



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Análisis molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogo-resistentes aisladas de diferentes hospitales y clínicas del ISSSTE en el Distrito Federal**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**LESLIE LIZETH GUZMAN FIGUEROA**

**ASESOR DEL TEMA. M EN C MARIA DEL ROCIO LOPEZ ALVAREZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Profesor: CARMEN ADRIANA MENDOZA CRUZ**

**VOCAL: Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ**

**SECRETARIO: Profesor: MARÍA DEL ROCÍO LÓPEZ ÁLVAREZ**

**1er. SUPLENTE: Profesor: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO**

**2° SUPLENTE: Profesor: JAVIER FERNANDEZ TORRES**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**ISSSTE “GRAL IGNACIO ZARAGOZA”**

**BIBLIOTECA CENTRAL, UNAM**

**BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE QUIMICA, UNAM**

**BIBLIOTECA FACULTAD DE MEDICINA. UNAM**

**HEMEROTECA FACULTAD DE QUIMICA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA: M EN C MARÍA DEL ROCÍO LÓPEZ ÁLVAREZ**

**SUSTENTANTE : LESLIE LIZETH GUZMAN FIGUEROA**

## Contenido

Introducción	9
I Antecedentes	11
1. Género <i>Mycobacterium</i>	18
1.1 .Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
1.1.1 Características estructurales y fisiológicas	23
1.1.2 Genómica	23
1.2 Patogénesis de la tuberculosis	24
1.3 Respuesta inmune	27
1.3.1 Respuesta inmune innata	27
1.3.2 Respuesta celular	28
1.4 Diagnóstico microbiológico	30
1.4.1 Baciloscopía	31
1.4.2 Cultivo	32
1.5 Diagnóstico molecular de la tuberculosis	34
1.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
1.5.2 Ensayo de sonda en línea: Genotype® MTBDRplus	42
1.5.3 PCR en tiempo real	44
1.5.4 Microarreglos	45
1.5.5 Pirosecuenciación	47
1.5.6 Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos	49
1.6 Tratamiento	52

1.7 Farmacorresistencia	57
1.7.1 Marcadores genéticos para determinar resistencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	61
1.7.2 Resistencia a isoniacida	62
1.7.3 Resistencia a rifampicina	65
1.8 Epidemiología molecular de la Tuberculosis	67
1.8.1 Espoligotipos	70
1.8.2. MIRUs-VNTR Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas- Número Variable de Repeticiones en Tándem.	71
II Justificación	74
III Objetivos	74
IV Material y métodos	75
4.1. Esquema general de trabajo	75
4.2. Extracción de DNA genómico	76
4.3. Detección molecular de resistencia a isoniacida	77
4.4. Detección molecular de resistencia a rifampicina	80
4.5 Caracterización de aislamientos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por amplificación MIRU-VNTR	81
4.6 Caracterización de aislamientos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante espoligotipificación	84
V Resultados	87
VI Discusión	91
VII. Conclusiones	95
VIII Referencias	96

## Abreviaturas

TB Tuberculosis

CMT Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

DNA Acido desoxirribonucleico

RFLP Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

MIRU Mycobacterial Interspersed Repetitive Units

VNTR Variable Number Tandem Repeats

OMS Organización Mundial de la Salud

TB-FR Tuberculosis fármaco resistente

TB-MFR Tuberculosis multi fármaco resistente

TAES Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado

RNAr Ácido ribonucleico ribosomal

ORFs Open Reading Frames

TLR Toll Like Receptors

TNF $\alpha$  Factor de Necrosis Tumoral alfa

NO Oxido Nitrico

MA Macrofagos Alveolares

IL Interleucina

NF-KB Factor Nuclear Kb

Fe Fierro

CR Receptores del Complemento

MCH I Complejo de Histocompatibilidad tipo I

MCH II Complejo de Histocompatibilidad tipo II

MCP Cofactor Proteico de Membrana  
MIP Proteína Inflamatoria de Macrófagos  
TGF- $\beta$  Factor de crecimiento transformante beta  
BAAR Bacilo Acido Alcohol Resistente  
NOM Norma Oficial Mexicana  
LAMP Amplificación Isotérmica Mediada por Loop  
H Isoniacida  
R Rifampicina  
Z Piracinamida  
S Estreptomicina  
E Etambutol  
XFR Extremadamente fármaco resistentes  
OPS Organización Panamericana de Salud  
InDRE Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos  
A Adenina  
G Guanina  
C Citocina  
T Timina  
Ser Serina  
Thr Treonina  
Arg Arginina  
Leu Leucina  
Cys Cisteína  
Gln Glutamina

His Histidina

Tyr Tirosina

Asp Acido aspártico

Val Valina

Ala Alanina

Pro Prolina

Lys Lisina

Trp Triptófano

Rif r Rifampicina resistente

Rif s Rifampicina sensible

DR Repetidos directos



## Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica-infecciosa causada por los miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) el cual está integrado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. pinnipedii* y *M. microti*. En 2014, 9.6 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1.5 millones murieron por esta enfermedad.

El desarrollo de métodos moleculares para la caracterización genética de *M. tuberculosis* ha contribuido para el entendimiento de la distribución y patogénesis de la enfermedad. El descubrimiento de secuencias de DNA (ácido desoxirribonucleico) repetitivas en el cromosoma de *M. tuberculosis* como es la secuencia IS6110 y la variación en los números de copias de estas secuencias RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ha permitido desarrollar técnicas moleculares confiables en la diferenciación de cepas de esta especie. Sin embargo, debido a la complejidad y costos para realizar esta técnica, no es muy viable en los laboratorios de diagnóstico. Por tal razón es necesaria la aplicación de nuevas técnicas moleculares que permitan llevar a cabo un mejor control de TB en México. La tipificación molecular de *M. tuberculosis* basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) proporciona información útil para el control epidemiológico y prevención de nuevos casos, así como aspectos filogeográficos. Existen dos técnicas que son altamente discriminatorias y muy reproducibles en cualquier laboratorio de diagnóstico: MIRUs (Mycobacterial interspersed repetitive units) y VNTR (Variable Number of DNA Tandem Repeats).

En conjunto MIRU-VNTR, son pequeñas secuencias de DNA (entre 40 y 100 pb) a lo largo del genoma de *M. tuberculosis*. Esta técnica se basa en la detección y cuantificación del número de repeticiones de esos fragmentos. Así mismo está la técnica de tipificación espoligotipificación, basada en la ausencia o presencia de 43 secuencias de DNA, llamados espaciadores y repeticiones directas. Estas técnicas tienen la ventaja de que sus resultados son expresados en un código digital fácil de interpretar. Sin embargo estos estudios son escasos en México.

Por lo que el objetivo de este trabajo fue por una parte realizar una investigación bibliográfica exhaustiva sobre el tema en diferentes artículos científicos y por otra llevar a cabo un protocolo de investigación para hacer el análisis molecular de cepas multidrogo-resistentes de *M. tuberculosis* aisladas de diferentes hospitales y clínicas del ISSSTE en el Distrito Federal.

## **Antecedentes**

La tuberculosis es una enfermedad re-emergente causada por los miembros del CMT (1). Es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes en el mundo y una de las principales causas de mortalidad por infección. La tuberculosis es la causa principal de muerte de las personas infectadas por el HIV; en 2015, fue la causa de una de cada tres defunciones en este grupo.

Se calcula que 480 000 personas desarrollaron tuberculosis multirresistente a nivel mundial en 2014.

Se estima que cerca de dos billones de personas están infectadas por tuberculosis, lo que correspondería a un tercio de la población mundial y se ha convertido en un serio problema de salud pública, por lo cual la OMS (Organización Mundial de la Salud) la declaró como emergencia mundial. Menos del 10% de las personas infectadas desarrollará la enfermedad activa a lo largo de su vida. Esto dependerá de las condiciones genéticas, del estado nutricional e inmune de cada individuo y de la cepa de *M. tuberculosis* con las que se tiene contacto (2).

Uno de los factores que dificultan el manejo y control clínico de la TB a nivel mundial es la fármaco resistencia. La OMS estima que el 20% de los casos de TB son resistentes a un antibiótico, TB fármaco resistente (TB-FR) y la resistencia de mayor importancia clínica se presenta en los dos principales fármacos de primera línea, rifampicina e isoniacida, definida como multifármaco resistencia ( TB-MFR) la cual se presenta en el 5.3% de los casos (3,4).

*Mycobacterium tuberculosis* es el principal agente causal de la TB, enfermedad infecciosa y una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. En los últimos años se ha observado en diferentes países un aumento en el número de casos de TB causados por cepas resistentes a los fármacos antituberculosos (5).

La OMS, en 2008, estimó que se han reportado 440,000 casos de TB-MFR y 150,000 muertes a causa de esta resistencia. En algunos países, más de un cuarto de los casos nuevos de TB son causados por este tipo de cepas (5).

La OMS ha alertado que si no se toman medidas urgentes de control, para el periodo comprendido entre el año 2002 y 2020, se podrían alcanzar cifras de 1000 millones de nuevos casos de personas infectadas con *M. tuberculosis*, de los cuales 150 millones desarrollarían la enfermedad y 36 millones morirían por esta causa (6).

La duración prolongada del tratamiento, las cepas resistentes a múltiples fármacos y una mortal asociación con el HIV hacen que su control sea un desafío para los países en vía de desarrollo (7)

Por lo anterior es necesario contar con la disponibilidad de métodos para evidenciar la infección por TB-MFR, brindando un tratamiento adecuado y rápido para evitar la propagación de la enfermedad a la comunidad; identificando así los genes responsables de la resistencia a los fármacos antituberculosos. (5).

La aparición de epidemias de TB con cepas multirresistentes en los países desarrollados, sobre todo asociado con la epidemia VIH/SIDA es sin duda, uno de los principales riesgos para la salud pública en todo el mundo. (8).

La emergencia de cepas resistentes a fármacos, especialmente cepas TB-MFR, ha planteado una amenaza a los programas de control de la tuberculosis (9).

La resistencia a fármacos en *M. tuberculosis* se debe predominantemente a alteraciones en genes que codifican blancos de antibióticos y hasta el presente se han identificado múltiples mutaciones cromosomales asociadas al desarrollo de resistencia a antibióticos de primera línea. La caracterización de estas mutaciones ha conducido al desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico molecular que podrían acortar el periodo de reporte del patrón de resistencia a fármacos en *M. tuberculosis*. La detección temprana de cepas resistentes a fármacos de primera línea, contribuiría a un mejor manejo terapéutico del paciente con drogas de segunda línea y disminución del riesgo de propagación de cepas de TB-MFR (10)

La especificidad y la rapidez de las técnicas moleculares actuales, representan una ventaja plausible frente a las técnicas tradicionales, esto motiva a la búsqueda de versiones con mayor sensibilidad, especificidad y con menores costos, que sean asequibles para su aplicación en el diagnóstico de infección y la identificación de mutaciones que confieren resistencia, lo que representaría un impacto importante en el control epidemiológico de la tuberculosis en el mundo (11).

La TB es una de las enfermedades infecciosas que carece de un diagnóstico rápido, dado que el estándar de oro es el cultivo y éste puede tardar semanas o incluso meses en crecer y brindar un resultado. Se han desarrollado nuevas

pruebas para detectar infección activa, reactivación, latencia y resistencia a los medicamentos (12)

De los 218 mil casos incidentes de TB reportados por los países de las Américas en el año 2011, México aportó 19,857 de ellos, que corresponde al 9.1% de todos los casos de la región (lo que lo ubica en el tercer lugar de los países que más casos reportan, después de Brasil y Perú). El país reportó una incidencia de 16,8 casos por 100,000 habitantes en el año 2012, que correspondió a 19,697 casos de TB notificados. De estos casos 15,858 (81%) fueron formas pulmonares, 17.8% extrapulmonares y 1.5% meníngeas; 11% de los casos fueron pediátricos (menor 19 años).

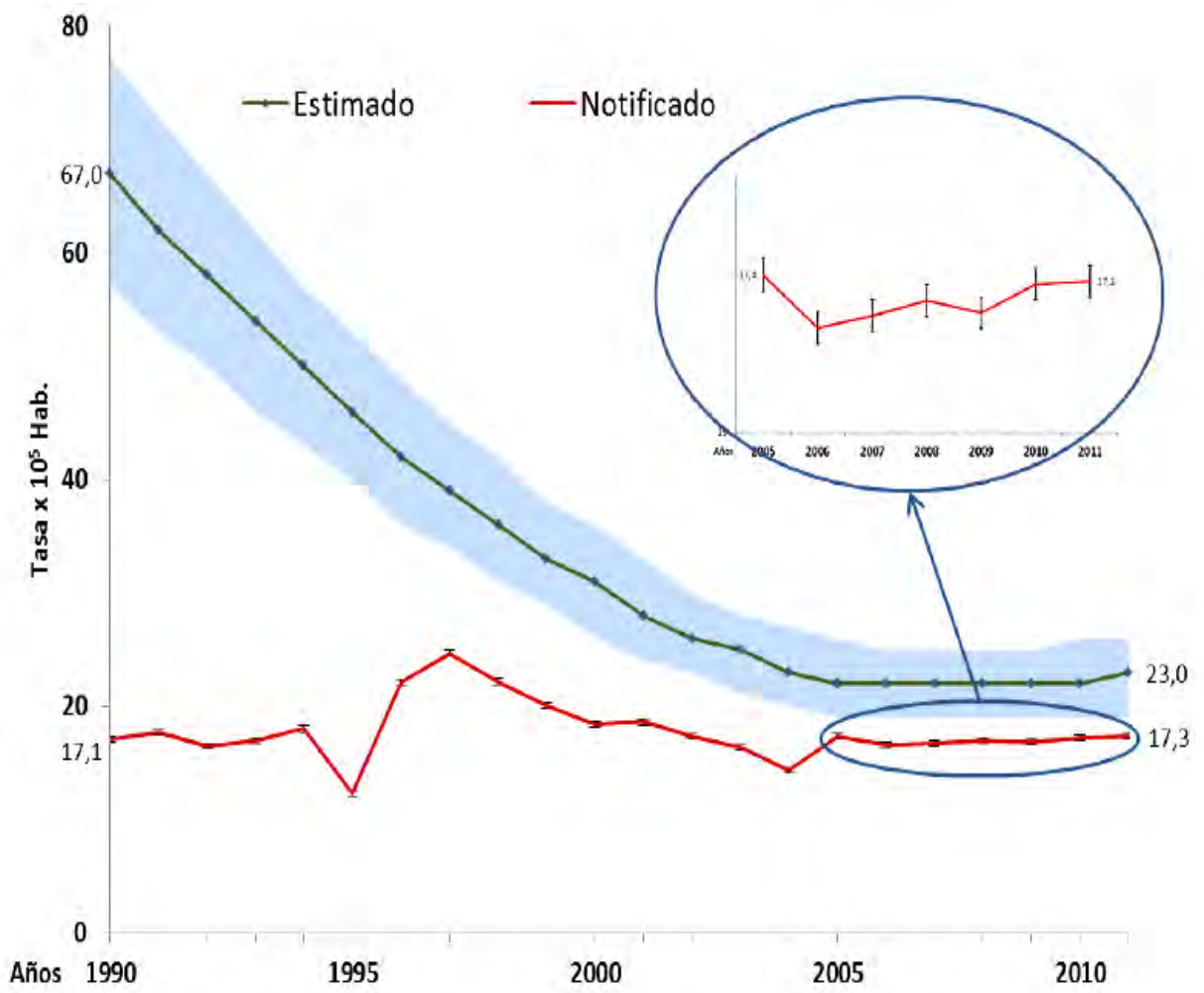
La incidencia tuvo grandes variaciones internas desde 4,0 casos por cada 100,000 habitantes en Tlaxcala hasta 58,5 casos por 100 mil habitantes en Baja California. Los estados con mayor incidencia correspondieron a las rutas migratorias identificadas “sur-norte” del país. En el año 2011 el país reportó una mortalidad de 2,2 muertes por cada 100,000 habitantes, con un total de 2,531 personas fallecidas por TB. La tasa más baja, al igual que la incidencia se observó en Tlaxcala y la más alta en Baja California. Tanto la incidencia como la mortalidad notificada muestran una leve tendencia al aumento en los últimos años.

De acuerdo con los estimados de la OMS México muestra una disminución sostenida de la incidencia de TB en todas sus formas a partir de 1990 y hasta el año 2005 cuando se estabiliza alrededor de los 22 casos por 100.000 habitantes. Al contrastar estos estimados con los datos notificados por el país (Figura 1), se

evidencia que la incidencia reportada por el país desde 1990 hasta el 2012 permanece casi constante, con algunas variaciones en los años 1995 a 1997, que coinciden con el inicio de la estrategia TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) en el país. A partir de 2005 la incidencia notificada presenta una leve tendencia al aumento, aunque no significativa. Pero en todo caso, lo notificado no alcanza a lo estimado por OMS.

