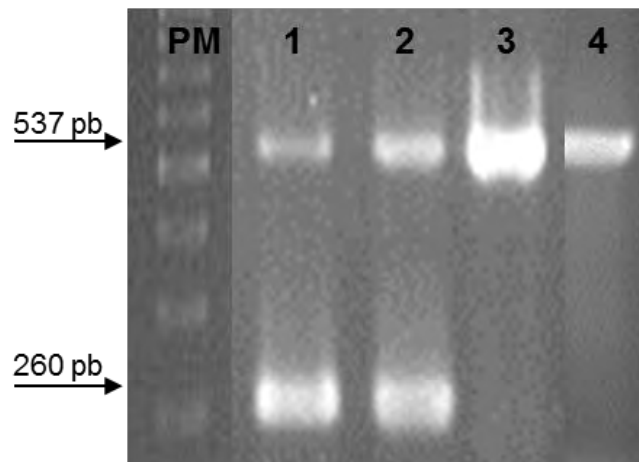


Fig. 12. Electroferograma representativo de la PCR-ARMS para el codón 516 del gen *rpoβ*. PM: marcador de peso molecular; Carril 1: *M. tuberculosis* H37Rv, carril 2: no mutación, carril 3 y 4: mutación en 516.

En la figura 13 se muestra el electroferograma que representa las mutaciones en el codón 526 del gen *rpoβ*, se dice que existe mutación en este gen cuando se nota la ausencia de la banda de 260 pb y se observa una banda testigo cuya talla molecular es de 537 pb.

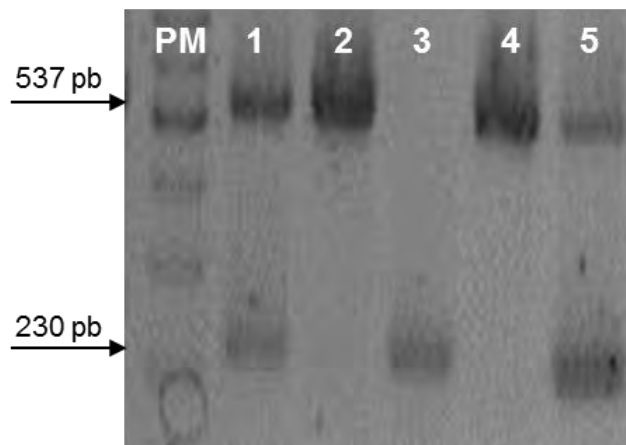


Fig. 13. Electroferograma representativo de la PCR-ARMS para el codón 526 del gen *rpoB*.
 PM: marcador de peso molecular; Carril 1: *M. tuberculosis* H37Rv, carril 2 y 4: mutación en 526, carril 3 y 5: no mutación.

Las mutaciones en en el codón 531 del gen *rpoB* se ven representadas en el electroferograma de la figura 14, en donde se visualiza una mutación cuando esta ausente la banda de talla molecular de 216 pb y solo se presencia la banda de 537 pb.

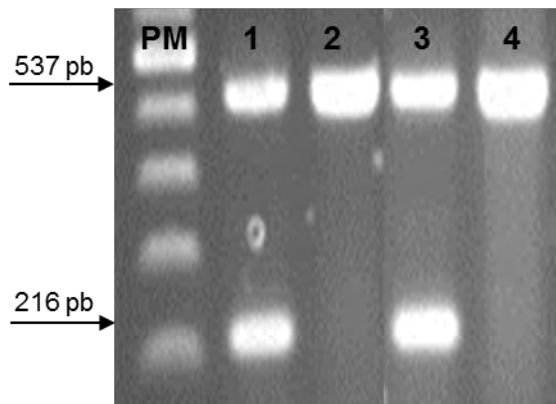


Fig. 14. Electroferograma representativo de la PCR-ARMS para el codón 531 del gen *rpoB*.
 PM: marcador de peso molecular; Carril 1: *M. tuberculosis* H37Rv, carril 2 y 4: mutación en 531, carril 3: no mutación.

En análisis de distribución del gen *rpoB* que confiere resistencia para rifampicina mostró que la mayoría de los aislados evaluados presentaban mutación en el codón 531 con un 46.66%, seguido de un 13.33% que mostraba mutación en el codón 526 y en menor porcentaje se percibió una mutación en el codón 516 con un 6.66% y se encontró un aislado que poseía una doble mutación y esto representó un 2.22%(Fig. 15). Un 28.8% de los resultados fueron negativos en

esta prueba, es decir, que no se mostró amplificación alguna, esto puede indicar que la mutación se encuentra en algún otro codón del gen *rpoβ*, información que tendrá que ser confirmada mediante secuenciación.

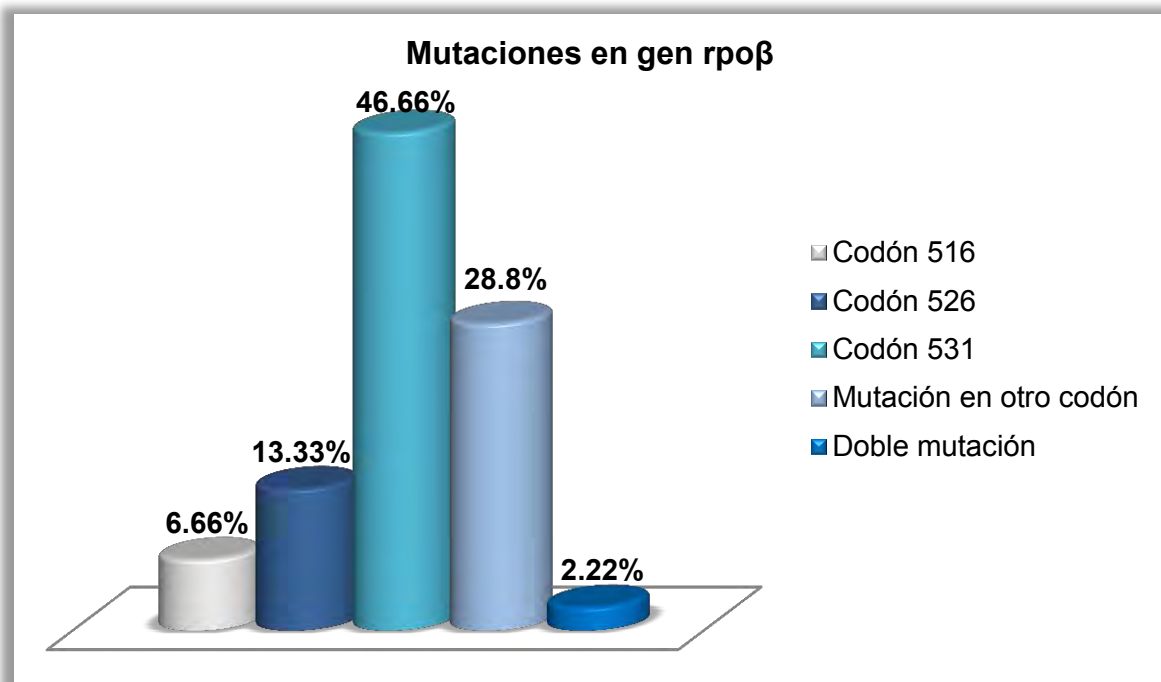


Fig. 15. Frecuencia de mutaciones en distintos codones del gen *rpoβ* utilizando una técnica de PCR alelo específica para detectar mutaciones.

Al utilizar la PCR-ARMS se pudieron encontrar mutaciones en un 71.2% (de los 45 aislados *M. tuberculosis* MDR que se estudiaron) en alguno de los codones del gen *rpoβ*, estos resultados pueden observarse en la figura 16, el 28.8% restante no se pudo determinar la mutación con esta técnica, dado que se necesitan otro tipo de iniciadores u otra técnica que pueda determinar en que codón del gen *rpoβ* se encuentra la mutación que le confiere resistencia a RIF.

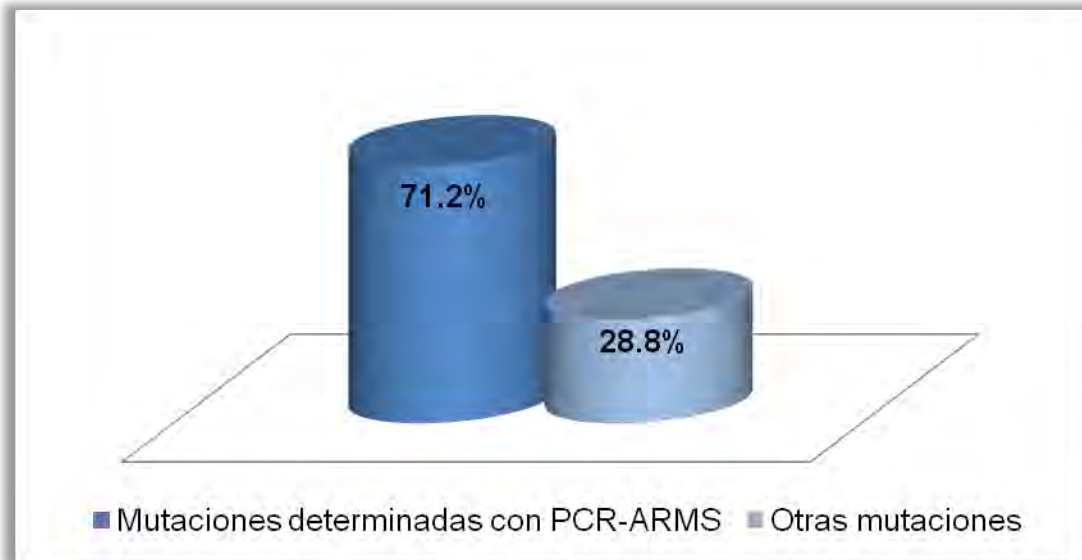


Fig. 16. Frecuencia de mutaciones del gen *rpoβ* determinadas utilizando la PCR-ARMS

7.3. Determinación de la mutación que le confiere resistencia a isoniazida en *M. tuberculosis*.

En el electroferograma de la figura 17 se muestran algunas cepas de *M. tuberculosis* MDR en donde se observan algunas cepas con mutación en el gen *katG* y otra cepa con mutación en el operón *mabA-inhA*. La mutación en el gen *katG* se detecta cuando se observa una banda con un talla molecular de 296 pb, si se presenta una banda cuya talla molecular es de 143 pb se dice que se trata de una mutación en el operón *mabA-inhA*, en ambas mutaciones aparece una banda control de 1020 pb.

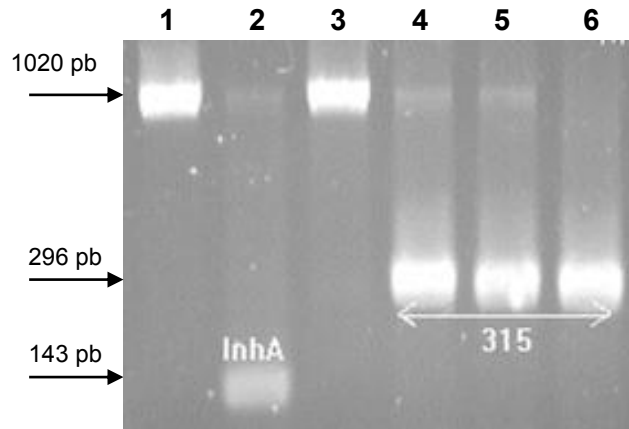


Fig. 17. Electroferograma representativo de la PCR *multiplex* para los genes *katG* y el operón *mabA – inhA* en aislados de *M. tuberculosis* MDR. Carril 1: Cepa de referencia H37R, carril 2: mutación en operón *mabA – inhA*, carril 3: no mutación, carril 4→6: mutación en el gen *katG*.

Los resultados arrojados tras utilizar la PCR *multiplex*, observados en la figura 18, nos indican que un 46.7% de los aislados de *M. tuberculosis* MDR presentan una mutación en el gen *katG*, un 15.6% presentan mutación en el operón *mabA-inhA*, mientras un 37.8% de los resultados fueron negativos, ya que no presenta mutación en ninguno de estos dos sitios, posiblemente porque la mutación se encuentre en algún otro sitio, esto puede ser confirmado tras llevarse a cabo una secuenciación.

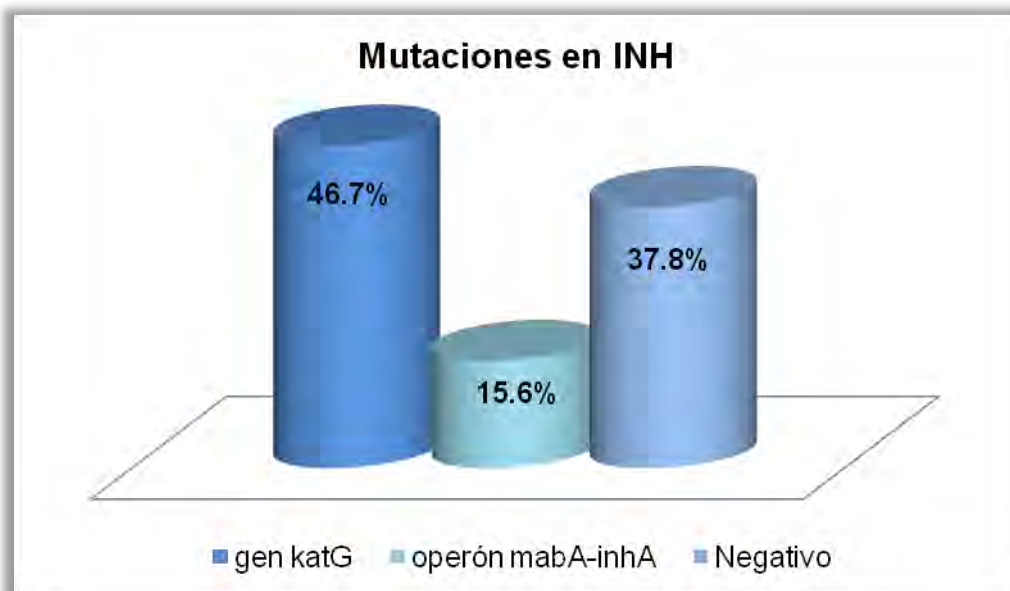


Fig. 18. Frecuencia de mutaciones en gen *katG* y en el operón *mabA-inhA*, que confieren resistencia a INH en aislados de *M. tuberculosis*.

Para para los aislados que presentaban mutación en el gen *katG*, se les realizó una digestión con la enzima *MspI*, la cual nos indica la posición en el gen donde se encuentra la mutación que le otorga al bacilo resistencia a isoniazida. El electroferograma presentado en la figura 19 muestra algunas de las mutaciones que otorgan resistencia a isoniazida; cuando se presenta una mutación S315T del gen *katG* se observan bandas de 228 y 137pb, si la mutación es R463L se aprecian las bandas de 228, 202 y 153 pb, pero si la mutación es tanto en S315T y R463L se muestran las bandas de 228, 202 y 137 pb.

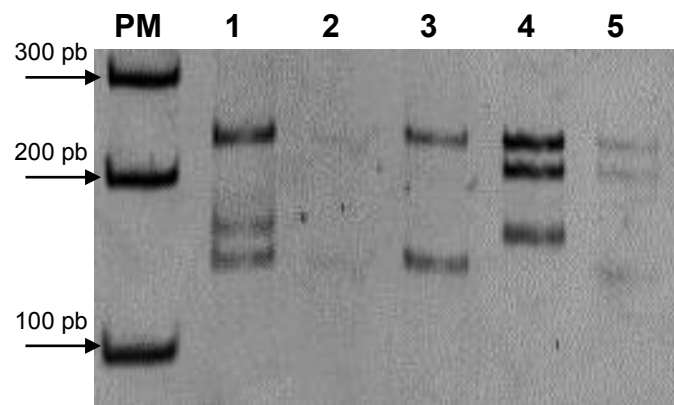


Fig. 19. Electroferograma del gen *katG* digerido con la enzima *MspI*. PM: Marcador de Peso Molecular; carril 1: Cepa de referencia, H37Rv, carril 2 y 3: mutación en 315, carril 4: mutación en 463 y carril 5: mutación 315 - 463.

Tras digestión con la enzima *MspI* se noto que un 31.1% de los aislados de *M. tuberculosis* MDR presentan una mutación (S-T, $AGC \rightarrow ACC$) en la posición 315 del gen, un 17.8% en la posición 463, un 4.4% presentaron una mutación tanto en 315 como en 463, un 15.6% de los aislados presentaron la sustitución C-15T de la región promotora del operón *mabA - inhA* (mencionado anteriormente) y un 26.7% de los resultados fueron negativos, puesto que no se presentó mutación en ninguno de estos sitios, esto se puede deber a que la mutación se encuentra en algún otro sitio del gen *katG*, para conocer el sitio exacto de la mutación se requiere someter la muestra a una secuenciación, los resultados anteriores pueden observarse en la figura 20.

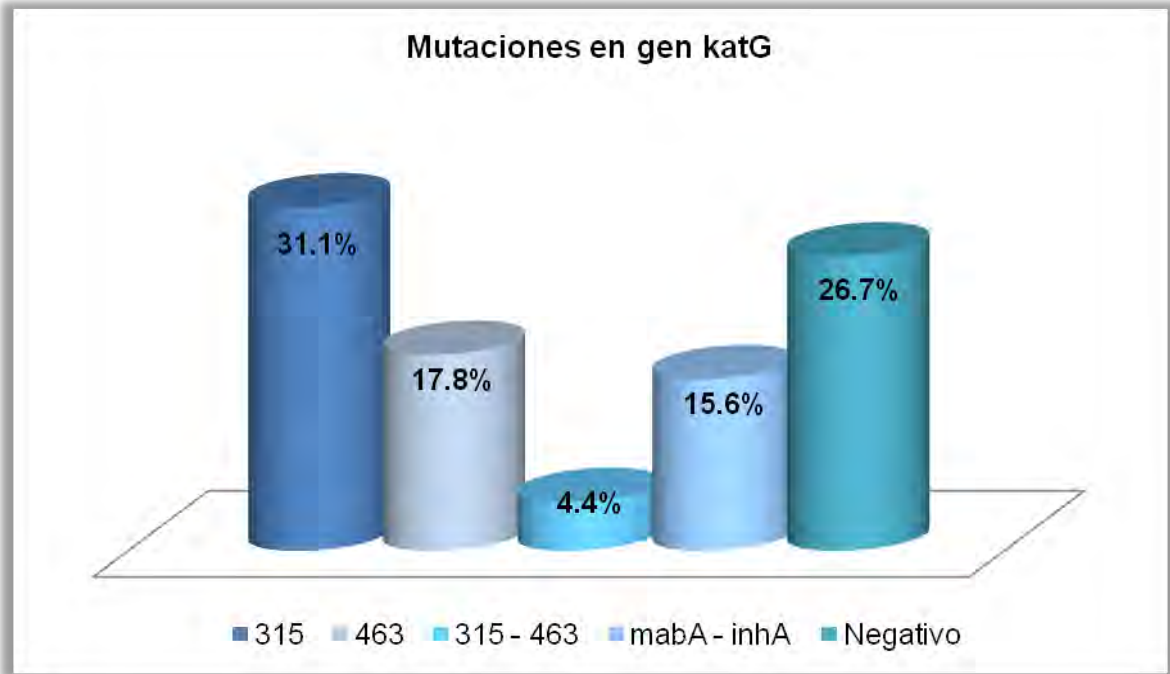


Fig. 20. Frecuencia de las mutaciones representativas que confieren resistencia a INH a cepas de *M. tuberculosis* MDR.