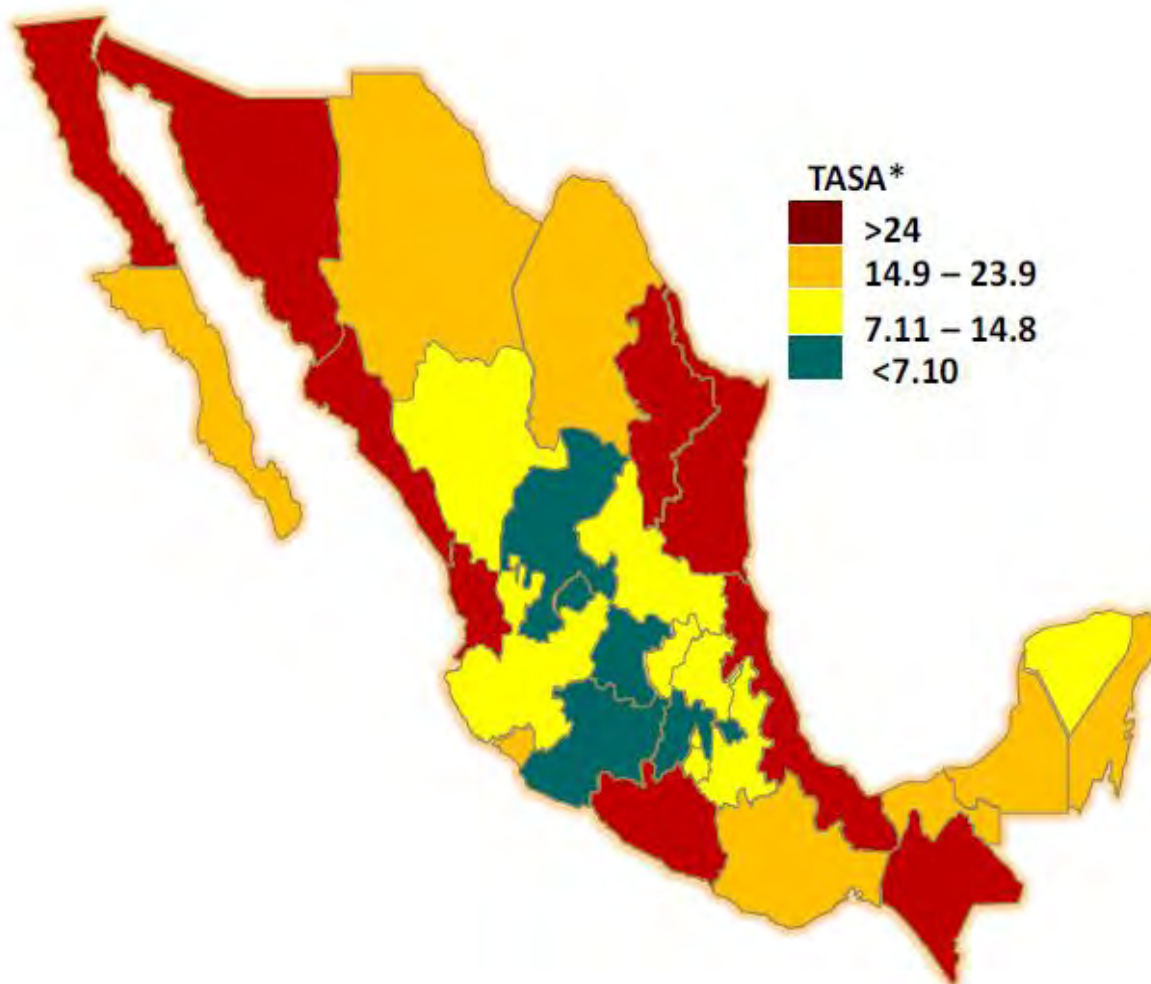
Para el año 2012 el país reportó un total de 19 697 casos de TB en todas sus formas, incidencia de 16.8 casos por 105 habitantes, de los cuales 15 858 fueron casos de TB pulmonar (80.5%), un 17.8 % de casos extrapulmonares y un 1.5 % de TB meníngea.

Los Estados con mayores incidencias notificadas en el año 2012 son en su orden: Baja California, Guerrero, Tamaulipas, Sonora y Sinaloa, que muestran tasas superiores a 30 casos por 100,000 habitantes, siendo extremo el caso de Baja California con 58,5 casos por cada 100.000 habitantes (Fig. 2).



**Fig. 1.** Incidencia Estimada y Notificada de TB de todas las formas. México 1990-2011 (13)





\*Tasa por 100, 000 habitantes

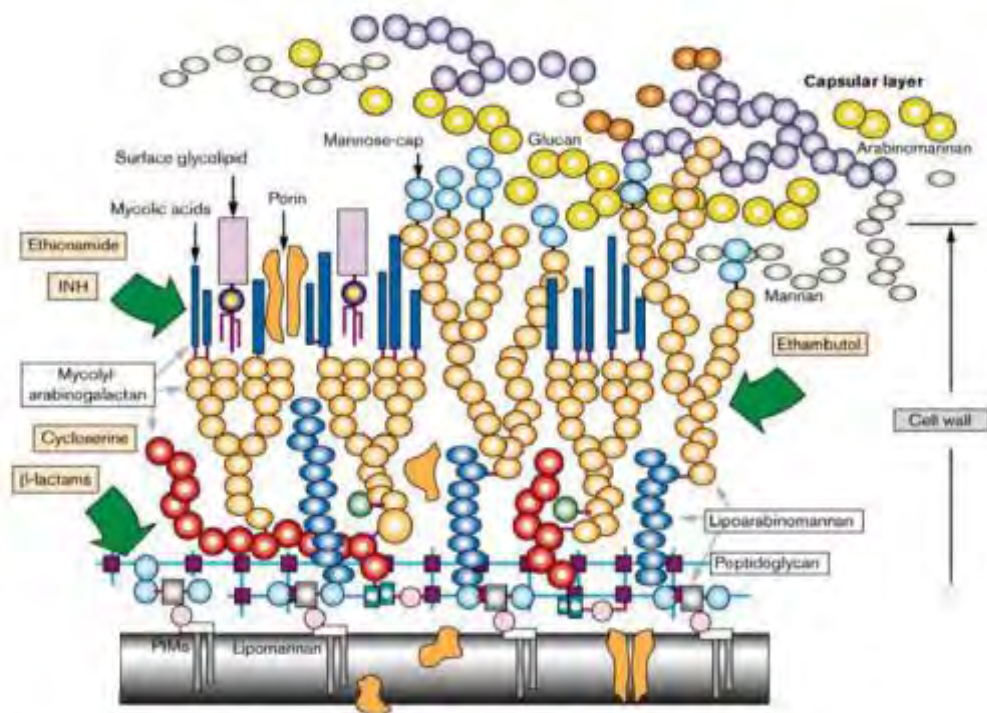
**Fig. 2** Incidencia Notificada de TB en todas sus formas. México 2012 (13)

## 1. Género *Mycobacterium*

Los microorganismos pertenecientes al género *Mycobacterium* son bacilos inmóviles muy delgados (0.2-0.4 x 2-10 micrómetros). Este género pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* (de la que es el único género), al orden *Actinomycetales* y a la clase *Actinomycetes*. Entre los géneros estrechamente relacionados con los miembros del género figuran *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*.

Las especies de *Mycobacterium* poseen una pared celular de estructura poco común (Fig.3) que contiene ácido N-glucolilmurámico en lugar de ácido N-acetilmurámico y una cantidad muy elevada de lípidos.

Debido a esta estructura de la pared celular es difícil teñir micobacterias con los colorantes básicos de anilina de uso habitual como los que se emplean en la tinción de Gram, pero estos microorganismos resisten la decoloración con alcohol acidificado (3% de ácido clorhídrico) tras la exposición controlada a un colorante de fucsina básica o con el calentamiento posterior al agregado del colorante. Esta propiedad importante de las micobacterias, que depende de su pared celular se denomina resistencia {ácido alcohol y permite distinguirlas de otros géneros. Estos microorganismos también se caracterizan por crecer con mayor lentitud que la mayoría de las demás bacterias patógenas humanas debido a la superficie celular hidrófoba que los induce a formar grumos, por lo que los nutrientes ingresan con dificultad en la célula. El crecimiento es lento o muy lento y las colonias se toman visibles en 2 a 60 días a temperatura óptima.

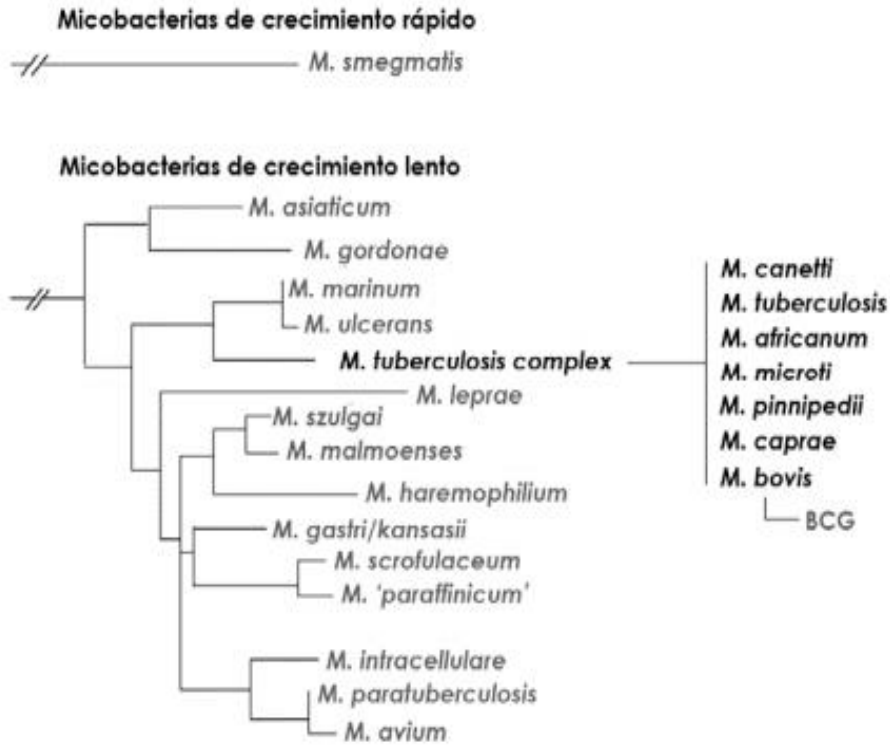


**Figura 3.** Esquema de la pared celular micobacteriana (14)

En la actualidad hay más de 100 especies reconocidas o propuestas dentro del género *Mycobacterium*. Estas especies causan amplio espectro de infecciones humanas y animales que varían desde lesiones localizadas hasta enfermedad diseminada. Si bien algunas especies solo causan infecciones humanas, otras se han aislado de una gran variedad de animales. Muchas especies se encuentran en el agua y en el suelo. (11)

La clasificación más intuitiva y de más fácil aplicación es aquella que divide a las micobacterias en dos grupos: micobacterias no cultivables (*M. leprae* y *M. lepraemurium*) y cultivables. Dentro de esta última se establece una subdivisión en micobacterias de crecimiento rápido (aquellas que dan lugar a colonias visibles en medios de cultivo sólidos en menos de 7 días), y las de crecimiento lento (las que tardan más de 7 días en producir colonias visibles en medio sólido).

Según la segunda edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, las micobacterias de rápido y lento crecimiento, están muy relacionadas en términos de homología del DNA. Mediante la secuenciación del gen que codifica la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosómico (RNA r), se ha determinado que casi la totalidad de las micobacterias de crecimiento lento (excepto *M. terrae* y *M. celatum*) poseen una copia de este gen, mientras que las crecedoras rápidas, excepto *M. chelonae* y *M. abscesus* presentan al menos dos. El análisis de la secuencia de este gen, así como la conformación de su estructura secundaria, ha sido la herramienta más utilizada para realizar estudios taxonómicos y filogenéticos del género (16).



**Figura 4.** Árbol filogenético basado en el gen RNAr 16s del grupo de micobacterias de crecimiento lento (17)

## 1.1 Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

El CMT se encuentra formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. pinnipedii* y *M. microti*. Genéticamente todos los miembros de este complejo son muy similares, teniendo un 99.9 % de similitud a nivel de nucleótidos, además de poseer secuencias idénticas para el DNAr 16S (18).

Tradicionalmente, la identificación de estas especies se ha realizado basándose en sus características fenotípicas, existiendo una amplia lista de pruebas bioquímicas, tales como la reducción de nitratos, la producción de niacina, o la resistencia a la piracinamida y las propiedades de cultivo que ayudan a discernir entre varias especies de micobacterias (19). Sin embargo, debido a que las características fenotípicas no permiten una identificación precisa, rápida y segura de todas las especies, la identificación actual se basa principalmente en la presencia o ausencia de ciertas regiones del genoma (regions of difference, RDs) (20) o la presencia de mutaciones puntuales (single nucleotide polymorphism, SNP). Éstas se han detectado gracias al desarrollo de técnicas moleculares y al conocimiento de los genomas de algunas especies incluidas en este complejo (21,22).

### **1.1.1 Características estructurales y fisiológicas**

Un aspecto característico del CMT es la presencia de un componente especial de la capa superficial de la pared celular, la trehalosa 6,6-dimicolato, también denominado “cord factor”. Esta molécula confiere al CMT la capacidad de agregación en forma de “cuerdas” conformadas por agrupaciones de bacilos visibles en la observación microscópica y fenómeno asociado con características de virulencia del bacilo (23).

Al igual que el resto de las especies del género *Mycobacterium*, las especies del CMT son aerobias. Sin embargo en determinadas circunstancias puede comportarse como microaerofila y utilizar lípidos como fuente de carbono (24).

### **1.1.2 Genómica**

En 1998 se hizo pública la secuencia completa del genoma de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (25), que ha sido la base para establecer su relación con otros miembros del CMT, así como para realizar los estudios posteriores sobre la evolución de este complejo.

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv está compuesto por DNA circular de 4 411 532 pb, un tamaño similar al de *Escherichia coli*. Mediante la bioinformática se ha podido inferir los ORFs (Open Reading Frames) y se ha estimado la existencia de 4 043 genes que codifican para 3 995 proteínas y 50 RNAs estables. Sin embargo,

tan solo la mitad de todos estos ORFs tienen una función biológica asignada; la del resto permanece desconocida (26).

## **1.2 Patogénesis de la tuberculosis**

La infección de *M. tuberculosis* se adquiere en el hombre por vía aérea, mediante la aspiración de partículas muy finas que contienen de 1 a 3 bacilos al entrar a los espacios alveolares. Una vez que los bacilos han entrado en contacto con los alveolos pulmonares la enfermedad puede presentar 5 estadíos (Figura 5).

En el primer estadío, los bacilos usualmente son destruidos o inhibidos por los macrófagos alveolares residentes. Si los bacilos no son destruidos, éstos eventualmente se multiplican y destruyen a los macrófagos.

En el estadío 2 aparece un estado de simbiosis, en el que el bacilo crece en forma logarítmica dentro de macrófagos inmaduros (no activados) de la lesión en desarrollo, que ya se llama tubérculo. Estos macrófagos provienen de la corriente sanguínea. Este estadío se conoce como simbiótico por dos razones, 1) los bacilos se multiplican dentro de los macrófagos sin causar un daño aparente al hospedero y 2) los macrófagos se acumulan y se dividen.

En el estadío 3, ocurre por primera vez la necrosis caseosa; el número de bacilos viables se estabiliza, porque su crecimiento es inhibido por la respuesta inmune a los antígenos parecidos a tuberculina (tuberculin-like antigen). En este estadío la respuesta inmune es principalmente del tipo de hipersensibilidad retardada. Los

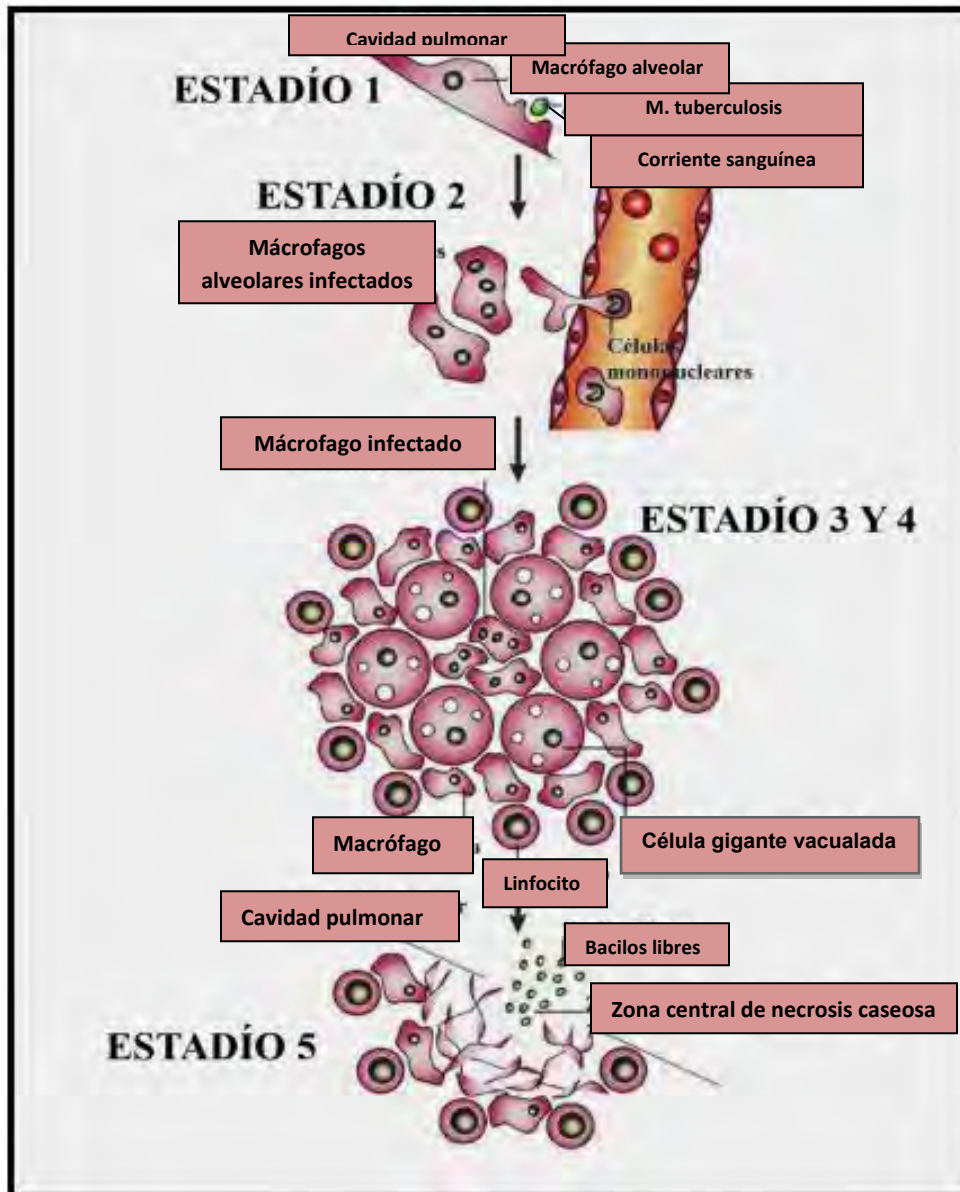


macrófagos cargados con bacilos son destruidos. La lesión ahora tiene un centro caseoso sólido, dentro del cual los bacilos, ahora libres (extracelulares), no se multiplican. Rodeando a este centro caseoso se encuentran macrófagos inmaduros (no activados) que permiten la multiplicación intracelular de los bacilos y macrófagos parcialmente activados.