7.4. Genotipificación mediante MIRU-VNTR

Se realizó la caracterización genotípica utilizando los 12 pares de iniciadores que amplifican cada uno de los 12 loci génicos MIRU-VNTR de mayor variabilidad. Los productos de amplificación de cada uno de los 12 loci génicos fueron separados utilizando geles de agarosa al 2%. Al determinar el tamaño en cada una de las bandas obtenidas en cada locus génico se logró saber el número de copias correspondiente, con el cual se definió el código MIRUs para cada aislado. En la figura 21 se puede observar el electroferograma de algunas cepas *M. tuberculosis* MDR, así como el código MIRUs asignado.

Tras asignar un código MIRUs a cada aislado TB-MDR, se procedió a introducir los resultados obtenidos a la base de datos internacional MIRU-VNTR *plus*, en donde se conoció el linaje correspondiente a cada aislado, como se puede observar en la tabla 8.

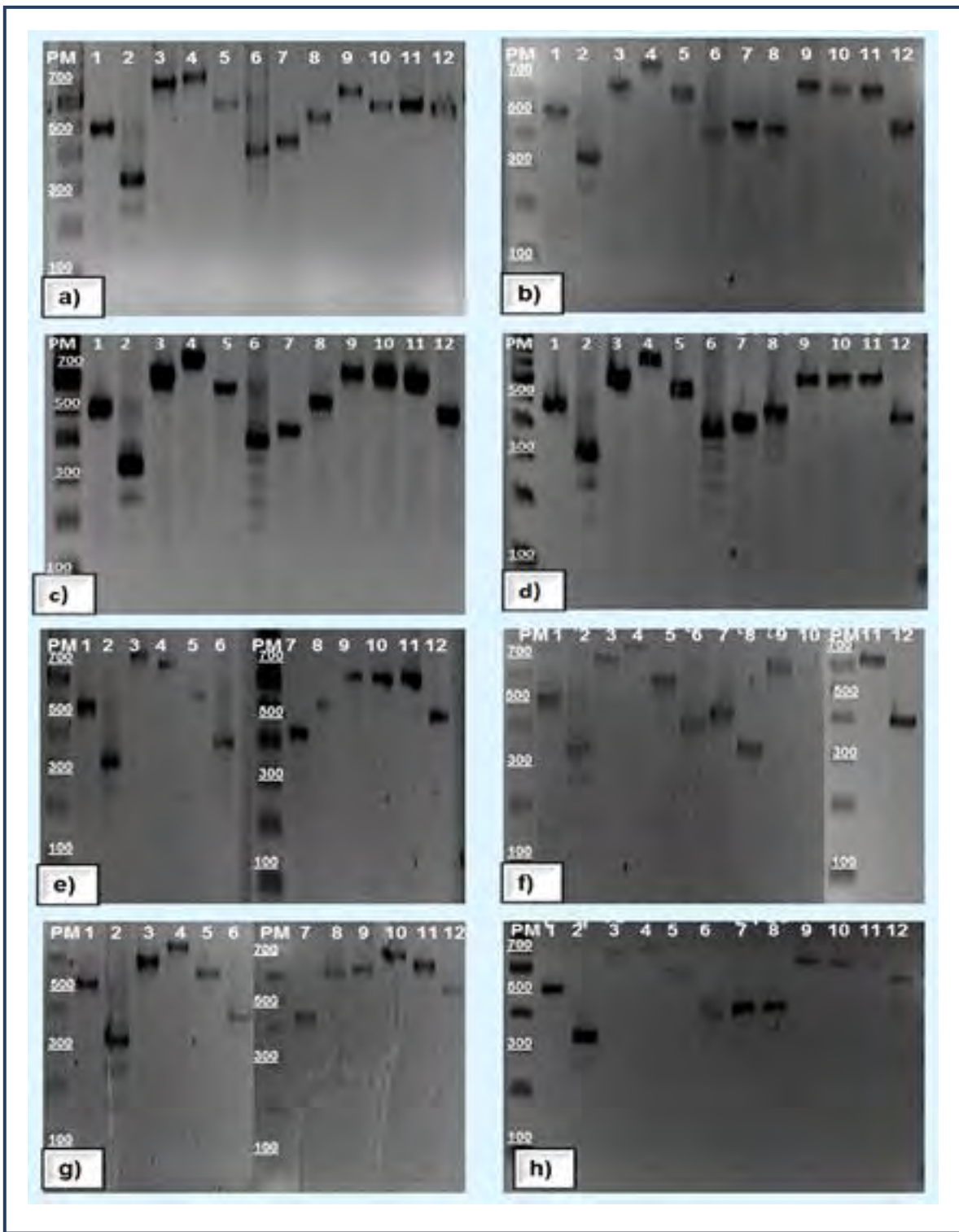


Fig. 21. Electroferogramas de MIRUs representativos de las diferentes cepas de *M. tuberculosis* MDR seleccionados en la ENFR.a) Baja California 1500, código MIRUs 224325153214; b) Baja California 535, código MIRUs 223325133322; c) Estado de México 1617, código MIRUs 223325153323; d) Estado de México 337, código MIRUs 123324143322 ;e) Estado de México 1372, código MIRUs 225214153322; f) Sinaloa 1197, código MIRUs 224425113321; g) San Luis Potosí 893, código MIRUs 222224173534; h) Yucatán 1571, código MIRUs 224325133324. Carril 1 MIRUs 2, Carril 2 MIRUs 4, Carril 3 MIRUs 10, Carril 4 MIRUs 16, Carril 5 MIRUs 20, Carril 6 MIRUs 23, Carril 7 MIRUs 24, Carril 8 MIRUs 26, Carril 9 MIRUs 27, Carril 10 MIRUs 31, Carril 11 MIRUs 39, Carril 12 MIRUs 40.

Tabla 8. MIRU-VNTR de los 45 aislados *M. tuberculosis* MDR

Estado	Num. Lab.	SIREZ	PCR rpoB	PCR RFLP	PCR múltiplex	MIRUS	Linaje
BC	421	SRRSS	531	NM	NM	224425124431	H
BC	481	SRRRR	531	315	315	224226133321	LAM
BC	535	SRRSS	NM	NM	315	223325143322	Ghana
BC	1056	SRRSS	516	463	mabA-inhA	225325153323	Beijing
BC	1078	SRRSS	NM	463	315	223325153331	Beijing
BC	1500	RRRSR	531	315	315	224325153214	LAM
BC	1868	RRRSS	526	315-463	mabA-inhA	223325173434	Beijing
BC	1880	RRRSR	516	315	315	223325153223	Uganda I
BC	1942	RRRRS	531	315-463	315	223325173534	Beijing
BC	2230	SRRSR	531	NM	NM	124427163325	H
BC	2585	SRRRS	531	NM	mabA-inhA	233325153324	S
CHIH	622	SRRSS	NM	NM	NM	223425143322	Uganda I
CHIH	2117	SRRRS	531	NM	NM	223425113211	H
CHIH	2773	RRRSS	NM	NM	315	225126153321	LAM
GTO	521	RRRSS	531	463	315	254326223432	EAI
GTO	1750	SRRRS	531	315	315	223326143321	LAM
GTO	1993	RRRSR	531/526	NM	mabA-inhA	125225153322	H
GTO	2357	SRRSS	531	315	315	225325153322	Haarlem
GTO	2718	RRRSS	531	NM	mabA-inhA	225325153323	Haarlem
MEX	194	SRRSS	531	NM	NM	225325153324	H
MEX	337	RRRSS	516	NM	NM	223425143322	Uganda I
MEX	897	RRRRR	NM	NM	NM	232124233222	Bovis
MEX	932	SRRSS	NM	NM	315	225325153323	Haarlem
MEX	998	SRRSR	531	463	NM	221114152210	H
MEX	1023	RRRRR	526	463	NM	223425143322	H
MEX	1372	RRRSS	526	NM	mabA-inhA	225234153322	Haarlem
MEX	1396	SRRSS	531	NM	mabA-inhA	225325153323	Haarlem
MEX	1617	RRRRR	531	463	NM	223325153323	Beijing
MEX	2806	SRRRR	531	463	NM	232224243322	Bovis
MOR	500	SRRSS	NM	463	NM	2543210223533	EAI
QRO	2016	SRRSS	NM	NM	NM	222226143323	LAM
SIN	136	SRRSS	531	315	315	223325143223	H
SIN	282	RRRSS	526	315	315	223326153322	X
SIN	667	SRRSS	531	NM	NM	222325153323	Haarlem
SIN	1091	SRRSS	NM	315	315	245435154432	H
SIN	1197	SRRSS	531	NM	NM	224425113321	H
SIN	1790	SRRSS	NM	NM	NM	223326152423	H
SIN	1902	RRRSS	NM	315	315	224325143322	Haarlem
SLP	48E	SRRSR	531	NM	315	223425164322	H
SLP	812	SRRSS	NM	315	315	224126163321	LAM
SLP	893	RRRSS	NM	315	315	222214173423	H
YUC	752	SRRSS	526	315	315	223326153323	LAM
YUC	1571	RRRRR	531	NM	NM	224326143324	LAM
YUC	1983	RRRSS	531	315	315	224425152514	H
YUC	1984	RRRRS	526	315	315	224326135421	H
H37Rv*	H37rv	SSSSS	WT	WT	WT	223226133321	H37Rv

*Cepa de Referencia, S: Estreptomina, I: Isoniazida, R: Rifampicina, E: Etambutol, Z: Pirazinamida, ND: No Determinado, NM: No Mutación, H: Huérfana, WT: Wild Type.