El estadio 4 es el que determina si la enfermedad se hará aparente desde el punto de vista clínico. En este caso la respuesta inmune celular juega un papel determinante: Si se desarrolla una respuesta celular pobre los bacilos escapan del borde del foco caseoso y de nuevo se multiplican en macrófagos no-activados y en los parcialmente activados que se encuentran en la periferia del foco caseoso. De nuevo, los macrófagos conteniendo a los bacilos son destruidos por el sistema inmune, lo que causa el crecimiento del centro caseoso y la progresión de la enfermedad. Por otro lado, si se desarrolla una buena respuesta inmune celular el centro caseoso es rodeado por macrófagos activados, y esos macrófagos ingieren y destruyen o inactivan a los bacilos libres, lo cual detiene la evolución de la lesión, dejándola en un estado subclínico.

En el estadio 5 se observa licuefacción del centro caseoso. Este estadio ocurre cuando el bacilo evade la respuesta inmune del hospedero, y cuando esto ocurre, los bacilos se multiplican en el medio extracelular y suelen alcanzar un enorme número, a tal grado que a pesar de que se desarrolle una adecuada respuesta inmune celular ésta no es suficiente para controlar la infección. Además, la alta concentración de productos tuberculin-like producidos por estos bacilos causa una respuesta del tipo de hipersensibilidad tardía que erosiona la pared bronquial y

forma una cavidad. Entonces, las micobacterias invaden el árbol bronquial y se dispersan por otras partes del pulmón, tracto respiratorio inferior (TRI) y también en el medio ambiente, principalmente expedidas por la tos del paciente (27).



**Figura N.5** Representación esquemática de los cinco estadios de la tuberculosis pulmonar causada por la infección de *Mycobacterium tuberculosis* (28).

### **1.3. Respuesta inmune en la tuberculosis humana**

#### **1.3.1 Respuesta inmune innata**

Las principales características de la respuesta inmune innata incluyen el reconocimiento de diversas estructuras moleculares ampliamente distribuidas entre patógenos por receptores como los *Toll Like Receptors* (TLR) los cuales inducen moléculas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y óxido nítrico (NO) que directa o indirectamente contribuyen a la muerte de los microorganismos, además de inducir la activación y orientación de la respuesta adaptativa a través del reclutamiento de linfocitos T al sitio de lesión, activación de células dendríticas y producción de citocinas y quimiocinas (29,30).

En el espacio alveolar los mecanismos innatos de defensa involucran a diferentes tipos celulares como macrófagos alveolares (MA), células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B, células epiteliales, células alveolares tipo I y tipo II y factores solubles como mucina, lisosima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A<sub>2</sub>, inmunoglobulinas y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y eliminar partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio (31,32).

*M. tuberculosis* llega a los alvéolos donde entra en contacto con los MA que constituyen la primera línea de defensa en el pulmón. Este contacto inicial es crucial y definirá el control de la infección, o bien, el desarrollo de la enfermedad.

Los componentes de la micobacteria como el lipoarabinomano (LAM), lipoproteína de 19kDa y glicoproteínas, al unirse al receptor tipo *toll* 2 (TLR2) de los MA inducen la producción de moléculas como interleucina-1 (IL-1), TNF- $\alpha$  y NO que activan señales intracelulares para la producción de proteínas involucradas en la respuesta inmune (33).

El mecanismo de señalización intracelular que se activa tras la unión de LAM, 19kDa y otras glicoproteínas con TLR2 y la unión de citocinas como IL-1 y TNF- $\alpha$  con sus respectivos receptores, activan diferentes vías de señalización que tienen en común el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), induciéndose la expresión de citocinas y moléculas involucradas en la respuesta inmune (34).

### **1.3.2 Respuesta inmune celular**

*M. tuberculosis* utiliza diferentes vías de entrada a los MA, ya que promueve su propia fagocitosis a través de diferentes receptores presentes en la superficie de los MA como, 1) receptores para hierro (Fe) , 2) receptores de complemento como CR1 y CR3/CR4, 3) receptores de manosa, 4) receptores carroñeros (*scavenger*) y 5) receptores para la proteína surfactante A (35).

Se ha propuesto que la vía de entrada de la micobacteria determina su destino dentro de los MA; por ejemplo, la internalización a través de los receptores Fc de la micobacteria opsonizada induce la producción de intermediarios de oxígeno y

favorece la fusión fagosoma–lisosoma, mientras que su entrada a través de CR3 inhibe el estallido respiratorio y no hay maduración de los fagosomas (36).

Posterior a la fagocitosis, *M. tuberculosis* es incluida en un fagosoma para formar el fagolisosoma donde, en un proceso dinámico, es destruida por los mecanismos bactericidas y proteolíticos de los macrófagos con la consecuente generación de péptidos y otros antígenos. Los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica son acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo I (MCH I) y presentados por los macrófagos a linfocitos T CD8<sup>+</sup>, o bien, acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo II (MCH II) y presentados a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, mientras que los antígenos de naturaleza glicolipídica (fosfatidil manósidos, lipoarabinomananas, ácidos micólicos y hexosil–1–fofoisoprenoides) son acoplados con moléculas CD1 y presentados a los linfocitos CD8<sup>+</sup> y dobles negativos (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) (37). El proceso de presentación de antígenos constituye un paso importante en la transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa, que se basa en el reconocimiento específico de antígenos por los diferentes tipos celulares que se activan y producen factores solubles como citocinas y quimiocinas.

El control inmunológico de la infección con *M. tuberculosis* está basado en una respuesta inmune de tipo celular caracterizada por la producción de citocinas y quimiocinas como: IL–2, IFN– $\gamma$ , IL –12, IL–18, TNF– $\alpha$ , cofactor proteico de membrana (MCP–1), proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP–1 $\alpha$ ) e IL–8 (38). La respuesta no protectora en T  $\beta$  se caracteriza por la producción de citocinas como: IL–4, IL–5, IL–6, IL–10, IL–13 y Factor de crecimiento

transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que antagonizan la respuesta inmune celular y, como consecuencia, no hay control de la infección y se desarrolla la enfermedad. Las diferentes poblaciones celulares y mediadores solubles en su conjunto forman una compleja red de señales que participa en el control de esta enfermedad.

La fagocitosis y el reconocimiento de antígenos micobacterianos por TLR induce la producción, tanto de metabolitos, como el Oxido Nítrico que intervienen en la muerte de *M. tuberculosis* como de citocinas y quimiocinas importantes en el reclutamiento celular al sitio de lesión. El procesamiento y presentación de antígenos micobacterianos por los macrófagos alveolares con los linfocitos constituyen la fase inicial para la generación de la respuesta adquirida específica (35).

#### **1.4 Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis**

Para la salud pública es de suma importancia la disponibilidad de pruebas diagnósticas, operativas y confiables para la detección oportuna que permita iniciar el control del padecimiento. La confirmación de la presencia de *M. tuberculosis* se lleva a cabo mediante bacteriología, principalmente por baciloscopía o cultivo, mediante cultivo de biopsias de tejidos, fluidos o secreciones de órganos de pacientes con manifestaciones clínicas, radiológicas y datos epidemiológicos compatibles con la enfermedad. De toda muestra de tejido u órgano de pacientes para exámen histopatológico, además de someterse a este

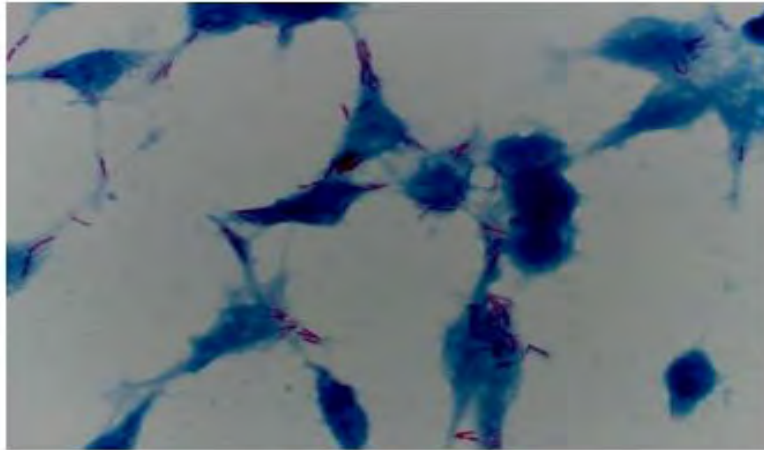
estudio, una fracción deberá enviarse al servicio de bacteriología para el aislamiento e identificación de *M. tuberculosis* mediante el cultivo (40).

#### **1.4.1 Baciloscopía**

El método para realizar la baciloscopía ha variado muy poco desde su aparición en el siglo XIX, y consiste en la tinción de una muestra de esputo previamente adherida en un portaobjetos mediante el método de Ziehl-Nelsen, ya que la presencia de abundantes ácidos grasos en la pared celular de *M. tuberculosis* lo hace ser un bacilo ácido-alcohol-resistente (BAAR) tiñéndolo de color rojo y el cual es identificado durante la observación microscópica (Figura 6).

La baciloscopía ha sido el único método de amplia cobertura para el diagnóstico masivo de la TB. A pesar de que es un procedimiento relativamente sencillo, requiere de la obtención de una muestra adecuada, personal capacitado y equipo de diagnóstico en buenas condiciones, disponible en áreas primarias de atención médica. Sin embargo es una prueba de baja sensibilidad, ya que se requieren de aproximadamente 10 000 BAAR/ml para que la prueba sea positiva en esputo. La baciloscopía debe realizarse en cualquier muestra clínica, excepto en orina. En caso de expectoración se debe realizar en tres muestras sucesivas (40).

Otra de las desventajas de la baciloscopía es la falta de especificidad en la diferenciación de aislados de *M. tuberculosis* de otras micobacterias ambientales.



**Figura 6.** Tinción de Ziehl-Neelsen de una muestra de expectoración positiva para BAAR.

#### **1.4.2 Cultivo**

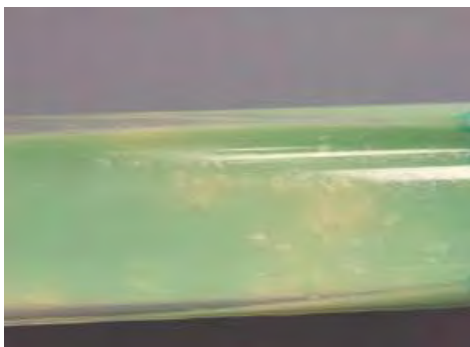
El método más utilizado para el aislamiento de *M. tuberculosis* es el cultivo en medio Lowenstein Jensen cuya base es orgánica (huevo) y tiene incorporados inhibidores del crecimiento, como el verde de malaquita, que impide la proliferación de microorganismos contaminantes de la muestra (Figura 7).

En estas dos últimas décadas se ha considerado al cultivo en medio Lowenstein Jensen como el “estándar de oro” para la detección de micobacterias, siendo una herramienta bacteriológica indispensable para el diagnóstico de la tuberculosis cuando se presentan muestras paucibacilares (con bajo número de bacilos). En México de acuerdo a la NOM -006-SSA2-1993, el cultivo se debe solicitar en las siguientes situaciones:



- ❖ Para el diagnóstico en caso de sospecha clínica y radiológica de TB pulmonar con resultado negativo de seis baciloscopías de expectoración
- ❖ Para el diagnóstico, en los casos de sospecha de TB de localización extrapulmonar
- ❖ En todo caso en el que se sospeche TB renal o genitourinaria
- ❖ Para el diagnóstico en caso de TB y HIV
- ❖ En caso de TB en niños
- ❖ En pacientes sujetos al tratamiento estrictamente supervisado, en quienes al cuarto mes persiste la baciloscopía positiva
- ❖ Para confirmar el fracaso del tratamiento
- ❖ Para el diagnóstico, en los casos de sospecha de TB farmacorresistente o con motivo de investigaciones epidemiológicas, terapéuticas y bacteriológicas

El diagnóstico definitivo de la TB solo puede establecerse cuando se cultiva *M. tuberculosis*. El hecho de que *M. tuberculosis* necesite 5-20 horas para duplicarse explica que el cultivo de esta micobacteria exija un tiempo muy prolongado, entre 6 y 8 semanas, en los medios de cultivo convencionales; sin embargo, en la última década se han desarrollado avances en el diagnóstico que dependen del empleo de medios líquidos incorporados a equipos automatizados de monitoreo permanente y de detección a través de rayos láser. El resultado de estos sistemas impacta por la rapidez de la recuperación de micobacteria (41).



**Figura 7.** Cultivo positivo de un aislamiento de *M. tuberculosis* en el medio Lowenstein Jensen (41).

## **1.5 Diagnóstico molecular de la tuberculosis**

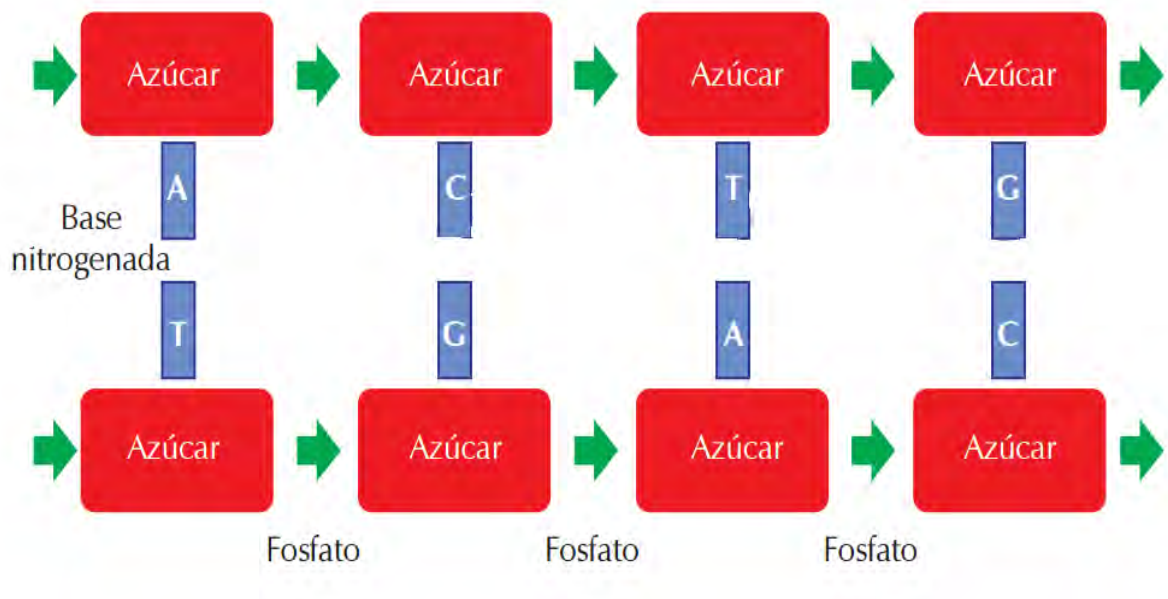
### **1.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente.

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (DNA o DNAC), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg +), una solución amortiguadora o buffer y H<sub>2</sub>O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se

modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (42).

El elemento principal en la PCR es el DNA, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Es importante recordar que la molécula de DNA está formada por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) que es complementaria con la base de otra cadena (Figura 8), de tal forma, que el DNA se estructura en una doble hélice.



**Figura 8.** Molécula de DNA de doble cadena. Cada cadena está formada por un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada que es complementaria con otra cadena: A = adenina, T = timina, C = citosina y G = guanina (42).

La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del DNA es negativa y está dada por los grupos fosfato.

En la PCR, el templado son las cadenas de DNA que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la DNA polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de DNA que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq DNA polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su DNA polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras DNA polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considera una enzima termoestable (42).

Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de los elementos ya mencionados como primers, dNTPs, Mg +, buffer y H<sub>2</sub>O.