En la figura 22 se visualiza el cambio de intensidad de color azul de los recuadros, el cual muestra el grado de variabilidad de cada MIRUs analizado.

Dentro de los locus que mostraron una mayor variabilidad se encuentran el 10, 16, 23, 26 y 40.

ID	Species	Lineage	10	154 MIRU02	190 MIRU04	202 MIRU40	260 MIRU10	344 MIRU16	2059 MIRU20	2531 MIRU23	2687 MIRU24	296 MIRU26	3007 MIRU27	3192 MIRU31	4048 MIRU39	40
BC	1056A(u)	Beijing(u)	2	2	3	5	3	2	5	1	5	3	3	2		
BC	1078A(u)	Beijing(u)	2	2	1	3	3	2	5	1	5	3	3	3		
BC	1500E(u)	LAM(u)	2	2	4	4	3	2	5	1	5	3	2	1		
BC	1868A(u)	Beijing(u)	2	2	4	3	3	2	5	1	7	3	4	3		
BC	1880E(u)	Uganda I(u)	2	2	3	3	3	2	5	1	5	3	2	2		
BC	1942E(u)	Beijing(u)	2	2	4	3	3	2	5	1	7	3	5	3		
BC	2230E(u)		1	2	5	4	4	2	7	1	6	3	3	2		
BC	2585E(u)	S(u)	2	3	4	3	3	2	5	1	5	3	3	2		
BC	421E(u)		2	2	1	4	4	2	5	1	2	4	4	3		
BC	481E(u)	LAM(u)	2	2	1	4	2	2	6	1	3	3	3	2		
BC	535A(u)	Ghana(u)	2	2	2	3	3	2	5	1	4	3	3	2		
CHIH	2117E(u)		2	2	1	3	4	2	5	1	1	3	2	1		
CHIH	2773E(u)	LAM(u)	2	2	1	5	1	2	6	1	5	3	3	2		
CHIH	622E(u)	Uganda I(u)	2	2	2	3	4	2	5	1	4	3	3	2		
GTO	1750E(u)	LAM(u)	2	2	1	3	3	2	6	1	4	3	3	2		
GTO	1993E(u)		1	2	2	5	2	2	5	1	5	3	3	2		
GTO	2357E(u)	Haarlem(u)	2	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2		
GTO	2718A(u)	Haarlem(u)	2	2	3	5	3	2	5	1	5	3	3	2		
GTO	521A(u)	EAI(u)	2	5	2	4	3	2	6	2	2	3	4	3		
H37rv	H37rv(u)	H37Rv(u)	2	3	1	3	2	2	6	1	3	3	3	2		
MEX	1023E(u)		2	2	2	3	4	2	5	1	4	3	3	2		
MEX	1372E(u)	Haarlem(u)	2	2	2	5	2	3	4	1	5	3	3	2		
MEX	1396E(u)	Haarlem(u)	2	2	3	5	3	2	5	1	5	3	3	2		
MEX	1617E(u)	Beijing(u)	2	2	3	3	3	2	5	1	5	3	3	2		
MEX	194E(u)		2	2	4	5	3	2	5	1	5	3	3	2		
MEX	2806 A/E(u)	Bovis(u)	2	3	2	2	2	2	4	2	4	3	3	2		
MEX	337 A/E(u)	Uganda I(u)	2	2	2	3	4	2	5	1	4	3	3	2		
MEX	897 E(u)	Bovis(u)	2	3	2	2	1	2	4	2	3	3	2	2		
MEX	932E(u)	Haarlem(u)	2	2	3	5	3	2	5	1	5	3	3	2		
MEX	998 A/E(u)		2	2	0	1	1	1	4	1	5	2	2	1		
MOR	500A(u)	EAI(u)	?	2	5	3	4	3	2	2	2	2	3	5	3	
QRO	2016A(u)	LAM(u)	?	2	2	3	2	2	2	6	1	4	3	3	2	
SIN	1091E(u)		?	2	4	2	5	4	3	5	1	5	4	4	3	
SIN	1197 A/E(u)		?	2	2	1	4	4	2	5	1	1	3	3	2	
SIN	136E(u)		?	2	2	3	3	3	2	5	1	4	3	2	2	
SIN	1790A(u)		?	2	2	3	3	3	2	6	1	5	2	4	2	
SIN	1902E(u)	Haarlem(u)	?	2	2	2	4	3	2	5	1	4	3	3	2	
SIN	282E(u)	X(u)	?	2	2	2	3	3	2	6	1	5	3	3	2	
SIN	667E(u)	Haarlem(u)	?	2	2	3	2	3	2	5	1	5	3	3	2	
SLP	48E(u)		?	2	2	2	3	4	2	5	1	6	4	3	2	
SLP	812A(u)	LAM(u)	?	2	2	1	4	1	2	6	1	6	3	3	2	
SLP	893E(u)		?	2	2	3	2	2	1	4	1	7	3	4	2	
YUC	1571 A(u)	LAM(u)	?	2	2	4	4	3	2	6	1	4	3	3	2	
YUC	1983E(u)		?	2	2	4	4	4	2	5	1	5	2	5	1	
YUC	1984E(u)		?	2	2	1	4	3	2	6	1	3	5	4	2	
YUC	752E(u)	LAM(u)	?	2	2	3	3	3	2	6	1	5	3	3	2	

Fig. 22. Análisis genotípico de aislados MDR de *M. tuberculosis* con el programa MIRU-VNTR plus.

7.5. Agrupación en linajes de aislados de *M. tuberculosis* MDR por MIRU-VNTR

El análisis por MIRU-VNTR, permitió clasificar los aislados de *M. tuberculosis* MDR, encontrándose que el 66.7% (30 de los 45 aislados) pudieron ser identificadas, como se observa en la figura 23, mientras que el 33.3% presentaron patrones que no se encuentran en la base de datos MIRUS-VNTR *plus* (tipo huérfanos). Los aislados que pudieron ser identificados por MIRUS-VNTR *plus* correspondieron a las siguientes familias: LAM, Ghana, Beijing, Uganda I, S, EAI, Haarlem, Bovis y X, como se observa en la figura 24.

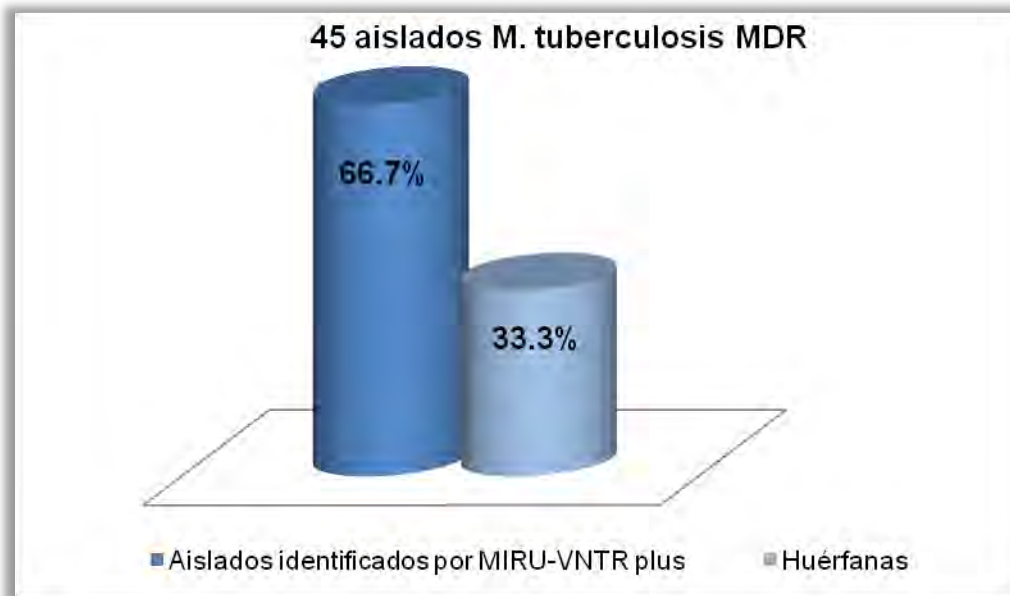


Fig. 23. Aislados *M. tuberculosis* MDR identificados utilizando MIRU-VNTR *plus*.