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases, Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que

hibriden con el templado y las cadenas de DNA puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente). Con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable entre el templado y los primers, hoy en día existen programas informáticos para diseñar primers con alta especificidad, por lo que se evita la formación de productos inesperados.

Los deoxinucleotidos trifosfato (dNTPs) son cuatro: Deoxiadenosina trifosfato (dATP), deoxicitidina trifosfato (dCTP), deoxiguanosina trifosfato (dGTP) y deoxitimidina trifosfato (dTTP), estos son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN (43). Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM (42).

El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCl (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X (42). Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales ayudarían en la práctica a aumentar la especificidad y fidelidad de la reacción en cadena de la polimerasa. El dimetilsulfoxido (DMSO), añadido al buffer de la reacción en un 10% contribuye a la disminución de la estructura secundaria del DNA (44).

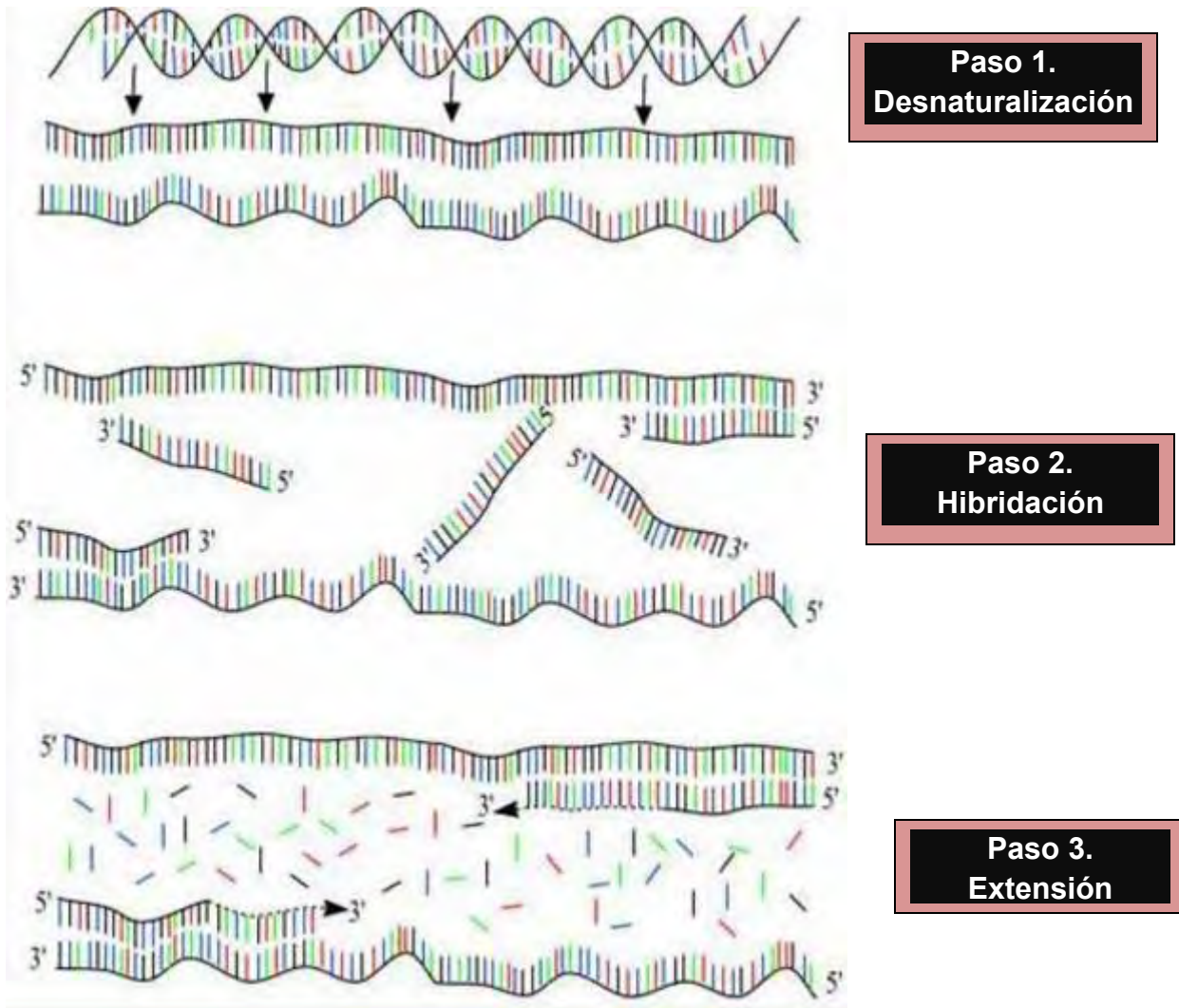
El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. En ocasiones ya viene incluido en el buffer, pero en otras se le tiene que agregar. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos (42).

La PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión (Figura 9).

**Desnaturalización:** separación de las dos cadenas complementarias de DNA por la acción del calor (93-97°C) (45). El tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T (42).

**Hibridación:** En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting ( $T_m$ ) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C.

**Extensión:** En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de DNA. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C (43), ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.



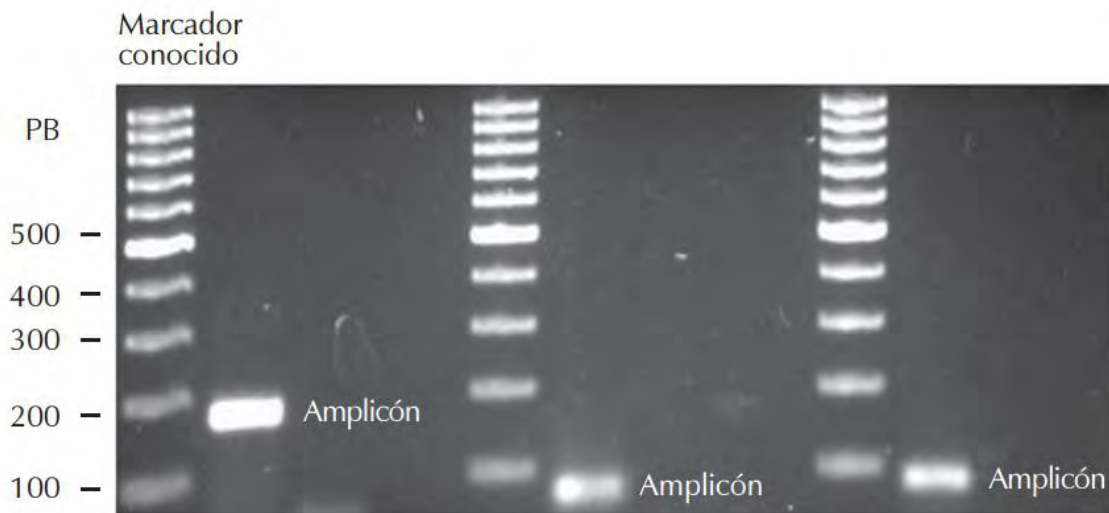
**Figura 9.** Pasos de un ciclo de la PCR (43)

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa (46), La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o

TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1.2% aunque, dependiendo del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%.

Otro ingrediente que se agrega al gel es un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Es importante manipular con mucho cuidado este compuesto porque se sabe que es mutagénico y teratógeno. Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. El marcador de peso molecular es fácilmente adquirido en el mercado, ya que se ofrece una gama de marcadores con distintos pesos moleculares para elegir el de nuestro interés. Finalmente, la visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV (Figura 10); adicionalmente un procesador de imágenes se encarga de analizar las bandas observadas.





**Figura 10.** Gel de agarosa. Los productos de la PCR o amplicones están representados mediante bandas de un tamaño específico y se comparan con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción. PB= número de pares de bases (42).

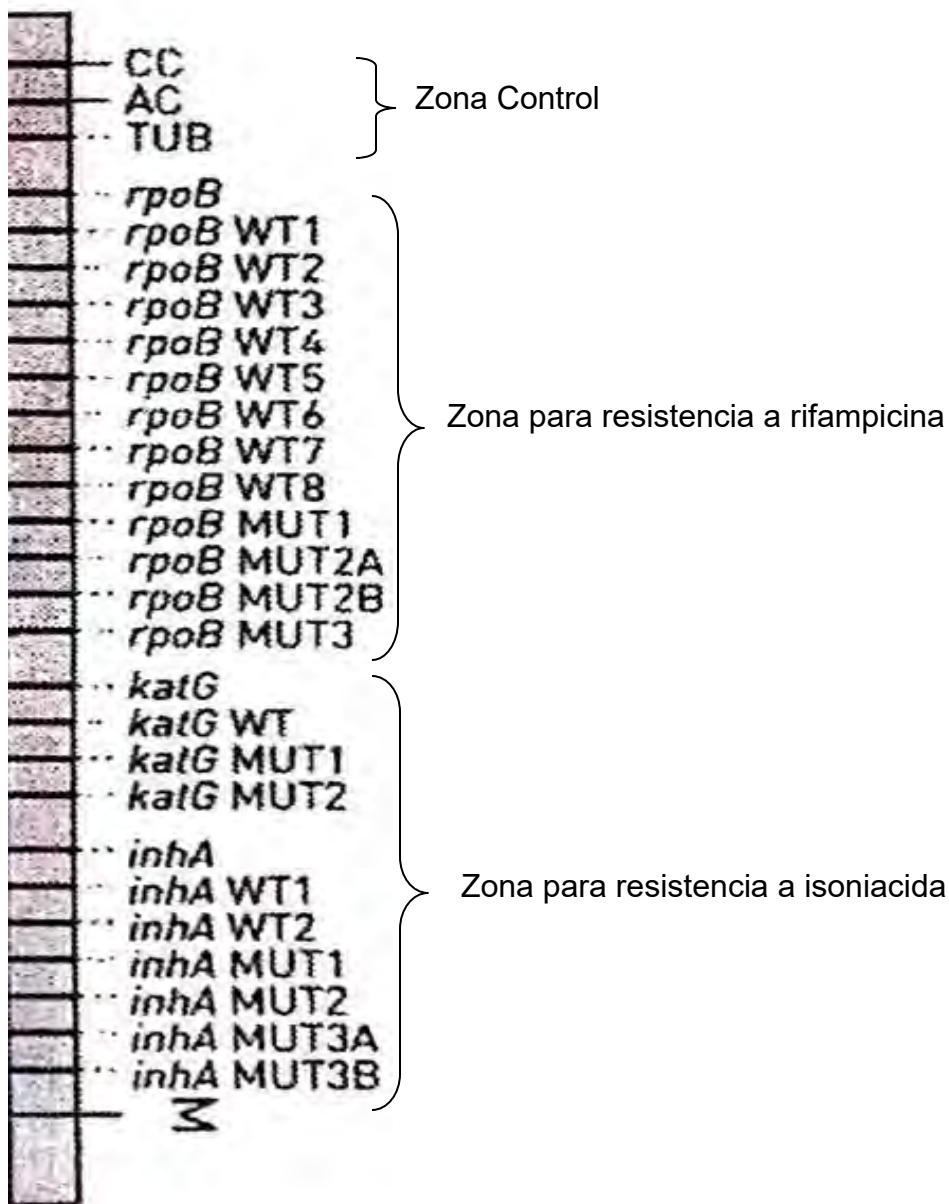
La técnica de PCR IS6110 es la que presenta mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*. IS6110 es un elemento genético de inserción, se le denomina IS, del inglés insertion sequence; ésta representa secuencias de DNA dispersas en los genomas bacterianos con actividad de transposición. La secuencia IS6110 solo es detectable en genomas bacterianos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y tiene la estabilidad necesaria para ser utilizada como herramienta de diagnóstico (47).

### 1.5.2 Ensayo de sonda en línea: Genotype® MTBDRplus

La prueba Genotype®MDRTBPlus utiliza tiras reactivas de nitrocelulosa que contienen regiones parciales de los genes *rpoβ*, *katG* e *inhA* fijadas sobre ella. La prueba está basada en un PCR múltiple que genera múltiples productos de amplificación (sondas) los cuales, mediante una hibridación reversa, reconocen las mutaciones génicas (en forma de bandas sobre la tira) más frecuentes asociadas con la resistencia a isoniacida y rifampicina. Esta prueba es novedosa, útil y rápida para la detección de la resistencia a drogas antituberculosas (48).

Una tira de Genotype®MTBDRplus contiene 27 bandas de reacción: 21 bandas que señalan las mutaciones (once bandas wild type (WT) es decir no presenta mutaciones y diez bandas de resistencia a antibióticos (MUT)) y seis bandas control (CC: control de conjugado, AC: control de amplificación, TUB: control de complejo *M. tuberculosis* y controles de amplificación para los locus (genes) *rpoβ*, *katG* e *inhA*). Las once bandas WT incluyen ocho bandas para el gen *rpoβ*, una banda WT para el gen *katG* y dos bandas WT para el gen *inhA*, mientras que las diez bandas MUT incluyen cuatro bandas con mutaciones para el gen *rpoβ*, dos bandas con mutaciones para el gen *katG* y cuatro bandas con mutaciones para el gen *inhA* (Figura 11) (48).

La presencia de una o más bandas MUT, la ausencia de una o más bandas WT o la combinación de ambas en cada zona de la droga, será señal de la existencia de cepas resistentes a una droga o a ambas.



**Figura 11.** Patrón representativo de las zonas de reacción en cada tira de reacción del sistema Genotype® MTBDRplus (49)

CC: control de conjugado, AC: control de amplificación, TUB: control de complejo *M. tuberculosis* y controles de amplificación para los locus (genes) *rpoB*, *katG* e *inhA*, WT: wild type, es decir no presenta mutaciones, MUT: bandas de resistencia a antibióticos.

### 1.5.3 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real (qPCR) es una variante de la PCR convencional, sin embargo la qPCR es más sensible, altamente específica, analiza en tiempo real el producto de amplificación obtenido y no requiere de un análisis post-PCR. Para la detección del CMT mediante qPCR se utiliza la misma secuencia de inserción IS6110 que en el método de detección por PCR convencional como gen blanco. Además de los iniciadores, se diseñó una sonda tipo *TaqMan* marcada con un fluoróforo (reportero) y un apagador (quencher). Durante la qPCR la sonda *TaqMan* hibrida con su secuencia complementaria, posteriormente los iniciadores se unen a su cadena complementaria y la enzima DNA polimerasa comienza la polimerización; al llegar la enzima al sitio donde está unida la sonda, la degrada y libera al fluoróforo de su apagador, emitiendo una señal que es captada por el termociclador para tiempo real. Dicha señal permite saber que el fragmento de interés está siendo amplificado y da como resultado una muestra positiva al CMT, en caso de que la muestra fuera negativa no se observa ninguna señal ya que ni la sonda ni los iniciadores se unirían a sus secuencias complementarias (50).

#### **1.5.4 Microarreglos de DNA**

Son un conjunto de sondas moleculares fijadas de manera ordenada sobre un soporte sólido. Estas sondas pueden ser clones de DNA, productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o bien oligonucleótidos sintéticos.

Los microarreglos son en la actualidad una poderosa herramienta de análisis de expresión de genes debido al mayor número de secuencias que se pueden analizar por prueba y tienen grandes ventajas sobre otras técnicas como la PCR convencional y la PCR en tiempo real, en las cuales sólo se pueden analizar un número muy limitado de genes de manera simultánea, debido a que en la mayoría de los casos que se requiere montar un ensayo por cada gen a analizar (51).

En términos generales, un microarreglo se encuentra integrado por dos partes, el material biológico o sintético denominado como prueba y el soporte sólido en el cual se inmovilizan o adsorbe el material biológico; este material puede ser de distintas naturalezas; entre los materiales más usados encontramos plástico, vidrio, gel, silicón, membranas porosas (52).

El trabajo con microarreglos podemos dividirlo en cuatro etapas (Figura 11):

1. Selección del tipo de microarreglo y de las secuencias que se colocarán en el soporte.

2. Obtención de la muestra biológica.

- 2.1 Purificación del DNA o RNA.

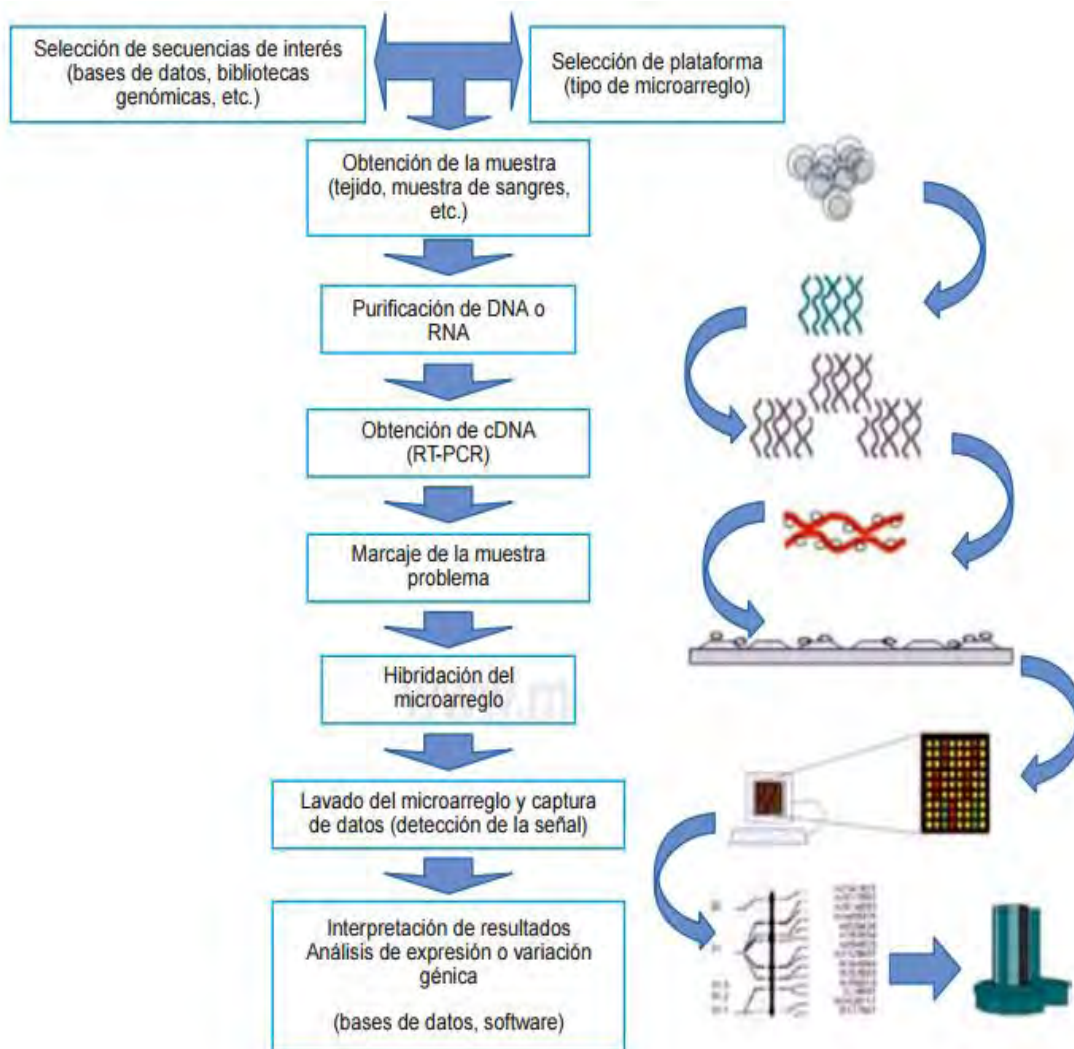
3. Amplificación del material genético (PCR).

### 3.1 Marcaje de la muestra problema.

## 4. Hibridación del microarreglo.

### 4.1 Captura de resultados.

### 4.2 Análisis de resultados



**Figura 12.**Esquema general de trabajo con microarreglos de DNA (51).

En un estudio realizado por Kato-Maeda (53) en el que se pretendía obtener información sobre las bases moleculares de la diversidad bacteriana y de la evolución de *Mycobacterium tuberculosis* se utilizaron microarreglos de DNA que contienen los genes que constituyen el genoma de este microorganismo. Se analizaron 19 cepas de *M. tuberculosis* de 16 clones diferentes y tras purificación del genoma, digestión con DNAsa y marcado terminal con biotina se procedió a la hibridación con los microarreglos, revelando posteriormente con estreptavidina-ficoeritrina. Los resultados demostraban deleciones importantes en el genoma de algunas de las cepas y que estas deleciones se asociaban con una menor patogenicidad.

### **1.5.5 Pirosecuenciación**

La secuenciación genética representa el patrón de referencia tanto para identificar el microorganismo como para conocer la presencia de mutaciones de resistencia. Hasta ahora era un método caro y laborioso, sin embargo recientemente se han producido avances tecnológicos sobresalientes en este campo con el desarrollo de una nueva metodología denominada pirosecuenciación. Se trata de una técnica semiautomatizada, de alto rendimiento y que puede convertirse en una alternativa real a las técnicas actuales. Los estudios realizados hasta la fecha demuestran que puede ser útil en la identificación de las distintas especies de micobacterias, así como en la determinación de mutaciones de resistencias a fármacos de primera y segunda línea.

El fundamento de esta técnica consiste en la detección del pirofosfato (PPi) que se libera durante la incorporación de un dNTP al DNA, reacción catalizada por la polimerasa. Posteriormente, la ATP sulfirasa convierte el PPi liberado en ATP. El cual provee la energía a la luciferasa para oxidar luciferina y generar luz visible que es proporcional al número de dNTP que se han incorporado a la nueva molécula de de DNA durante su síntesis.

La combinación de este principio con el PCR en emulsión de una sola molécula fue aprovechado para generar un secuenciador automatizado que funciona de la siguiente manera:

Un fragmento grande de DNA se fragmenta mediante sonicación o nebulización, generando varios fragmentos de cientos de pares de bases (librería de DNA) que son ligados a un oligonucleótido adaptador. La librería se diluye a una concentración de una molécula, se desnaturaliza y se hibridiza a perlas individuales que contienen secuencias complementarias a los oligonucleótidos adaptadores. Las esferas se colocan en diferentes compartimentos (microvesícula) de agua en aceite y aquí se efectúa una reacción de PCR con lo que logra varias copias de la molécula de DNA que fue colocada en la microvesícula. Las perlas que contienen el DNA amplificado se diluyen y se colocan en una microplaca con enzimas de secuenciación. La reacción de pirosecuenciación se efectúa de manera paralela en todos los pozos de la microplaca mediante la adición sucesiva de los cuatro dNTP. La incorporación de nucleótidos en cada pozo que contiene el molde clonalmente amplificado produce la liberación de pirofosfatos que finalmente se detecta en forma de luz y es



registrado en una cámara acoplada a carga. Con esta técnica en una sola corrida se pueden obtener  $1 \times 10^6$  lecturas con fragmentos de DNA de 400 pb, es decir, hasta 500 millones de pares de bases (54).

### **1.5.6 Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos**

El método LAMP está basado en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, el cual es llevado a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de cadena y un sistema de dos cebadores internos y dos cebadores externos para reconocer un total de seis secuencias distintas en el DNA blanco.

En los pasos iniciales de la reacción de LAMP, se utilizan los cuatro cebadores, pero cuando se completa un ciclo de la reacción solo los cebadores internos son usados para la síntesis de DNA. Los cebadores internos se denominan Forward Inner Primer (FIP) y Backward Inner Primer (BIP), respectivamente, y cada uno contiene dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del DNA blanco, uno para cebar en la primera etapa y el otro para auto-cebarse en etapas posteriores. Las secuencias (23-24 nucleótidos típicamente) dentro de ambos extremos de la región blanco para la amplificación en un DNA son denominadas F2c y B2, respectivamente. Dos secuencias internas (23-24 nucleótidos típicamente) a 40 nucleótidos de los extremos de F2c y B2 son designadas F1c y B1 y dos secuencias (17-21 nucleótidos) externas a los

extremos de F2c y B2 son denominadas F3c y B3. Las secuencias de FIP y BIP son diseñadas así: FIP contiene F1c, un espaciador de TTTT y la secuencia F2 complementaria a F2c. BIP contiene la secuencia B1c complementaria a B1, un espaciador de TTTT y a B2. Los dos cebadores externos consisten en B3 y la secuencia F3 complementaria a F3c (55).

Una muestra de DNA que contiene la secuencia blanco y los cuatro cebadores se desnaturaliza con calor y rápidamente se enfría en hielo. La reacción de LAMP se inicia después por la adición de un fragmento considerable de DNA polimerasa Bst (*Bacillus stearothermophilus*) y es llevada a 65°C durante una hora (56).

El cebador interno FIP se une a F2c en el ADN blanco e inicia la síntesis de la hebra complementaria. El cebador externo F3, que es unas pocas bases más cortas y está en menor concentración que FIP, lentamente se une a F3c en el DNA blanco e inicia la síntesis de DNA por desplazamiento de la hebra. Al liberar una cadena complementaria unida a FIP, puede formar una estructura enrollada (en bucle, crespo o asa; del inglés, loop) en un extremo. Esta hebra sencilla de DNA sirve como molde para la síntesis de DNA iniciada por BIP y la subsiguiente síntesis de DNA por desplazamiento de la hebra a partir del cebador B3 originando la producción de un DNA en forma de doble asa (dumb-bell), que es rápidamente convertida a una forma de bucle en tallo (stem loop) por la síntesis de DNA del autocebador. A continuación, esta forma sirve de inicio para los ciclos de LAMP, la segunda etapa de la reacción de LAMP (56).

Para iniciar los ciclos de LAMP, FIP se une a la estructura en herradura de DNA y se inicia la síntesis por desplazamiento de la hebra, lo que genera una separación intermedia en la estructura en herradura de DNA con una copia invertida adicional de la secuencia blanco en la base y un asa o bucle formada en el extremo opuesto a través de la secuencia BIP. Posteriormente, la síntesis de DNA por desplazamiento de la hebra produce una estructura complementaria a la herradura de DNA original y un DNA en herradura reparado con una base elongada dos veces (hasta el doble de copias de la secuencia blanco) y un bucle en el extremo opuesto. Ambos productos sirven luego como molde para un cebador BIP en los ciclos siguientes de la reacción por desplazamiento de la hebra, de los cuales, una parte es denominada elongación y reciclaje. Así, la secuencia original de LAMP es amplificada tres veces cada medio ciclo. Los productos finales son una mezcla de DNA en herradura con diferentes longitudes en su tallo y con estructuras similares a una coliflor con múltiples bucles formados por la unión entre repeticiones invertidas alternativas de la secuencia blanco en la misma cadena (56).

El uso de cuatro cebadores (reconocimiento de seis secuencias diferentes) en las etapas iniciales de LAMP y dos cebadores (reconocimiento de las cuatro secuencias) durante los siguientes pasos garantiza alta especificidad para la amplificación. Por lo tanto, se espera que la selectividad del blanco sea superior a las obtenidas por PCR.

Los métodos de detección del producto amplificado pueden ser detección visual por turbidez, detección visual por fluorescencia, detección visual por sustancias que se integran al producto (55).

## **1.6 Tratamiento de la tuberculosis**

El tratamiento se prescribe por el personal médico. Se distingue en primario acortado que es el tratamiento que comprende la administración de cuatro fármacos en 60 dosis durante la fase intensiva y dos fármacos en 45 dosis durante la fase de sostén; y retratamiento, el cual, es el tratamiento que instituye el médico especialista a un enfermo de tuberculosis farmacorresistente, basado en el resultado del estudio de susceptibilidad antimicrobiana y avalado por el Comité Estatal correspondiente. Se administra en cualquier localización de la enfermedad. Los tratamientos deben ser estrictamente supervisados (por personal de salud o personal comunitario capacitado por personal de salud), ya que la supervisión respecto a la ingestión de fármacos es el único procedimiento que ofrece completa seguridad y asegura la curación.

Los fármacos que se utilizan en el tratamiento primario acortado estrictamente supervisado (TAES) de la tuberculosis, son: Isoniacida (H), Rifampicina (R), Pirazinamida (Z), Estreptomina (S) y Etambutol (E), cuyas presentaciones, dosis y reacciones adversas se señalan en la tabla 1.

El esquema de tratamiento primario acortado se debe administrar aproximadamente durante 25 semanas, hasta completar 105 dosis, dividido en dos etapas: fase intensiva, 60 dosis (diario de lunes a sábado con HRZE); y fase de sostén, 45 dosis (intermitente, 3 veces a la semana, con HR), con fármacos en combinación fija y etambutol separado, o separados si el paciente pesa menos de 50 kg según se indica en la tabla 2.

Fármacos	Clave	Dosis diaria			Dosis intermitentes (a)			Reacciones adversas
		Presentación	Niños mg/Kg Peso	Adultos mg/Kg peso	Dosis máxima /día	Niños mg/Kg peso	Adultos mg/Kg peso	
isoniacida (H)	2404	Comp. 100mg	10-15 mg	5-10 mg	300 mg	15-20 mg	600- 800 mg	Neuropatía periférica  Hepatitis
Rifampicina (R)	2409 2410	Caps. 300mg  Jarabe 100 mg/5 ml	15 mg	10 mg	600 mg	15-20 mg	600 mg	Hepatitis  Hipersensibilidad  Interacciones medicamentosas
Pirazinamida (Z)	2413	Comp. 500 mg	25-30 mg	20-30 mg	1.5-2 g	50 mg	2.5 g	Gota  Hepatitis
Estreptomicona (S) (b) (c)	2403	Fco. Amp. 1 g	20-30 mg	15 mg	1 g	18 mg	1 g	Vértigo  Hipoacusia  Dermatosis
Etambutol (E) (d)	2405	Comp. 400 mg	20-30 mg	15-25 mg	1200 mg	50 mg	2400 mg	Alteración de la visión

**Tabla 1.** Fármacos antituberculosos (57)

**(a)** 3 veces por semana, según la tabla de referencia. **(b)** Enfermos con menos de 50 kg de peso y mayores de 50 años, mitad de la dosis. **(c)** No utilizar durante el embarazo. **(d)** No usarlo en niñas y niños menores de 8 años.

Fase intensiva	Diario, de lunes a sábado, hasta completar 60 dosis Administración en una toma	
Fármacos	Separados  (dosis)	Combinación fija clave 2414  (presentación) 4 grageas de:
Rifampicina	600 mg	150 mg
Isoniacida	300 mg	75 mg
Pirazinamida	1 500 a 2 000 mg	400 mg
Etambutol (a)	1 200 mg	Clave 2405 (presentación) 3  tabletas de :  400 mg
Fase de sostén	Intermitente, 3 veces por semana, lunes, miércoles y viernes, hasta completar 45 dosis Administración en una toma.	
Fármacos	Separados  (dosis)	Combinación fija clave 2415  (presentación) 4 capsulas de :
Isoniacida	800 mg	200 mg
Rifampicina	600 mg	150 mg

**Tabla 2.** Tratamiento acortado primario estrictamente supervisado (57)

Combinación fija: Clave 2414 gragea RHZ (R 150 mg, H 75 mg y Z 400 mg) y clave 2415 cápsula HR (H 200 mg y R 150 mg), en niñas y niños se debe administrar fármacos en presentación separada, de acuerdo con las dosis indicadas en la tabla 1. (a) Usar sólo en mayores de 8 años. Puede ser reemplazado por estreptomicina, a dosis como se indica en la Tabla 1.

En todos los pacientes con tuberculosis del sistema nervioso central, miliar (diseminada), u ósea, el tratamiento debe ser administrado durante un año aproximadamente, dividido en dos etapas: fase intensiva, 2 meses (diario de lunes a sábado con HRZE); y fase de sostén, 10 meses aproximadamente (intermitente, 3 veces a la semana, con HR).

En los enfermos multitratados, los que hayan fracasado en un tratamiento estrictamente supervisado, aquéllos con baciloscopía positiva al cuarto mes de tratamiento o con dos baciloscopías positivas de meses consecutivos después de un periodo de negativización y recaídas, se debe confirmar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* por cultivo, y realizar en su caso estudios de susceptibilidad a fármacos. Estos pacientes deben ser evaluados por el Comité Estatal correspondiente, quien debe definir el esquema de tratamiento.

El control y evaluación del tratamiento se llevará a cabo cada mes, o en menor lapso cuando la evolución del enfermo lo requiera, de la siguiente manera:

Clínico: control con revisión del estado general del enfermo, evolución de los síntomas, sobre todo en niñas y niños, verificación de ingesta y deglución del fármaco.

Bacteriológico: control con una baciloscopía mensual. Será favorable cuando la baciloscopía sea negativa desde el tercer mes de tratamiento, o antes, y persista negativa hasta terminar las dosis requeridas para cada esquema; y desfavorable, cuando persista positiva desde el cuarto mes de tratamiento (sospecha de fracaso o farmacorresistencia) o presente bacilos copias positivas en meses consecutivos, confirmadas por cultivo después de un periodo de negativización.

Radiológico: se efectuará en adultos como estudio complementario, cuando exista el recurso; en niñas y niños es indispensable al inicio y al final, si es posible cada dos meses. La curación del enfermo ocurre muy frecuentemente con persistencia de lesiones cicatriciales, evidentes en la radiografía de tórax, por lo que el control debe basarse en la evaluación clínica y bacteriológica.

Al completar el esquema de tratamiento, el caso debe clasificarse como: curado, término de tratamiento o fracaso. Los casos que no terminan tratamiento deben clasificarse como: defunciones, traslados o abandonos.

La infección por HIV es un factor de riesgo para tuberculosis. La tuberculosis, en cualquiera de sus formas, es criterio para que un paciente infectado por el VIH sea considerado como caso de síndrome de la inmunodeficiencia adquirida conforme a lo establecido en la NOM-010-SSA2-1993, Para la Prevención y Control de la Infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Todos los pacientes con HIV



positivo, sin datos clínicos de tuberculosis, deben recibir quimioprofilaxis con Isoniacida (57).

### **1.7 Farmacorresistencia de *M. tuberculosis***

Se entiende como farmacorresistencia cuando una población bacilar de *M. tuberculosis* aislada de un enfermo, es resistente a la acción de uno o varios fármacos antituberculosos. En los pacientes que no han recibido ningún tratamiento previo con medicamentos antituberculosos, la resistencia bacteriana se denomina resistencia primaria, para los casos de pacientes en los que hay constancia de un tratamiento anterior (de más de un mes de duración) la resistencia bacteriana se denomina resistencia adquirida (58).

La resistencia a los antimicrobianos usados en el tratamiento de las enfermedades infecciosas es un mecanismo natural de defensa de los microorganismos que generalmente es desencadenado por el hombre. El uso de monoterapia en el tratamiento de la tuberculosis, la falta de apego del paciente al tratamiento por diversos factores, el empleo de regímenes de tratamiento inadecuados, el abastecimiento incompleto de los medicamentos antituberculosos, así como el empleo de medicamentos de mala calidad, si bien evita el crecimiento del bacilo, permite la multiplicación de cepas resistentes (59).