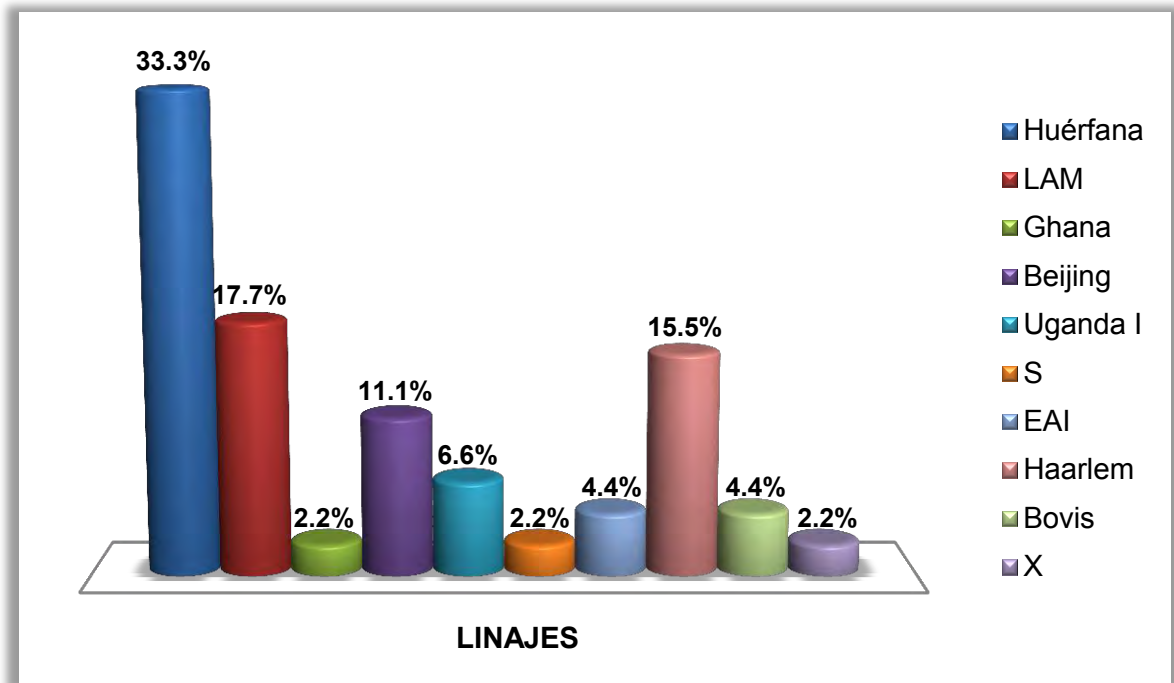


Fig. 24. Frecuencia de linajes de *M. tuberculosis* MDR

En la tabla 9 se visualiza que 16 aislados de *M. tuberculosis* MDR correspondían al género femenino, de los cuales tras analizar con MIRU-VNTR *plus* pudieron ser identificadas las familias: Ghana, LAM, Beijing, EAI y Haarlem. Los 29 aislados *M. tuberculosis* MDR correspondientes al género masculino, cuyo análisis con MIRU-VNTR *plus* identifico a las familias: Beijing, LAM, Uganda I, S, Haarlem, Bovis, X y EAI.

En la tabla 10 se observa los linajes encontradas con respecto a cada grupo de edad, aquí se visualiza que la adultez es el grupo de edad que se encuentra más en riesgo, encontrándose aquí la mayoría de las familias identificadas en este estudio; algo notable es la presencia de la familia LAM en todos los grupos de edad (con excepción de la infancia, pues que no se selecciono ningún aislado en la ENFR).

Tabla 9. Relación Linaje- Género.

LINAJE	Núm. de Aislados	Masculino	Femenino
Huérfanas	15	10	5
LAM	8	4	4
Haarlem	7	4	3
Beijing	5	3	2
Uganda I	3	3	-
EAI	2	1	1
Bovis	2	2	-
Ghana	1	-	1
S	1	1	-
X	1	1	-
Total	45	29	16

Tabla 10. Relación Linaje- Grupo de edad.

Grupos de Edad	Linajes	Núm. de aislados
Infancia (0-11 años)	-	-
Adolescencia (12-18 años)	LAM	1
Juventud (26-60 años)	LAM	1
	Huérfanas	2
Adultez (26-60 años)	Ghana	1
	Beijing	2
	Uganda	3
	LAM	4
	EAI	2
	Haarlem	7
	Bovis	2
	X	1
	Huérfanas	8
Vejez (> 60 años)	LAM	2
	S	1
	Huérfanas	5

La relación linaje- patrón de resistencia a fármacos antituberculosis se observa en la tabla 11, aquí se visualiza que no existe un patrón de resistencia definido para cada uno de los distintos linajes. Los aislados pueden ser resistentes solo a los 2 principales fármacos (INH y RIF) o los 5 fármacos que comprenden el tratamiento de primera línea, y aun así pertenecer a una misma familia.

Tabla 11. Relación Linaje–Patrón de Resistencia

Aislado	SIREZ	Linaje
YUC 1571	RRRRR	LAM
BC 481	SRRRR	LAM
BC 1500	RRRSR	LAM
CHIH 2773	RRRSS	LAM
GTO 1750	SRRRS	LAM
QRO 2016	SRRSS	LAM
SLP 812	SRRSS	LAM
YUC 752	SRRSS	LAM
GTO 2718	RRRSS	Haarlem
MEX 1372	RRRSS	Haarlem
SIN 1902	RRRSS	Haarlem
GTO 2357	SRRSS	Haarlem
MEX 932	SRRSS	Haarlem
MEX 1396	SRRSS	Haarlem
SIN 667	SRRSS	Haarlem
MEX 1617	RRRRR	Beijing
BC 1942	RRRRS	Beijing
BC 1868	RRRSS	Beijing
BC 1056	SRRSS	Beijing
BC 1078	SRRSS	Beijing
BC 1880	RRRSR	Uganda I
MEX 337	RRRSS	Uganda I
CHIH 622	SRRSS	Uganda I
GTO 521	RRRSS	EAI
MOR 500	SRRSS	EAI
MEX 897	RRRRR	Bovis
MEX 2806	SRRRR	Bovis
BC 2585	SRRRS	S
SIN 282	RRRSS	X
BC 535	SRRSS	Ghana
H37Rv*	SSSSS	H37Rv

*Cepa de Referencia, S: Estreptomicina, I: Isoniazida, R: Rifampicina, E: Etambutol, Z: Pirazinamida

La variabilidad de linajes con respecto a cada estado seleccionado por la ENFR nos muestra que en Baja California la familia que se encuentra en un mayor porcentaje es Beijing, seguida de LAM y en un menor porcentaje se encuentra a Ghana, Uganda I y S, también se encontraron aislados huérfanos; para Chihuahua dado que solo se contaba con 3 aislados solo se mostro la presencia de la familia LAM, Uganda I y una cepa huérfana; en Guanajuato, Haarlem fue la familia que se mostro en mayor porcentaje, seguida en una misma proporción de EAI, LAM y una cepa huérfana; en tanto que para Morelos solo se presento un aislado *M.*

tuberculosis MDR el cual correspondía a la familia EAI; para Querétaro se identifico la familia LAM en la única muestra seleccionada por la ENFR; en el estado de México se identificaron a las familias Haarlem en mayor porcentaje, seguidas de Bovis y aislados huérfanos, y en un menor porcentaje se encontró a Beijing y Uganda; para Sinaloa se encontró a la familia X, Haarlem y cepas huérfana; en San Luis Potosí se identifico a la familia LAM y un aislado huérfano; por último en Yucatán se identifico a la familia LAM y aislados huérfanos; todos estos resultados se observan en tabla 12.

Tabla 12. Variabilidad de linajes en los estados seleccionados en la ENFR.

ESTADOS	LINAJE	NÚM. DE AISLADOS
Baja California	LAM	2
	Ghana	1
	Beijing	4
	Uganda I	1
	S	1
	Huérfanas	2
Chihuahua	LAM	1
	Uganda I	1
	Huérfana	1
Guanajuato	LAM	1
	EAI	1
	Haarlem	2
	Huérfana	1
Estado de México	Beijing	1
	Haarlem	3
	Uganda I	1
	Bovis	2
	Huérfanas	3
Morelos	EAI	1
Querétaro	LAM	1
Sinaloa	Haarlem	2
	X	1
	Huérfanas	4
San Luis Potosí	LAM	1
	Huérfanas	2
Yucatán	LAM	2
	Huérfanas	2

Con respecto a la distribución de los linajes que se encuentran en la República Mexicana de acuerdo a los aislados seleccionados en ENFR, véase tabla 12, apreciamos que la familia de Bovis, Ghana, S, y X solo se encuentran en un estado de la República; mientras que Beijing, Uganda I, EAI, y Haarlem se encuentran distribuidos en varios estados; también podemos notar que la distribución de la familia LAM y las muestras huérfanas se encuentran distribuidas en casi todos los estados seleccionados.

8. DISCUSIÓN

La tuberculosis (TB) continúa siendo un grave problema de salud pública en el mundo y México no es la excepción. A pesar de la implementación de tratamientos con fármacos antituberculosis, la aparición de cepas resistentes y multifarmacorresistentes, se ha comprometido la eficacia del tratamiento. Esta enfermedad afecta cada año a 9.4 millones de personas y mata a 1.7 millones en el mundo. El diagnóstico, la quimioterapia y la vacunación están disponibles, sin embargo, la enfermedad está lejos de ser erradicada. Brudey y colaboradores en el 2006 plantearon la hipótesis que la co-evolución entre el ser humano y los bacilos, así como la transmisión vertical, deben haber sido el principal modo de transmisión de la TB a lo largo de siglos e incluso milenios.

Es importante el conocer el perfil de resistencia y tipo de cepa circulante para así poder identificar los principales focos de infección y desarrollar mejores estrategias de control y manejo de pacientes farmacorresistentes, con el fin de poder romper la cadena de transmisión. La TB afecta principalmente a la población que se encuentra en condiciones vulnerables de adquirir la enfermedad, como es el caso de los migrantes, presos, los indigentes y pacientes con inmunodeficiencias. (Martínez JA, 2010)

Por lo tanto, este estudio se basó en caracterizar a nivel molecular 45 aislados de *M. tuberculosis* MDR provenientes de diversos estados de la República Mexicana, los cuales fueron seleccionados por la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en Tuberculosis en México llevado a cabo durante el período 2008-2009, esto se realizó con el fin de conocer los linajes circulantes en nuestro país, identificándolos a nivel molecular por la técnica MIRU-VNTR; como datos adicionales se considero el conocer las mutaciones en los genes que le confieren a la micobacteria resistencia a INH (isoniazida) y RIF (rifampicina). La información resultante será relevante para apoyar la implementación de mejores estrategias de prevención y

control de la TB-MDR dentro del país y de esta forma contribuir al control de la TB-FR.