La resistencia a fármacos en *M. tuberculosis* se debe principalmente a la acumulación de alteraciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que

codifican para los sitios de acción de los antibióticos empleados para el tratamiento de la tuberculosis.

Se han hecho estudios en México sobre cepas del linaje Indo-Este- Africano (EAI), el más prevalente en el sureste de Asia identificando el subtipo EAI2-Manila el cual se caracteriza por su alta virulencia y farmacorresistencia a todos los medicamentos de primera línea, detectándose en pacientes de los estados de Guerrero, Jalisco, Tamaulipas y Tabasco. Así mismo se ha detectado el linaje Beijing de alta virulencia en pacientes de los estados de Baja California, Sinaloa y Veracruz (estados de alta incidencia en tuberculosis). Ambos linajes pertenecen a estados de alta migración tanto por el área del Pacífico como del Golfo de México a Estados Unidos de América (60). Si bien la mayoría de casos de tuberculosis son sensibles a medicamentos, la tuberculosis multifármaco resistente (TB-MFR) representa una amenaza emergente para el control mundial de la enfermedad (61).

La magnitud global de la farmacorresistencia según estima la OMS, es que los pacientes con TB de algunas zona de Europa Oriental y Asia Central tienen una probabilidad 10 veces mayor de presentar alguna cepa resistente que el resto del mundo; esto coincide con el aumento de infección por el HIV. Otros países afectados son Ecuador, Israel, Sudáfrica, Estonia, Kazajstán, Letonia, Lituania y algunas federaciones de la región Rusa donde la farmacorresistencia en nuevos casos de TB alcanza el 14%. (62-64).

En México, entre 1986 y 1990, como parte de una encuesta realizada en países de Latinoamérica promovida por la OMS y por la Organización Panamericana de Salud (OPS), se encontró 19.1% de resistencia primaria (65). Entre 1989 y 1993, el INDRE evaluó la susceptibilidad de 811 aislamientos de diversos estados, encontrando una resistencia primaria de 8.3% (66).

Sifuentes y col. en 1995, reportaron que en el Instituto Nacional de Nutrición, los resultados mostraron tasas de resistencia primaria a isoniacida de 9%, rifampicina del 6% y de MFR del 6%, así como tasas elevadas de resistencia secundaria: isoniacida 44%, rifampicina (35%) y MFR (35%) (67).

En 1997, en una encuesta realizada en tres estados de la república, se encontraron niveles de resistencia de 12.9% y en casos de TB con tratamiento anterior se encontró una tasa de resistencia del 50%, a uno o más medicamentos de primera línea como isoniacida, rifampicina y piracinamida y niveles de MFR de 2.4% en casos sin historia de tratamiento previo y de 22.4% en casos con tratamiento previo (68). En 1998, en 427 aislamientos hechos en Baja California, México, se encontró el 17% de MFR (69).

En Febrero de 2009 la Secretaria de Salud de México finalizó la primera encuesta nacional de farmacorresistencia en donde se analizaron 2500 aislados de *M.tuberculosis*: encontrando 2.4% de aislados MFR, lo que indica la continua diseminación de aislados farmacorresistentes en la población (70).

México reportó para el año 2012 un total de 161 casos de TB con resistencia a medicamentos de los 470 estimados por OMS (34%). La proporción de TB-MFR

entre casos nuevos fue del 3,1% para ese mismo año. 15 de los 32 estados concentran el 90% de los casos en tratamiento, siendo los más afectados: Baja California, Guerrero, Puebla y Chihuahua (Figura 12) (71).

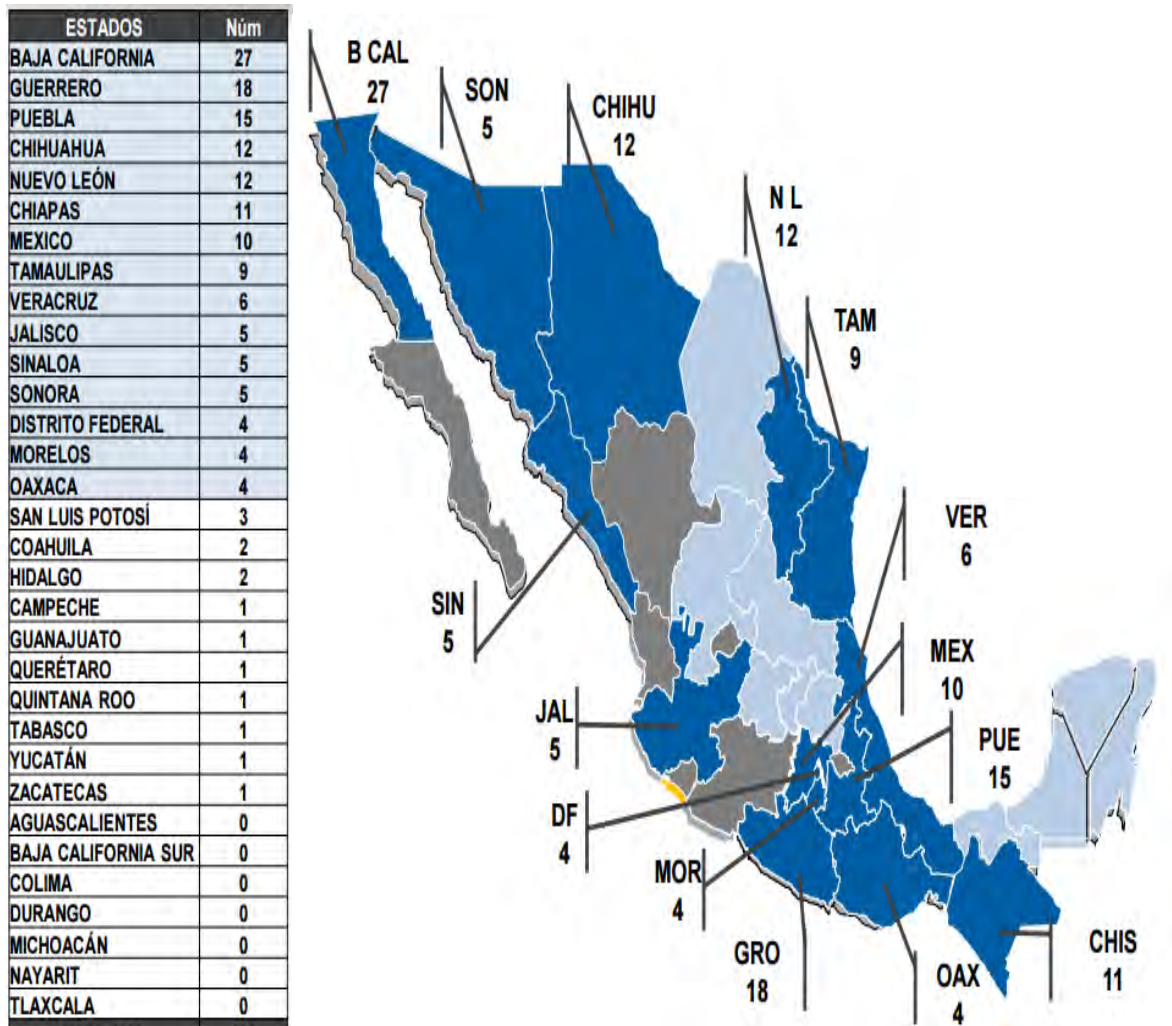


Figura 13. Casos de TB-FR en México 2012 (71).

### **1.7.1 Marcadores genéticos para determinar resistencia en *M. tuberculosis***

Las micobacterias poseen características únicas que les confieren resistencia natural a los fármacos antibacterianos más utilizados. Su pared hidrofóbica es una barrera para muchos fármacos y poseen mecanismos transportadores que expulsan a los fármacos fuera de los bacilos. También hidrolizan o modifican fármacos sintetizando enzimas para dicho fin, lo cual explica por qué solo unos cuantos medicamentos son efectivos *contra M. tuberculosis* (72).

La resistencia a los fármacos antituberculosos surge como resultado de mutaciones espontáneas en el genoma de *M. tuberculosis*. Estas mutaciones aparecen en una población bacilar dada, con una probabilidad esperada para cada fármaco; por ejemplo, en el caso de la isoniacida la tasa es de  $10^{-6}$  y en el caso de la rifampicina es de  $10^{-8}$ . Por lo tanto, en pacientes con TB activa, pueden seleccionarse estas subpoblaciones resistentes, debido a la presión provocada por los fármacos que le son administrados (73).

En la última década se han identificado varias regiones genómicas de *M. tuberculosis* relacionadas con el desarrollo de resistencia a isoniacida y rifampicina. Aunque se considera que la isoniacida y la rifampicina representan la parte total de la quimioterapia acortada, la mayor parte de las pruebas moleculares están dirigidas a la detección de la resistencia a rifampicina ya que se considera un buen marcador para TB-MFR, sobre todo en regiones con alta prevalencia (74). Para evaluar la resistencia hacia isoniacida se analizan principalmente

mutaciones en los genes *katG* e *inhA* y para la resistencia a rifampicina las mutaciones en el gen *rpoβ* (75).

### **1.7.2 Resistencia a isoniacida**

La isoniacida es un potente fármaco antituberculoso y bactericida que se utiliza contra la TB desde 1952 (76), actúa específicamente contra bacterias que se encuentran en fase de replicación activa (77).

La mayoría de los reportes sobre resistencia a isoniacida sugieren que las mutaciones *katG* Ser315Thr, conjuntamente con la mutación del promotor del gen *inhA*, explican la mayor parte de la resistencia, aun cuando en un pequeño porcentaje de cepas, la resistencia no puede atribuirse a alteraciones en la secuencia de estos genes.

Los estudios realizados por Zhang y colaboradores en 1992, sobre el mecanismo de acción de la isoniacida demostraron que es un profármaco que es activado por la enzima catalasa-peroxidasa codificada por el gen *katG* (78).

El gen *katG* tiene un tamaño de 1.771 pares de bases; no obstante, las mutaciones se concentran dentro de la región codificante que comprende los codones 300 al 507, siendo las más reportadas las sustituciones de la serina 315 por treonina (Ser315Thr) y el residuo de arginina 463 por leucina (Arg463Leu). Otras mutaciones de menor frecuencia se han reportado en los codones 300, 321, 418, 463, 501, 525, 587 y 700 (79)

En 2011 Araya Pamela y col. detectaron mutaciones en el gen *katG*, estas mutaciones fueron detectadas en 23 de las 26 cepas resistentes a isoniacida (88,5%), pero en ninguna de las 10 cepas susceptibles. En 20 cepas se encontró una mutación puntual y en 2 cepas se detectó una delección de 3 bases. La mutación más común correspondió al codón 315 de *katG*, en 18 cepas se identificó la mutación AGC→ACC y 1 cepa la mutación AGC→ACG. Ambas mutaciones producen la sustitución de serina por treonina en este codón (Ser315Thr) (80).

En 2012, Bolado Martínez y col. analizaron 22 cepas clínicas de *M. tuberculosis* aisladas e identificadas en el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) en Hermosillo, Sonora, México. De las 16 cepas con resultados previos de farmacoresistencia, seis mostraron resistencia exclusiva a isoniacida, siete fueron MFR y tres fueron susceptibles a ambos fármacos. La mutación S315T se presentó en 27.3% (81)

En Monterrey, México, esta mutación se observó en 67.6% de 25 aislamientos clínicos resistentes a isoniacida (82), mientras que en el Sureste de México se demostró que 52% de 17 aislamientos presentaban esta mutación (83). En el mismo codón (*katG* 315) se detectó una mutación poco frecuente en el nucleótido 945, que produjo la sustitución Ser315Arg. Esta mutación sólo se ha observado en una cepa recuperada de un paciente en China (84).

En un estudio realizado en 2012 por Zolay Romayy col. la mutación Ser315Thr fue detectada en 88,2% de las cepas resistentes a isoniacida (85), una frecuencia

ligeramente superior a la reportada en diversos estudios (Tabla 3), demostrando la importante contribución de la mutación Ser315Thr en la resistencia a isoniacida en los aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

<b>Autores</b>	<b>Población, año de publicación</b>	<b>Numero de cepas resistentes a isoniacida</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Caws Maxime y cols</b>	Vietnam, 2007	47	80.0
<b>Mathuria J y cols</b>	India, 2009	121	72.7
<b>Ahmad S y cols</b>	Kuwait, 2009	60	78.7
<b>Yao C y cols</b>	China, 2010	50	82.0
<b>Zhang L y cols</b>	China, 2010	26	84.6
<b>Perizzolo y cols</b>	Brasil, 2011	97	80.2
<b>Tukvadze</b>	Georgia, 2012	159	78.0
<b>Zolay R</b>	Venezuela, 2012	19	88.2

**Tabla 3.** Contribución de las mutaciones en el gen katG a la expresión de resistencia a isoniacida en *M. tuberculosis*.



Otro blanco del derivado activo de la isoniacida es la enzima inhA, la cual es una enoil reductasa específica de NADH que participa en el alargamiento de los ácidos grasos de la pared micobacteriana. La región promotora de su gen codificante (inhA), regula la expresión de la proteína. Las mutaciones en esta región puede disminuir el nivel de expresión de la proteína acarreadora enoil-acil reductasa y una que se ha analizado para detectar resistencia a isoniacida es la sustitución de cisteína por treonina en el codón (Cys15Thr) en el promotor del operón mabA-inhA (86).

Se ha observado que un 15% de cepas resistentes a isoniacida presentan mutaciones en el locus kasA lo cual implica que otro posible objetivo de isoniacida es la proteína kasA, involucrada en el mecanismo de elongación de los ácidos grasos. También se han reportado con menor frecuencia mutaciones involucradas en la adquisición de resistencia a isoniacida en el genoxyR-ahpC (87).

### **1.7.3 Resistencia a rifampicina**

La rifampicina impide el inicio de la transcripción, inhibiendo la síntesis de RNAm al unirse a la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa donde radica el sitio activo de dicha enzima. El mecanismo de resistencia consiste en la presencia de mutaciones en el gen rpo $\beta$ , el cual codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa; las modificaciones que ocasiona a nivel estructural en esta subunidad impiden que el fármaco interactúe adecuadamente, con el sitio activo de la RNA polimerasa, la mutación más común ocurre en el codón 531 (Ser531Leu) en el

90% de los casos. También se presenta el cambio Ser-Gln o Trp que se encuentra en el 50% de las cepas resistentes y la mutación en el codón 526 (His-Tyr, Asp o Arg) que se observa en el 30% de los casos (88).

En total, el 95% de las cepas resistentes a rifampicina, comprenden estas mutaciones dentro de una región de 81 pb (codones 507 a 533) del gen *rpoβ*, también llamada región determinadora de resistencia a rifampicina (89). Las mutaciones en esta región incluyen delecciones, inserciones, sustituciones, siendo las más frecuentes las delecciones y las inserciones en las poblaciones de aislados que se han reportado a la fecha, en codones para asparagina 516, histidina 526 y serina 531(88).

En 2002 Agapito J y col. de las 62 cepas de *M. tuberculosis* utilizadas en su estudio, 52 cepas que corresponden a un 84% fueron resistentes a rifampicina y 10 cepas que corresponden al 16% presentaron sensibilidad a dicho fármaco. De las cepas resistentes, 27 (52%) tuvieron resistencia primaria y 25 (48%) adquirida. Todos los productos de amplificación obtenidos por PCR mostraron un mismo tamaño (350 pb) para la región del gen *rpoβ* en todas las cepas aisladas. El secuenciamiento de los productos de amplificación de 62 cepas de *M. tuberculosis* (52 resistentes y 10 sensibles a rifampicina) mostraron las siguientes mutaciones en una región corta de 81pb del gen *rpoβ*: 62.7% de las mutaciones ocurrió en el codón 531(58.8% cambió Ser-Leu y 3.9% de Ser-Trp). El 15.7% de las mutaciones ocurrió en el codón 526 (7.9% cambió His-Leu, 5.9% de His-Tyr y 1.9% cambió His-Asp). 11.8% de las mutaciones ocurrió en el codón 516 (5.9% cambió Asp-Val, 1.9% Asp-Tyr, 1.9% Asp-His y 1.9% cambió Asp-Ala). 5.9% de las mutaciones

ocurrió en el codón 513(1.9% cambió Gln-Pro, 1.9% Gln-Lys y 1.9% cambió Gln-Leu). Otras mutaciones con menores frecuencias se observaron en los codones 522, 527, 533, 520, 511 y 512 (90).

En 2011, Araya Pamela y col. realizaron un estudio acerca de la detección de mutaciones asociadas a multifármaco resistencia en Chile; en 22 (88%) de las 25 cepas resistentes a rifampicina se identificaron mutaciones en los codones: 516 (4 cepas), 526 (4 cepas) y 531 (14 cepas). En el codón 531 se encontraron las mutaciones Ser531Leu y Ser531Trp. Las mutaciones en los codones 516 y 526 produjeron la sustitución Asp516Val e His526Tyr, respectivamente. En ninguna de las cepas susceptibles se encontraron mutaciones. (91).

En Sonora, México, Bolado Martínez y col. en 2012 encontraron en el gen *rpoβ* dos mutaciones; 50% de las ocho cepas resistentes a rifampicina tuvieron una mutación Ser456Leu, un porcentaje menor al reportado por Heep y colaboradores (65%) en aislamientos clínicos de Alemania (92). La mutación His451Tyr del gen *rpoβ*, no descrita previamente, fue detectada en dos cepas.

## **1.8 Epidemiología molecular de la tuberculosis**

La epidemiología molecular de la TB ha aportado información de gran utilidad respecto de la transmisión de la enfermedad, utilizándose como un complemento a la epidemiología clásica. El conocimiento de los distintos genotipos del CMT ha permitido conocer los tipos más prevalentes en determinadas localizaciones geográficas (93), ha permitido identificar diferentes factores de riesgo para la

transmisión de TB en la población, la expansión de clonas de importancia clínica, la dinámica de transmisión y la patogénesis de la TB (94), las asociaciones entre los perfiles genéticos y su origen geográfico (95), la discriminación entre cepas relacionadas y no relacionadas clonalmente (96). Así mismo, ha permitido responder más adecuadamente a la pregunta de cuantos casos se deben a reactivación y cuantos a infecciones recientes e identificar patrones de transmisión en distintos subgrupos poblacionales (97).

Hoy se sabe que ciertos genotipos se diseminan con mayor rapidez (mayor transmisibilidad) o que causan enfermedad de mayor gravedad, asociado a la multi-resistencia; también se ha establecido relaciones entre los genotipos y la respuesta inmunológica del hospedero (98), lo que justifica la necesidad de identificar aquellos prevalentes en cada país o región.

Se han descrito como prevalentes en el mundo los genotipos Haarlem, Latino América-Mediterráneo, T, Este de África-India, Central-Asia, X y Beijing. El genotipo Haarlem (H), descrito en el año 1999 (99), en pacientes holandeses, es prevalente en los Países Bajos y el norte de África donde ha causado brotes de TB-MFR. El genotipo Latino América-Mediterráneo (LAM), es prevalente en Latinoamérica y España, sugiriendo orígenes comunes relacionados a la colonización hispana (100,101).

El genotipo T está localizado en países de varios continentes como Etiopía, Rusia, Madrid y Europa Central (100); el genotipo Este de Africa-India (EAI), muy frecuente en áreas del lejano Oriente, Asia y Oceanía (102); el genotipo Central-

Asia (CAS) o Delhi, localizado en el Medio Oriente, Asia Central, Europa y Australia, lo que lo vincula con los inmigrantes del sur de Asia (100).

El genotipo X es prevalente en América del Norte y regiones de América Central sugiriendo una ascendencia anglosajona o incluso afro-americana(103) y por último el genotipo Beijing, endémico y con un claro predominio en ciertas regiones del extremo Oriente, Asia y Oceanía, exceptuando India subcontinental y Sudáfrica (104,105) se ha asociado a alta transmisibilidad, multi-resistencia (106) y mayor poder patógeno asociado a la baja inducción de citoquinas inflamatorias, lo que permitiría un mayor crecimiento intracelular del CMT (107).

En los Estados Unidos de América, específicamente en Nueva York, en el año 1991, durante un brote que afectó a ocho pacientes con TB resistente a isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomycin, kanamicina, etionamida y rifabutina, se identificó el genotipo "W", que fue posteriormente asociado a otros cinco brotes en hospitales del área de Nueva York. Este genotipo se relacionó estrechamente con el genotipo Beijing (Beijing W) (108).

En América Latina, a pesar del bajo reporte de genotipo Beijing, éste ha sido detectado en forma significativa en cepas peruanas, tanto susceptibles como resistentes, lo cual podría explicarse por la migración asiática (103,104).

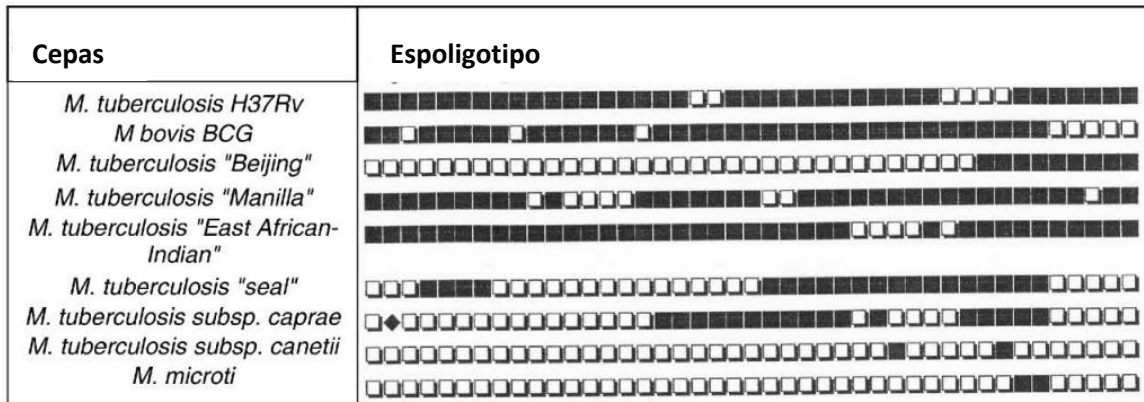
### 1.8.1 Espoligotipos

La técnica de espoligotipificación, 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. Este procedimiento es ventajoso por cuanto permite rastrear y comparar rápidamente el genotipo con los existentes en la base de datos internacional SpolDB3 (109).

Los espaciadores son amplificados juntos e hibridizados contra 43 oligonucleótidos específicos fijados a un soporte de membrana. Los patrones revelan los espaciadores presentes en cada cepa. Esto permite discriminar entre cepas diferentes e identificar cepas iguales; de esta manera se categorizan las cepas en *clusters* (grupo de dos o más aislados con el mismo patrón) y cepas únicas que no tienen un patrón compartido (existente y no descritos); además, se analizan contrastando con la base de datos disponible para verificar si el patrón ha sido reportado anteriormente. De esta manera, los espoligotipos sirven como herramientas de apoyo en estudios sobre la dinámica de transmisión poblacional en correlación con variables clínico-epidemiológicas (110). La presencia de secuencias espaciadoras es diferente en cada cepa y es visualizado por medio de una banda en un sitio fijo de la membrana de hibridación (111).

En la figura 14 se observan los resultados binarios de distintos miembros del CMT donde se observa la ausencia o presencia de las secuencias espaciadoras. Por ejemplo, en el caso de *M. bovis* BCG se observa una ausencia característica de

las secuencias espaciadoras de la 39 a la 43 (representado por los cuadros en blanco).

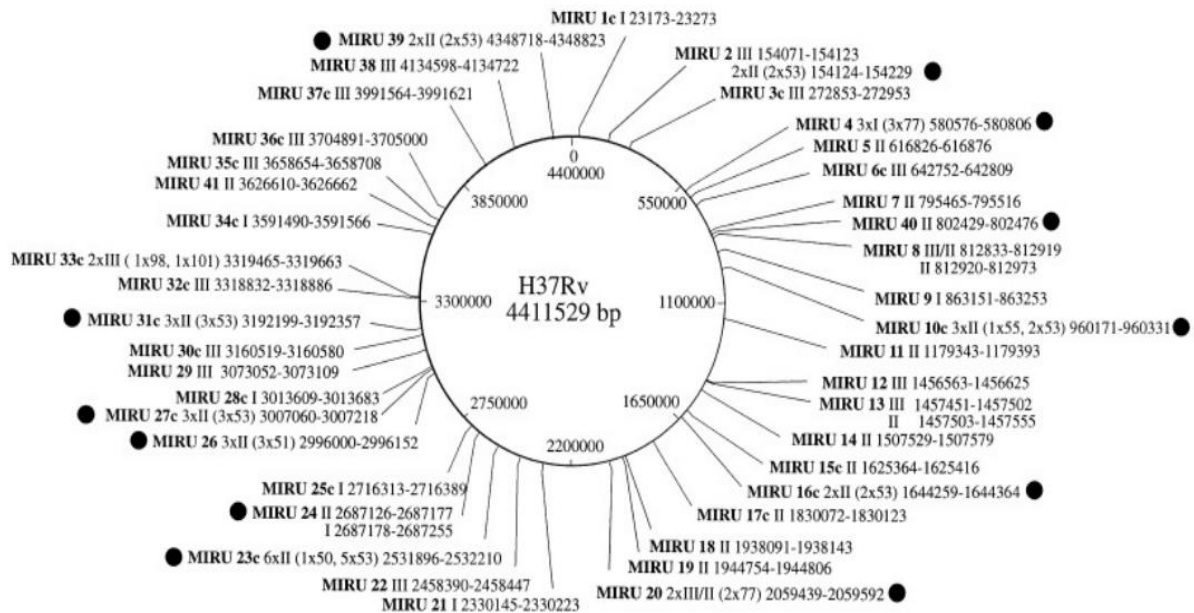


**Figura 14.** Espoligotipos de diferentes cepas del complejo *M. tuberculosis* donde se muestran los patrones específicos de distintas subespecies de este complejo (112).

### 1.8.2 MIRUs-VNTR Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas- Número Variable de Repeticiones en Tándem.

Son elementos entre 40 y 100 pb de DNA que a menudo se encuentra como repeticiones en tándem y dispersas a lo largo del genoma del complejo de *M. tuberculosis*. Se han identificado 41 secuencias repetitivas de este tipo, sin embargo 12 de estas secuencias o loci son lo suficientemente polimórficos en cuanto a su número de copias en los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (figura 14) (113). El método se basa en la detección del número de veces que se

repite de forma adyacente estas secuencias dentro del genoma de *M. tuberculosis* a través de la amplificación de las secuencias por la técnica molecular de PCR.



**Figura 15.** Número de locus MIRUs identificados en el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* con su nomenclatura (113).

Es una técnica fácil de realizar, muy rápida, pues no requiere la purificación de DNA y puede ser llevada a cabo directamente sobre los cultivos, los resultados pueden ser observados en un gel de electroforesis con una resolución de 50 pb o por medio de análisis automatizados más sofisticados, y puede ser representado en formato digital facilitando su interpretación y comparabilidad, haciendo que sea



aplicado directamente sobre estudios poblacionales permitiendo caracterizar rápidamente los brotes.

Los MIRUs son secuencias análogas a los minisatélites variables en humanos los cuales confieren variabilidad a las especies, estas regiones son útiles y poderosos marcadores a nivel epidemiológico y pueden ser utilizados para la realización de estudios de genética de poblaciones de este patógeno, ya que los patrones MIRUs son estables por largos periodos de tiempo lo cual permite establecer asociaciones de transmisión reciente, reactivaciones endógenas e infecciones crónicas (113).

## **II. Justificación**

El aumento creciente y mayor diseminación de cepas de *M. tuberculosis* MFR es un motivo de preocupación muy seria por sus repercusiones en la salud individual de los pacientes aquejados y en la eficiencia terminal de los programas de salud pública encaminados al control de la TB.

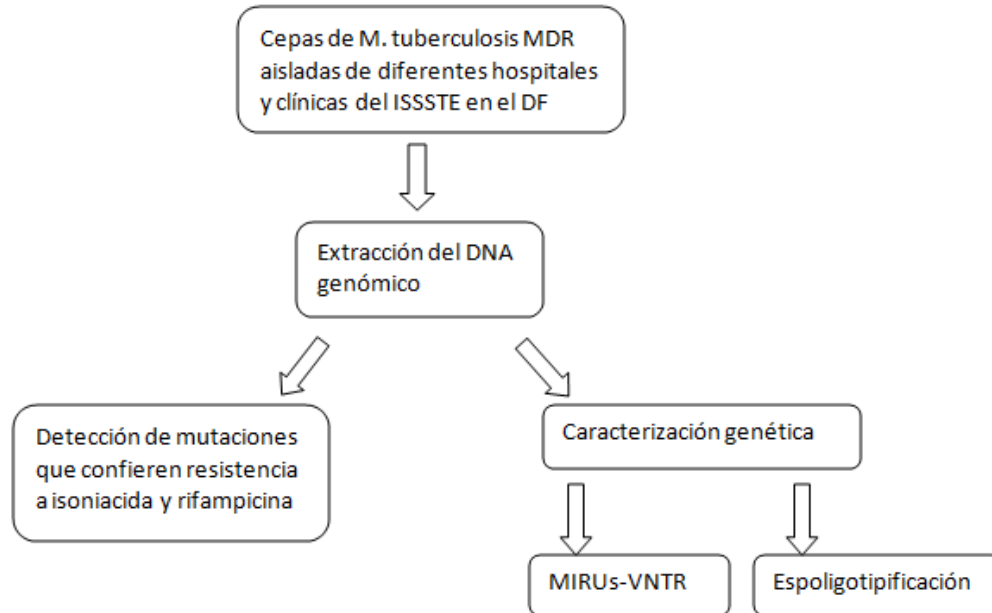
El análisis molecular (MIRU-VNTR y espoligotipos) y la detección molecular de mutaciones de las cepas de *M. tuberculosis* MFR identificadas resultará de enorme importancia porque permitirá conocer los genotipos circulantes y las mutaciones más frecuentes en este tipo de cepas. Con esta información, se proveerá de datos reelevantes para mejorar la información sobre la epidemiología molecular de *M. tuberculosis* en México.

## **III. Objetivos**

Realizar un protocolo de investigación para caracterizar a nivel molecular las mutaciones que confieren resistencia a isoniacida y la rifampicina, así como conocer el genotipo de diferentes cepas de *M. tuberculosis* MFR aisladas de pacientes de clínicas y hospitales del ISSSTE en el Distrito Federal mediante espoligotipificación y MIRUs-VNTR.

## IV Material y Métodos

### 4.1 Esquema general de trabajo



El presente estudio involucrará a las cepas de *M. tuberculosis* MDR aisladas en diferentes clínicas y hospitales del ISSSTE en el Distrito Federal durante 2014-2015

## 4.2 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico de *M. tuberculosis*, se realiza centrifugando 5 ml de cultivo a 4500 g por 15 minutos. La pastilla se resuspende en 400µl de TE (1X), se transfiere a un microtubo y se calienta a ebullición por 10 minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionan 50 µl de lizosima (100 mg/ml, resuspendida en agua), se agita en vórtex por 30 segundos y se incuba a 37°C toda la noche. Al día siguiente se adicionan 70 µl de una mezcla de SDS al 10% y 6 µl de proteinasa K (10mg /ml, resuspendida en agua). Se agita en vórtex y se incuba a 65°C 10 min; se adicionan 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de solución de CTAB/NaCl (precalentada a 65°C). Se homogeniza en vórtex hasta que el líquido se torna lechoso y se incuba a 65°C 10 min. Apartir de aquí se conserva la cadena fría.

Se añaden 750 µl de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1). Se agita en vórtex 10 segundos y se centrifuga a temperatura ambiente a 8000 x g durante 10 min.

El sobrenadante se transfiere a un tubo limpio sin tomar la interfase; posteriormente se adicionan 0.6 volúmenes de isopropanol y se colocan durante 30 min a -20°C. La muestra se centrifuga a temperatura ambiente a 8100 x g por 15 minutos y el sobrenadante se desecha. La pastilla se resuspende en 500 µl de etanol al 70% frío, se agita suavemente y se centrifuga nuevamente a 8100 x g por 10 min; el sobrenadante se desecha. Se añaden 500µl de alcohol absoluto y se centrifuga nuevamente a 8100 x g por 10 min.

Finalmente la pastilla se seca a temperatura ambiente por 10 min y se resuspende en 20  $\mu$ l de amortiguador TE 1X (TRIS 10Mm, EDTA 1 mM).

La calidad de DNA obtenido se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etido (0.83  $\mu$ g/ml). Para ello, se colocan en cada pozo 5  $\mu$ l de DNA y 1  $\mu$ l de colorante de corrimiento (glicerol 20%, EDTA 100Mm, Tris 10 Mm, azul de bromofenol al 0.25%) utilizando como marcador de peso molecular DNA de 100pb y TBE 1x (Tris 1 Mm, acido bórico 10Mm, EDTA 10Mm) como regulador de corrimiento a 96 V durante 1 hora. El DNA se visualiza en un transiluminador de luz UV a una longitud de onda de 302 nm, digitalizando la imagen obtenida. Por último, el DNA se almacena a -20°C hasta su uso.

#### **4.3 Detección molecular de resistencia a isoniacida**

Para detectar mutaciones que confieren resistencia a isoniacida, se realiza una PCR múltiple descrita por Herrera-León y colaboradores en el 2005. Por este método se determinan las mutaciones más frecuentes presentes tanto en katG como en la región Promotora del operón mabA-inhA. Es decir, si existe la mutación (Ser315Thr) en katG se amplifica un fragmento de 296 pb, mientras que si existe la mutación en la región promotora del operón mabA-inhA (Cys-15Thr) se amplifica un fragmento de 146 pb. En ausencia de la mutación en cualquiera de los genes, no se obtiene producto de amplificación. La reacción utiliza un tercer par de iniciadores, los cuales amplifican una banda de 1020 pb que corresponde al gen que codifica para la girasa  $\beta$  de *M. tuberculosis*. Este producto de

amplificación se emplea como testigo de reacción, lo que significa que la ausencia de este producto invalida el análisis de la PCR. Las secuencias de estos iniciadores se encuentran en la tabla 4.