En la población analizada, se observaron los datos demográficos de los pacientes, los cuales se encontraban en un rango de edad de los 18 a los 81 años; con una relación 1:2 mujer por cada hombre lo cual coincide con lo reportado por la OMS y la Secretaría de Salud en México. (URL 6) Como vemos la TB sigue siendo más frecuente en personas del sexo masculino, aunque varía de un lugar a otro, lo que puede deberse a factores sociales y de comportamiento. (URL 4) Esta enfermedad afecta en gran proporción a la población económicamente activa, perdiendo así años productivos. Por lo anterior se debe realizar mayor énfasis en la detección oportuna de tuberculosis en todas sus formas, lo que repercutirá en elevar la calidad de vida de la población mexicana, así como en incrementar el desarrollo del país al tener menor pérdida de muertes por esta causa en la población económicamente activa. (URL 10)

La resistencia a fármacos antituberculosis es un problema muy complejo y grave; en estudios realizados en distintas regiones y países como Perú (Agapito J. y col. 2003) Argentina, (De la Iglesia I. y Morbidoni HR. 2006) EUA, (Kapur V.. y col. 1994) Singapur, (Ong D. y col. 2012) por mencionar algunos; se ha demostrado farmacorresistencia en todas las regiones del mundo. Por lo cual, una de las primeras observaciones realizadas en el presente estudio, fue la caracterización molecular de los diferentes genes que otorgan resistencia a los dos principales fármacos antituberculosis, INH y RIF.

La resistencia a RIF se debe a más de 35 mutaciones encontradas entre los codones que van del 511 al 533 del gen *rpoβ*, (Luna AC., 1998) principalmente en los codones 511, 513, 515, 516, 521, 526, 531 y 533. (De la Iglesia I. y Morbidoni HR. 2006). Para este estudio se utilizó una PCR alelo específico, denominada ARMS, método propuesto por Fan y colaboradores en 2003, para identificar mutaciones en los codones 516, 526 y 531 de este gen. Los aislados *M.*

tuberculosis MDR mostraron mutaciones en el codón 531 principalmente, seguido de mutaciones en el codón 526 y un menor porcentaje en el codón 516. En un estudio elaborado en Shanghai por Fan y colaboradores (2003) realizado a aislados *M. tuberculosis*, se obtuvo que las mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a rifampicina se encontraron en los codones 531, 526 y 516; con frecuencias de 53.8%, 23.1% y 10.3%, respectivamente. Este trabajo concuerda con las mutaciones encontradas en el presente estudio.

El ensayo de ARMS puede ser utilizado para la detección rápida de las mutaciones en el gen *rpoβ*, es un método rápido y simple, ya que el procedimiento completo incluyendo la extracción de ADN, la amplificación por PCR y la electroforesis, puede llevarse a cabo en un día (por muestra) aunque el método tiene limitaciones, puesto que es imposible detectar el 100% de las mutaciones existentes en el gen. Pese a esto, la aplicación de este método es potencialmente valioso para el diagnóstico, tratamiento eficaz y el control de *M. tuberculosis*. (Fan y col. 2003)

Para INH se conoce que su resistencia se debe a mutación en los genes *katG*, *inhA*, *ndh* y *ethA*; (De la Iglesia AI y Morbidoni HR. 2006) en este caso se empleó la PCR *multiplex* y una PCR-RFLP para detectar las mutaciones en los codones 315 y 463 del gen *katG* y para la sustitución en la región promotora del operón *mabA-inhA*. En nuestros aislados *M. tuberculosis* MDR se presentaron mutaciones en el codón 315 y el codón 463 del gen *katG*, y en la región promotora del operón *mabA-inhA*. Un estudio que arrojó un resultado similar al presente trabajo, fue el realizado en España por Herrera-León y colaboradores en el 2005 en donde se trabajaron con 297 aislados INH resistentes, de los cuales el 43.8% mostraron mutación en el codón 315 y la frecuencia de mutación en la región promotora *mabA-inhA* fue de un 23.6%.

Las mutaciones en el codón 315 del gen *katG* y la región promotora del operón *mabA-inhA* ocurren con más frecuencia en cepas resistentes a INH. Estas

mutaciones llegan a ser las responsables del 70% de los casos resistentes a INH en *M. tuberculosis*. (Herrera L y col. 2003)

Sin lugar a duda las estrategias moleculares constituyen una herramienta insuperable en el campo de la microbiología de la tuberculosis, ya que en cuestión de horas es posible determinar con precisión la especie y/o subespecie a la que pertenece un determinado aislado clínico; como ejemplo tenemos a MIRU-VNTR la cual es una técnica utilizada por distintos países como en Japón, (Wasa T. y col. 2007) China, (Guo J. y col. 2011) Gran Bretaña, (Skuce R. y col. 2002) España, (Alonso R. y col. 2008) por mencionar algunos. Muy pocos estudios en México han reportado el uso de MIRU-VNTR para la tipificación molecular de los aislamientos de *M. tuberculosis*. Este trabajo es uno de los pocos en agrupar a nivel molecular aislados de *M. tuberculosis* MDR. Los resultados encontrados en este estudio nos indican los diferentes linajes de *M. tuberculosis* MDR que circulan en nuestro país. Con respecto a los datos obtenidos en el presente trabajo apoyado por la técnica de MIRU-VNTR de 12 loci, se visualizaron patrones específicos para cada una de las cepas analizadas, obteniendo así distintos linajes, como: LAM, Ghana, Beijing, Uganda I, S, EAI, Haarlem, Bovis y X.

Dos estudios de genotipificación por espoligotipificación, uno realizado a 180 aislados clínicos en Monterrey por Molina y colaboradores en 2010, nos revela que en esta zona del país prevalecen la familia T1 y X, en un 23.8% y 15.5%, respectivamente; y otro llevado a cabo en San Luis Potosí por López L. en 2009 quien estudió 238 aislados, en donde demuestra que en esta región del país se identificaron principalmente a las familias Ghana (42%), Haarlem (22.9%) LAM (18.9%) y Uganda (11.8%); estos trabajos no concuerdan del todo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, lo anterior nos demuestra la heterogeneidad que existe en nuestro país con respecto a los linajes circulante. En el presente trabajo se identifico en un porcentaje alto a la familia LAM, la cual tiene mayor presencia en Sudamérica; también se identifico a la familia Haarlem, esta se encuentra principalmente en América Central y el Caribe (URL 11); la familia

Beijing también fue encontrada en nuestros aislados, esta familia fue descrita por primera vez en China. (URL 13) Estudios realizados en otros países que demuestran resultados similares a los obtenidos en este trabajo, son los realizados por Alonso R. y colaboradores en el 2008, llevado a cabo en España, en donde tras llevar a cabo una genotipificación se encontró que la mayor parte de los aislados correspondían a los linajes LAM (32.1%) y Haarlem (28.4%), y solo un 2.2% de los aislados pertenecían a la familia Beijing; de manera similar un estudio realizado en Colombia por Gómez y colaboradores en 2010 demostró que LAM y Haarlem aparecían en un mayor porcentaje con un 38% y 42%, respectivamente.

Por otra parte, un estudio realizado por Brudey y colaboradores en el 2005, en el cual se analizaron y clasificaron en 62 linajes, 39 295 cepas de *M. tuberculosis* provenientes de 122 países, genotipificando así con la ayuda de la base de datos SpolDB4; en este trabajo se publicó que las cepas de Beijing representan alrededor del 50% de las cepas en el Lejano Oriente, Asia y el 13% de los aislamientos a nivel mundial; en Europa, el linaje Haarlem representa alrededor del 25% de los aislamientos; en América del Sur, cerca del 50% de las cepas pertenecen a la familia LAM. Tres grandes familias (Haarlem, LAM, y T) son los más frecuentes en África, América Central, Europa y América del Sur; fuera de Europa, las cepas de Haarlem se encuentran principalmente en América Central y el Caribe (25%). Las cepas de la familia de Beijing no solo son frecuentes en el extremo Oriente y Asia, sino también en Oriente Medio-Asia Central y Oceanía. El genotipo Beijing que pudo haber sido endémica en China durante mucho tiempo está emergiendo en algunas partes del mundo, especialmente en los países de la antigua Unión Soviética, y en menor medida en el mundo occidental la identificación esta familia es de gran importancia ya que sus cepas son muy virulentas y están asociadas regularmente a farmacorresistencia. (Brudey y col. 2006; URL13) La familia EAI (Este de África y la India) es muy frecuente en estas zonas (33,8% en Extremo Oriente, Asia, el 24,3% en el Oriente Medio y Asia Central, y el 22,9% en Oceanía). El linaje de EAI es más prevalente en el sudeste de Asia, especialmente en Filipinas (73%), en Myanmar y Malasia (53%)

en Vietnam y Tailandia (32%). Por último, la familia X es altamente prevalente en regiones de América Central (11,9%) y América del Norte (21,5%), como se menciona anteriormente en un estudio realizado en Monterrey. (Molina y col. 2010; *Brudey y col. 2006*)

En cuanto a la familia Bovis, se sabe que es transmitida de manera zoonótica tras la ingesta de material infectados; entre los resultados arrojados, se observó la presencia de *M. bovis* en el Estado de México, a pesar de que solo se obtuvieron dos aislados que pertenecen a esta familia, es importante mencionar que *M. bovis* y *M. tuberculosis* son especies estrechamente relacionadas, y en donde cuyo diagnóstico clínico, radiológico, morfológico e histológico arroja los mismos resultados, sin notarse diferencia alguna; por esta razón se debe recurrir al cultivo, pruebas bioquímicas y el diagnóstico mediante técnicas moleculares para su diferenciación. Todo esto para otorgar un tratamiento correcto, ya que *M. bovis* naturalmente es resistente a pirazinamida. Este hecho es alarmante en México ya que solo el 50% de la producción de leche se pasteuriza y el 50% restante se consume directamente o se transforma en derivados lácteos. (*López y col. 2007*) Se ha registrado la presencia de *M. bovis* en Europa en un 30% y en América del Sur en un 25%. (*Brudey y col. 2006*)

Con respecto al resto de los linajes registrados en este trabajo, existen pocos estudios que muestren su identificación, ya que son cepas que se encuentran en poblaciones específicas; cabe mencionar que los distintos linajes de *M. tuberculosis*, se encuentran distribuidos en todas las regiones del mundo, unos en mayor porcentaje que otros. Lo anterior se ve asociado a la migración constante entre las poblaciones, Martínez en 2010 realizó un estudio en donde señaló que es posible que la distribución de *M. tuberculosis* este asociada a migración de la ruta del Pacífico, originada desde el sureste de México hacia el norte de mismo; los estados que comprenden esa zona son de alta incidencia de TB y se incluyen estados con un índice de migración alta.

Por otra parte, en el presente trabajo los *loci* que presentaron mayor variabilidad, al utilizar la técnica de MIRU-VNTR, fueron 10, 16, 23, 26 y 40; estos son los que nos ayudan a genotipificar y a diferenciarlos nuestros aislados con los de otras regiones; obteniendo así distintos linajes que varían de un estado a otro.

Mediante el uso de la técnica de MIRU-VNTR fue posible identificar el 66.7% de nuestros aislados, mientras que un 33.3% presentaron un código MIRUs no identificado por MIRU-VNTR *plus*. Para las cepas que se mostraron como huérfanas, es recomendable realizar un estudio conjunto, como lo puede ser la espoligotipificación RFLP o alguna otra técnica de genotipificación, esto con el fin de complementar nuestra información y lograr una mayor discriminación de datos.

Entre las ventajas que se tienen al emplear la técnica de MIRU-VNTR, es que tiene una mejor resolución que la espoligotipificación, el ADN utilizado no necesariamente requiere purificación, se puede realizar un análisis manual del gel de agarosa de las 12 amplificaciones. En cuanto a su uso, VNTR es una técnica que no solo es utilizada para la tipificación de *M. tuberculosis* sino que también es utilizada para el genotipificado de diversos microorganismos, entre ellos: *Brucella abortus*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*, así como para la aplicación en pruebas forenses y de paternidad. (Acosta SR, 2009) Para la genotipificación con MIRU-VNTR también ha sido utilizado para evaluar la transmisión de *M. bovis*, (Acosta S. y col. 2009) así como para la tipificación de *M. leprae*. (Torres J. y col. 2009)

Cabe destacar que también se tienen desventajas para esta técnica, ya que tiene un menor poder discriminatorio comparado con el RFLP basado en la IS6110, y pueden encontrarse patrones similares en distintos linajes; como lo reporta Vázquez C. en el 2011 en un estudio realizado en aislados *M. tuberculosis* originarias del Estado de México en el cual se obtuvo un patrón de código MIRU-VNTR idéntico para dos cepas, las cuales se diferenciaron al analizarse

conjuntamente los patrones fenotípicos de resistencia y los códigos octales arrojados tras una espigotipificación; por lo que podemos confirmar que el poder discriminatorio del MIRU-VNTR de 12 loci no es suficiente, como ya ha sido reportado por otros autores (*Mathema B. y col. 2006; Supply y col. 2001; Mandira V. y col. 2011*)

Algunos autores han considerado a MIRU-VNTR como una alternativa en la tipificación de aislados clínicos, para con fines epidemiológicos. Sin embargo, otros autores han encontrado limitaciones en su capacidad de discriminación. Lo que indica que el análisis de MIRU debe combinarse con un método de genotipificación adicionales. (*Alonso R. 2008*) Al utilizar MIRU-VNTR en conjunto con espigotipificación, se llega a obtener un poder discriminatorio similar al de RFLP IS6110; esta combinación es útil para cepas con pocas copias de IS6110. (*Mandira V. y col. 2011*).

La aparición de técnicas de diagnóstico que otorgan resultados en menor tiempo, comparado con los métodos convencionales, no son del todo suficientes ya que todavía falta mucho para lograr resultados y para acabar con una enfermedad bien conocida por su antigüedad; los avances en vacunas están por llegar; el tratamiento clásico es largo, de seis meses, y, en el caso de las tuberculosis resistentes el tratamiento puede durar hasta dos años, con mayor toxicidad y es más caro. (*URL 6*) Sin embargo, a pesar de estos avances, aproximadamente dos millones de personas mueren anualmente de tuberculosis en el mundo y cada cuatro segundos una persona se infecta con *M. tuberculosis*. La remergencia de la TB y el surgimiento de cepas MDR y XDR constituyen un reto a los programas de control de la TB, sin embargo los estudios de epidemiología molecular y el conocer las mutaciones más frecuentes en las cepas farmacorresistentes de *M. tuberculosis*, pueden contribuir al control de estas cepas. (*Cabello F. 2011*)

9. CONCLUSIONES

El 64.4% de los aislados *M. tuberculosis* MDR correspondieron a hombres y un 35.5% a mujeres; con una relación hombre-mujer de 1:2 afectando principalmente a la población económicamente activa, con una edad promedio de 45.8 años.

Los estados seleccionados por la ENFR que tuvieron un mayor porcentaje de cepas *M. tuberculosis* MDR fueron; Baja California (24.4%), Estado de México (22.22%), Sinaloa (15.5%) y Guanajuato (11.11%).

Los estados seleccionados por la encuesta que tuvieron un menor porcentaje de aislados *M. tuberculosis* MDR fueron Yucatán (8.88%), San Luis Potosí (6.66%), Chihuahua (6.66%), Querétaro (2.22%) y Morelos (2.22%).

El análisis de la distribución de genes de resistencia para INH mostró que el 46.7% de los aislados presentaron una mutación en el gen *katG* al utilizar la PCR-RFLP, el 15.6% para la mutación presente en la región promotora del operón *mabA-inhA* al utilizar la PCR *multiplex* y 37.8 % no mostraron mutación al utilizar ambas técnicas.

En cuanto a las mutaciones más comunes asociadas a resistencia para RIF; se encontró una mayor frecuencia para el codón 531, seguido de 526 y 516; con un porcentaje de 46.6 %, 13.3 % y 6.66 %, respectivamente.

Los MIRUs 16, 23, 26, 31 y 40 mostraron un mayor polimorfismo genético, en las cepas de *M. tuberculosis* MDR, comparado con los MIRUs 2, 4, 10, 20, 24, 27 y 39 los cuales presenta un polimorfismo menor.

El porcentaje de aislados *M. tuberculosis* identificados por el método de MIRU-VNTR fue de un 66.7%, mientras que un 33.3% no pudieron ser determinadas por este método.

Los linajes de *M. tuberculosis* MDR en los estados seleccionados por la ENFR identificados mediante la técnica de MIRU-VNTR fueron: LAM, Ghana, Beijing, Uganda I, S, EAI, Haarlem, Bovis y X; con un porcentaje de 17.7%, 2.2%, 11.1%, 6.6%, 2.2%, 4.4%, 15.5%, 4.4% y 2.2%; el 33.3% restante representa a los aislados huérfanos.

Entre los estados que muestran mayor variabilidad de linajes de *M. tuberculosis* fueron Baja California, Guanajuato y el Estado de México.

El linaje LAM se encontró en 6 de los 9 estados de la República Mexicana seleccionados en la ENFR.

La familia S solo se localizo en Baja California, la familia X fue identificada solo en Sinaloa y la familia Bovis solo se encontró en el Estado de México.

10. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Salinas R, Estrada-Chavéz C, Milián-Suazo F, 2009. Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. **Rev. Tec Pecu Méx.**47: 389-412.

Agapito J, Neyra V, Bladeviano C, Espinoza J, Accinelli R. 2003. Caracterización de las mutaciones en el gen *rpoβ* asociadas a la resistencia a rifampicina y tipificación molecular mediante RFLP (IS6110) en cepas *M. tuberculosis* de pacientes con tuberculosis pulmonar. **Enfermedades del tórax.** 46:9-24

Alcaide F, Moreno J, Martín J, Palacios JJ, 2005. Procedimiento en Microbiología Clínica: 9ª Micobacterias. Cercenado E, Cantón R editores. España. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. **SEIMC** 2-90.

Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville D. 2006. Evaluation of the Epidemiological Relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and Comparison of the Method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping. **Journal of Clinical Microbiology.**44: 1951-1962.

Alonso R, Martínez L, Herránz M, Sánchez B, barroso P, INDAL-TB group, Bouza E, García de Viedma D. 2008. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. **MBC. Microbiology.**8:1186-1196

Balandramo CS, Anzaldo FG, Peña FG, Betancourt M, 1996. Manual de procedimientos de laboratorio InDRE/SAGAR: 18 Tuberculosis. Escobar GA editor.

México DF: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, **Secretaría de Salud. 13-97.**

Barrera L. 2008. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Cultivo. Edit. **OPS. 11-24.**

Brudey K, Driscoll J, Rigouts L, Prodinger W, Gori A, Al-Hajj S, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans J, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes H, Gutierrez C, Hawkey P, van Helden P, Kadival G, Kreiswirth B, Kremer K, Kubin M, Kulkarni S, Liens B, Lillebaek T, Ly H, Carlos Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Ngeow Y, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofo-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti M, Rüsck-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin I, Singh U, Somoskovi A, Skuce R, van Soolingen D, Streicher E, Suffys P, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor T, Warren R, Yap S, Zaman K, Portaels F, Rastogi N and Sola C. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology. 6: 1-17.**

Cabello F. 2011. Tuberculosis: una dinámica continúa entre el pasado y el presente, para imaginar el futuro. **Revista Médica de Chile. 139:829-832.**

Caminero JA. 2004. Manejo de los casos en retratamiento de tuberculosis con sospecha de Resistencia a fármacos. **Biomédica. 24: 21-27.**

Coll P. 2003. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 21: 299-308.**

De la Iglesia AI y Morbidoni HR. 2006. Mecanismos de acción y de resistencia a rifampicina e isoniacida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. **Revista Argentina de Microbiología. 38:97-109.**

Fan XY, Hu ZY, Xu FH, Yan ZQ, Guo SQ, Li ZM. 2003. Rapid detection of *rpoB* gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Shanghai by using the Amplification Refractory Mutation System. **Journal of Clinical Microbiology. 41:993-997.**

García ML. 2007. Apego al Tratamiento y el Desarrollo de Farmacorresistencia. Limitaciones y Necesidades para el Desarrollo de Estrategia para el Control Efectivo de la Tuberculosis. **Salud Pública de México. 49: 127-133.**

García ML, Sifuentes J, Jiménez ME, Ponce de León A, Jiménez A, Bobadilla M, Palacios M, Canales G, Sanginés, Jaramillo Y, Martínez A, Balandramo S, Valdespino JL, Small P. 2001. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los antimicrobianos en Orizaba, Veracruz. Implicaciones para el Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis. **Revista de Investigación Clínica. 53: 315-323.**

Gómez VJ, Hernández JM, Zapata EM, Mejía GI y Robledo JA. 2010. Diversidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes positivos y negativos para VIH de Medellín. **Infectio. Revista de la asociación Colombiana de Infectología. 14:47-48.**

Guo J, xiang W, Zhang G, luo T, Xie N, Yang Z and Sun Q. 2011. Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit typing in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Sichuan Province in China. **Indian Journal of Medical Research. 134: 362-368.**

Herrera L, Molina T, Saiz P, Saez N, and Jiménez MS. 2005.New Multiplex PCR for Rapid Detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49:144-147.**

Jensen M y Wright D. 1993.Introduction to microbiology for the health sciences. Prentice Hall. 3ra ed.12-65.

Kapur V, Li L, Iordanescu S, Hamrick M, Wanger A, Kreiswirth B and Musseri J. 1994.Characterization by Automated DNA Sequencing of Mutations in the Gene (rpoB) Encoding the RNA Polymerase 3 Subunit in Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from New York City and Texas. **Journal of Clinical Microbiology: 32: 1095-1098.**

Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos J. 1998. Manual de Infectología Clínica. Méndez. 15ª ed. 223-264.

López BL, Celma PA, Bravo MJ y Zepeda LH. 2007. Tuberculosis bovina: ¿zoonosis re-emergente?. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana.20.

Luna AC. 1998. Determinación de la frecuencia de mutaciones en los genes katG y/o rpoB de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a isoniacida y/o rifampicina del noroeste de México. **Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de medicina. 1-10.**

Mandira VB, SujeetK, Jyoti A, Archana A, Thierry Z, Jayant NB, Urvashi BS, Nalin R and Mridula B. 2011. Comparison of spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive units typing and IS6110-RFLP in a study of genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Delhi, North India. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 106:524-535**

Mancilla EM, Martínez HA, Palavecino BC, Rehren SG, Lucero LP, León RG, Zárraga OA-M. 2006. Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la X^a región de Chile. **Revista Chilena de Infectología. 23: 220-225.**

Martínez JA. 2010. Caracterización microbiológica y epidemiología molecular de cepas farmacorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en la República Mexicana. **Instituto Politécnico Nacional. 1-64.**

Mathema B, Kurepina N, Bifami P and Kreiswirth B. 2006. Molecular Epidemiology of Tuberculosis Current insights. **Clinical Microbiology. 19: 658-685.**

Molina T, Moreno T, Ocampo C, Rendon A, Blackwood K, Kremer K, Rastogi N, Welsh O and Vera C. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes in Monterrey, México. **Journal of Microbiology. 48:448-455.**

Ong D, Yam W, Siu G and Lee A. 2010. Rapid detection of rifampicina and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by high-resolution melting analysis. **Journal of Clinical Microbiology. 48: 1047-1054.**

Palma N y Bocanegra G. 2007. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. **Archivos de Bronconeumología. 43:225-232.**

Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. 2007. Tuberculosis. From basic science to patient care. First Edition. **Edit. Bernd Sebastian Kamps and Patricia Bourcillier. 25-60.**

Saint-Joanis B, Souchon H, Wilming M, Johnsson K, Alzari PM, Cole ST. 1999. Use of site-directed mutagenesis to probe the structure, function and

isoniazid activation of the catalase/oxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemical Journal. 338: 753-760.**

Sequeira IM, Barrera L. 2008. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Baciloscopia. **OPS. 7-26.**

Skuce R, McCorry T, McCarroll J, Roring S, Scott A, Brittain D, Hughes S, Hewinson Gand Neill S. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. **Microbiology. 148: 519-528.**

Slayden R y Barry III. 2000. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infect. 2: 659-669.**

Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Hass P, van Deutekon H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, and van Soolongen D. 2006. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed repetitive Unit-Variable-Number Tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology. 44:4498-4510.**

Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van soolinger D and Locht c: 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. **Journal of Clinical Microbiology. 39: 3563-3571.**

Torrice R. 2004. Breve recuerdo histórico de la Tuberculosis. **Archivos Bolivianos de Historia de la Tuberculosis. 10: 54-63.**

Varela C. 2010. Plan Estratégico Nacional para el control de la Tuberculosis. PENTB 2009-2015. **Revista Médica Hondureña. 78:39-48.**

Vázquez Chacón CA. 2011.Caracterización fenotípica y molecular de aislados de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidas durante la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en México durante los años 2008 y 2009. **Instituto Politécnico Nacional. 1-48.**

Wasa T, Maeda S, Hase A and Kazuo K. 2007.Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. **Journal of Medical Microbiology. 56: 1052-1057.**

Wengenack NL, Todorovic S, Yu L, Rusnak F. 1998. Evidence for differential binding of Isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis*KatG and the Isoniazid-Resistant Mutant KatG (S315T).**Biochemistry. 37:15825-15834.**

11.URLs (Uniform Resource Locators)

URL 1. MIRU-VNTR *plus* Help 2008. <http://www.miru-vntrplus.org>. Página consultada en diciembre de 2011.

URL 2. Estándares para la atención de la Tuberculosis e México <http://www.cenavece.salud.gob.mx/programas/descargas/pdf/estatentbmx.pdf>.
Pagina consultada en diciembre de 2011.

URL 3. Tuberculosis farmacorresistente: Una guía práctica para la atención médica al paciente.
http://sntc.medicine.ufl.edu/Files/drtbspanish/documents/tb_farmacorresistente_gui_g.pdf. Página consultada en enero de 2012.

URL 4. Tuberculosis en México.
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem13/pdf/edit1308.pdf>. Página consultada en noviembre de 2011.

URL 5. Guías Latinoamericanas de Diagnóstico y Tratamiento de la Tuberculosis Farmacorresistente. Asociación Latinoamericana de Tórax (ALAT).
<http://www.intramed.net/UserFiles/pdf/57367.pdf>. Página consultada en febrero de 2012.

URL 6. Informe OMS 2011 <http://www.who.int/tb/es/> OMS. Página consultada en febrero de 2012.

URL 7. <http://www.cdc.gov/tb>

URL 8. Vigilancia Epidemiológica Semana 17, 1012.
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2012/sem17/pdf/cua5.pdf> . Página consultada en mayo de 2012

URL 9. Tuberculosis en México, Vigilancia Epidemiológica Semana 11, 2012.
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2012/sem11/pdf/edit1112.pdf>. Página consultada en marzo de 2012.

URL 10. Mortalidad de Tuberculosis Extrapulmonar en México 2009.
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2011/sem48/pdf/edit4811.pdf>. Página consultada en abril de 2012.

URL 11. Distribución de espigotipos en aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* en el área de Monterrey, México.
<http://www.congresobiomedico.org.mx/memorias2009/htm/1172/132.htm>. Página consultada en mayo de 2012.

URL 12. Epidemiología Molecular de la Tuberculosis en el Estado de San Luis Potosí.
<http://www.ipicyt.edu.mx/espanol/actividades/actividades.php?evento=1668>
Página consultada en mayo de 2012.

URL 13. *Mycobacterium tuberculosis*. Linaje Beijing.
<http://www.docstoc.com/docs/21321022/MYCOBACTERIUM-TUBERCULOSIS-Linaje-Beijing>. Página consultada en mayo de 2012.

URL 14. Diversidad genética de *M. tuberculosis* en pacientes VIH positivos y VIH negativos en la ciudad de Medellín.
http://www.cls.org.co/uploaded_user/pdf2010/31.pdf. Página consultada en mayo de 2012.