Gen blanco	Sentido (5'→3')	Contrasentido (5'→3')	Tamaño del fragmento (pb)
<b>PCR-Múltiple</b>			
<i>gyrB</i> (gen control)	MTUBf TCGGACGCGTATGCGATATC	MTUBr ACATACAGTTCGGACTTGCG	1020
<i>katG</i>	<i>KatG</i> GCAGATGGGGCTGATCTACG	R315 mut TCCATACGACCTCGATGCCAG	296
<i>mabA-inhA</i>	MabAF CGAAGTGTGCTGAGTCACACCG	<i>inhA</i> Rmut AGTCACCCCGACAACCTATTA	146

**Tabla 4.** Secuencias de los iniciadores utilizados para detectar resistencia a isoniacida (86).

Para la reacción de amplificación se utiliza el estuche comercial “PCR PuRe Taq Ready-To-Go” (GE Healthcare, Reino Unido); cada perla contiene para un volumen final de 25 µL: Tris HCl 10mM, pH9; MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM; KCl 50 mM; dNTP's 200 µM y PuReTaq DNA polimerasa 2.5 U. Se emplea una concentración de 20 µM para el iniciador KatG0F y 40 µM para el resto de los iniciadores. Se utiliza una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 68°C por 1 min y extensión a 72°C por 45 s, seguida de una extensión final a 72°C por 10 min.

Una vez concluida la PCR, los fragmentos amplificados se separaran por electroforesis en gel de agarosa al 2% durante dos horas a 100 V, para posteriormente teñir el gel con bromuro de etidio. Los productos de amplificación se visualizan en un transiluminador UV digitalizando la imagen obtenida.

Adicionalmente se amplifica una región de 620 pb del gen *katG*; para esta PCR se utilizaran los iniciadores *katG904* y *katG1523* reportados por Nachamkin y colaboradores (114).

Para la detección de mutaciones en los codones 315 y 463 se utiliza la endonucleasa de restricción *MspI* (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania). Esta enzima genera un patrón de bandas diferencial entre aislados que contengan o no mutaciones para los codones 315 y 463. Si existe mutación en el codón 315, el patrón de bandas es de 228, 137 y 65 pb. Si existe mutación en el codón 463 el patrón de bandas es de 228, 202 y 153 pb. Por último, si no existe mutación en ese fragmento para los dos codones, el patrón de bandas es de 228, 153, 137 y 65 pb. Para la reacción de amplificación se utiliza el estuche comercial "PCR PuRe Taq Ready-To-Go" con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 60°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s, seguida de una extensión final a 72°C por 10 min. Las digestiones se realizan de acuerdo a las condiciones descritas en los insertos del fabricante y se analizan por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% a 100V y se tiñen con bromuro de etidio para visualizarlos en el fotodocumentador.

#### 4.4 Detección molecular de resistencia a rifampicina.

Para la detección de las mutaciones que confieren resistencia a rifampicina se utiliza el método reportado por Fan y colaboradores (115) denominado ARMS, “Amplification Refractory Mutation System”, que se refiere a un método de PCR alelo específico que básicamente consiste en el uso de tres iniciadores, un par de ellos que amplifica una banda de 537 pb como control interno, que incluye la región “core” de 81pb y un tercer iniciador que no hibrida si existe mutación para cada uno de los codones: 516, 526 y 531; estas reacciones se realizan por separado para cada cepa. Las secuencias de estos iniciadores se encuentran en la tabla 5.

	Tamaño de la banda (pb)	Sentido (5'→3')	Contrasentido (5'→3')
<b>Control</b>	537	CGAATATCTGGTCCGCTTGC	GTCGACCACCTTGCGGTACG
<b>Iniciador codón 516</b>	261	CAGCTGAGCCAATTCACGGA	GTCGACCACCTTGCGGTACG
<b>Iniciador codón 526</b>	230	CGCTGTCGGGGTGGTCCC	GTCGACCACCTTGCGGTACG
<b>Iniciador codón 531</b>	216	ACCCACAAGCGCCGACAGTC	GTCGACCACCTTGCGGTACG

**Tabla 5.** Secuencia de los iniciadores utilizados para detectar resistencia a rifampicina (115)

Para la reacción de amplificación se utilizaran las perlas del estuche de “PCR PuRe Taq Ready-To-Go” (GE Healthcare). Se empleó una concentración de 20 µM de cada iniciador y se utiliza una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 68°C por 30 s y extensión a 72°C por 45 s, seguida de una extensión final de 10 min a



72°C. Los productos de PCR se visualizan en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

#### 4.5 Caracterización de aislados de *M. tuberculosis* por la amplificación de los MIRU-VNTR.

La caracterización por MIRU-VNTR se realiza conforme a la técnica reportada por Supply y colaboradores (116); esta técnica utiliza 12 pares de iniciadores que amplifican cada uno de los 12 loci génicos MIRU de mayor variabilidad; sus secuencias se señalan en la tabla 6.

Iniciadores	Sentido (secuencia 5'→3)	Contrasentido (secuencia 5'→3)
MIRU 2	2F-TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT	2R- TACTCGGACGCCGGCTCAAAT
MIRU 4	4F- GCGCGAGAGCCCGAACTGC	4R-GCGCAGCAGAAACGTCAGC
MIRU 10	10F- GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	10R- GCCACCTTCCTGATCAGCTACCT
MIRU 16	16F- TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA	16R- CCCGTGTCGAGCCCTGGTAC
MIRU 20	20F- TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG	20R- GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
MIRU 23	23F- CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG	23R- AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTGTGTC
MIRU 24	24F- CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT	24R-GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
MIRU 26	26F- TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	26R- CATAGGCGACCAGGCGAATAG
MIRU 27	27F- TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA	27R- GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU 31	31F- ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	31R- GTGCCGACGTGGTCTTGAT
MIRU 39	39F- CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC	39R- CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU 40	40F- GGGTTGCTGGATGACAACTGT	40R- GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA

**Tabla 6.** Secuencia de iniciadores para amplificar cada MIRU-VNTR de *M. tuberculosis* (116)

Cada reacción se lleva a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L utilizando diferentes concentraciones de magnesio de acuerdo al locus MIRU del que se trate, según se observa en la tabla 7. De esta manera se llevarán a cabo 12 reacciones de PCR para cada cepa con una desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguida de 40 ciclos: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento de 59°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min, seguida de una extensión final a 72°C por 10 min.

<b>Reactivos (para una reacción)</b>	<b>Mezcla tipo 1</b>	<b>Mezcla tipo 2</b>	<b>Mezcla tipo 3</b>
	Para los MIRU: 2, 4, 10, 16, 31 y 40 <b>(2mM MgCl<sub>2</sub>)</b>	Para los MIRU: 23 y 39 <b>(2.5 Mm MgCl<sub>2</sub>)</b>	Para los MIRU: 20, 24, 26 y 27. <b>(1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)</b>
H <sub>2</sub> O	21.8 $\mu$ L	19.8 $\mu$ L	26.8 $\mu$ L
Amortiguador 10 X	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Solución Q 5X	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 $\mu$ L	5 $\mu$ L	----
dNTP (5mM/cada uno)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Iniciador	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Iniciador reverso (20 mM)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Enzima <i>Hot Start</i> polimerasa (5 U/mL)	0.2 $\mu$ L	0.2 $\mu$ L	0.2 $\mu$ L
DNA	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L

**Tabla. 7.** Preparación de las mezclas de reacción para la PCR de cada MIRU-VNTR de *M. tuberculosis* (116).

Una vez concluida la PCR, los fragmentos amplificados serán separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 1.5horas a 100 V utilizando los

marcadores de peso molecular 1 kb ladder o Gene Ruler 100 pb ladder plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), para posteriormente teñir el gel con bromuro de etidio a una concentración de 0.7 µg/mL. Posteriormente el gel se visualiza en un transiluminador de luz UV a una longitud de onda de 302 nm, digitalizando la imagen obtenida. Adicionalmente, los fragmentos obtenidos se separan mediante el uso de bioanalizador marca Aglient Technologies utilizando el chip “DNA 1000” y por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Con las imágenes obtenidas tanto de electroforesis en gel como en el bioanalizador, se calcula 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 los MIRUs, tabla 8.

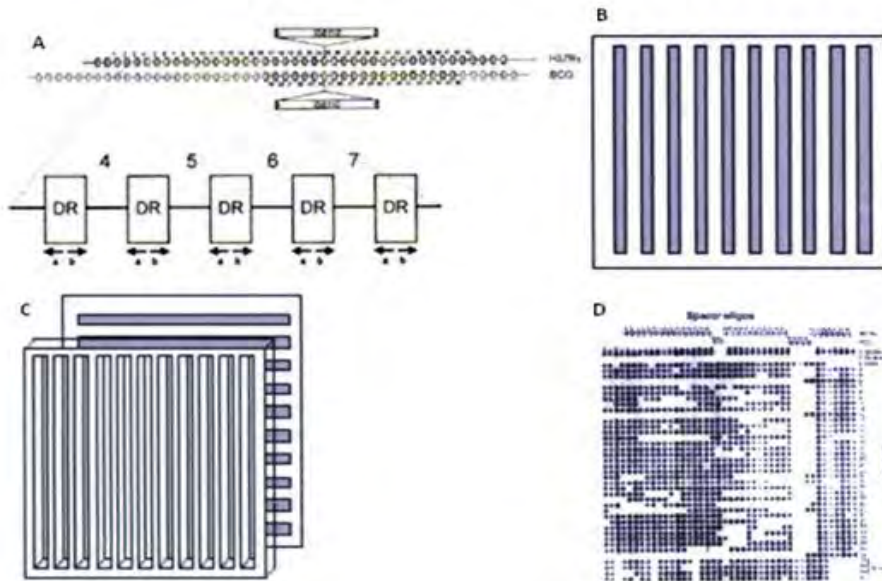
Alelo	MIRU 02	MIRU **04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570

**Tabla 8.** Asignación del código numérico de acuerdo al número de copias encontradas en cada locus de *M. tuberculosis* (116).

#### **4.6 Caracterización de aislados de *M. tuberculosis* mediante espoligotipificación.**

Las pruebas de espoligotipificación se realiza utilizando el sistema comercial de Isogen Bioscience BV (Maarssen, Países Bajos) de la siguiente manera: se realiza la amplificación de los productos utilizando los iniciadores DRa (5´CCGAGA GGG GAC GGA AAA3´) Y DRb (5´GGT TTT GGG TCT GAC GAC3´) que amplifican las regiones espaciadoras dentro de la región DR; el iniciador DRb está marcado con biotina. Las condiciones para la amplificación son las siguientes: un ciclo inicial a 96°C/3min, seguido de 30 ciclos, a 96°C/1min, 55/1min; 72°C/5 min y un ciclo final de 72/0.05. Se utiliza un volumen de la mezcla de reacción de 50 µl conteniendo MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.4 M de cada iniciador, 200 M de la mezcla de dNTPs, 2.0 U de Taq polimerasa (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) y 10 µl de DNA. Posteriormente, a cada tubo con el producto de PCR se le añade 150 µl de SSPE (2X) (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 M, NaCl 3.6 M y EDTA 20 mM)/SDS 0.1%, después se neutraliza a 94°C durante 10 min. Inmediatamente se coloca en hielo. En cada canal de un miniblatter (ver figura 16) se colocan 150 µl del producto diluido y desnaturalizado de PCR, sin permitir que se formaran burbujas. En los canales que no contenían muestra se coloca SSPE (2X)/SDS 0.1%. Por otro lado, la membrana conteniendo los oligonucleótidos derivados de los espaciadores conocidos en los DR, se lava con 250 ml de SSPE (2X)/SDS 0.1% a 55°C durante 5 min, con agitación leve y posteriormente se coloca en forma perpendicular a los canales del miniblatter. Finalmente, el miniblatter se coloca en un horno a 55°C durante 60 min para llevar a cabo la hibridación.

El producto residual de la PCR se remueve por aspiración y la membrana se lava dos veces con 250 mL de SSPE (2X)/SDS 0.5% a 55°C durante 10 min. Posteriormente, la membrana se deja enfriar entre 5-10 min y se coloca en una botella de hibridación, se añade una mezcla de 7.5 mL de estreptavidina-peroxidasa conjugada del "ECL Amersham kit" en 30 mL de SSPE (2X)/SDS 0.5% y se incuba a 42°C en un horno de hibridación durante 40-60 min. A continuación, la membrana se lava dos veces con 250 mL de SSPE (2X)/SDS 0.5% a 42°C en agitación suave durante 10 min y dos veces con 250 mL de SSPE (2X) a temperatura ambiente con agitación suave, durante 5 min. Para la detección de señal se colocan en un recipiente 10 mL de reactivo de detección AMR y 10 mL de reactivo de detección BMR ("ECL, Amersham kit"), se mezclan durante 2 min y se ponen en contacto con la membrana durante 2 min. La membrana se seca en papel filtro, se cubre con kleen-pack y se coloca en un casete, se cubre con una placa fotográfica y se expone durante 10 min, finalmente se lleva a cabo el revelado de la placa. Debido a que la membrana se utiliza varias veces, la regeneración de la misma se lleva a cabo de la siguiente forma: se lava con 250 mL de EDTA 20 mM a temperatura ambiente durante 15 min con agitación leve y se almacena a 4°C con una pequeña cantidad de EDTA 20 mM en una bolsa de plástico sellada. El programa de computación que se utilizó como software para el análisis de los datos de la espoligotipificación y la agrupación de las cepas fue: VNTRplus.



**Figura 16. Proceso de espigotipificación.** A) Sitio donde se alinean los iniciadores DRa y DRb. B) Membrana conteniendo los oligonucleótidos derivados de los 43 espaciadores conocidos de los DR. C) Colocación de la membrana en forma perpendicular al minibloter conteniendo los productos de PCR. D) Autoradiografía revelada.

## **V Resultados**

### **Fármaco resistencia México (2001-2013)**

En el periodo de 2001-2013 las tasas de cepas FR y MFR en México fueron 37,5 % y 20,6 %, respectivamente. Los estados con las tasas más altas de FR fueron Chiapas (72.2 %) (117), el Distrito Federal, el Estado de México (68,3 %) (118), y Nuevo León col (53.5%) (119).

Las tasas más altas de MFR se presentaron en Chiapas (66.7 %) (120) y Nuevo León con el 53.5% (119). Por otra parte, las tasas más bajas de FR se reportaron en Baja California, Oaxaca y Sinaloa (21 %) (120), Tamaulipas (19.08%) (121) y San Luis Potosí con el 9.7 % (122).

Los estados que presentan niveles más bajos de MFR en el país son Coahuila con un 4.5% (123), San Luis Potosí con un 4.2% (122) y Tamaulipas con un 2.1%(124).

Las mutaciones más frecuentes para resistencia a rifampicina de encuentran en el gen *rpoβ* 531 (53.1%), *rpoβ* 526 (36.3%) y *rpoβ* 516 (19.5%).

En las cepas que presentan resistencia a isoniacida se identificaron mutaciones en el gen *katG* en un 50.6% y en el gen *inhA* con una frecuencia de 14.8%.

Gene <sup>a</sup>	Codon or Nucleotide	Mutation <sup>b</sup>	State <sup>c</sup> (Mutation rate in local sample, %)	Total mutation rate (%) <sup>d</sup>	Total codon mutation rate (%)
<b>RIF Resistance</b>					
<i>rpoB</i>	469	GAG→TCG <sup>2</sup>	DF (50 <sup>*</sup> )	- <sup>*</sup>	50.0
	509	AGC→CAG <sup>1</sup>	VER (6.7)	6.7	6.7
	510	CAG→AAG <sup>1</sup>	VER (6.7)	6.7	6.7
	511	CTG→CCG	DUR (19), DF (18.8)	18.9	18.9
	513	CAA→AAA	DF (5.7)	5.7	8.6
		CAA→CCA	DF (2.9)	2.9	
	516	GAC→GTC	TAM (25), DF (14.3), VER (6.7), NL (7.1, 5.4, 1.8)	10.1	19.5
		GAC→TAC	VER (6.7)	6.7	
		GAC→GAG	NL (2.7)	2.7	
	522	TCG→TTG	NL (8.1), DF (2.9)	5.5	12.6
		TCG→CAG	NL (7.1)	7.1	
	524	TTG→TCG <sup>1</sup>	VER (6.7)	6.7	6.7
	526	CAC→TAC	NL (22.8, 21.4, 13.5), SON (15.4), DF (14.3)	17.5	36.3
		CAC→GAC	VER (13.4), DF (11.4), NL (9.1, 8.1, 7.0), DUR (4.8)	9.0	
		CAC→CGC	TAM (50 <sup>*</sup> ), NL (3.0)	3.0 <sup>*</sup>	
		CAC→TGC	VER (6.7), NL (3.0, 2.7)	4.1	
		CAC→AAC	NL (2.7)	2.7	
	528	CGC→CCT <sup>1</sup>	VER (6.7)	6.7	6.7
	530	CTG→GCT <sup>2</sup>	DF/PUE/VER (1.6)	1.6	1.6
	531	TCG→TTG	NL (54.4, 48.5, 40.5, 28.6), VER (33.3) DF (50 <sup>*</sup> , 28.6, 12.5), DF/PUE/	32.7 <sup>*</sup>	53.1
		TCG→TGG	VER (35.9), SON (30.8), DUR (14.3)	8.7	
		TCG→CCG <sup>2</sup>	VER (13.4), DF/PUE/VER (12.5), NL (6.1), DF (2.9)	2.9	
		TCG→GCG <sup>2</sup>	DF (2.9)	2.9	
		TCG→GCG <sup>2</sup>	DF (5.8)	5.8	
		TCG→TTC <sup>2</sup>	DF/PUE/VER (3.1), DF (2.9)	3.0	
	533	CTG→CCC	DF/PUE/VER (1.6)	1.6	6.1
		CTG→GCG	DF/PUE/VER (1.6)	1.6	
		CTG→CCG	DF (2.9), NL (2.7, 3.0)	2.9	
	561	ATC→GTC <sup>1</sup>	NL (2.7)	2.7	2.7
	572	ATC→TTC	DF (2.9), DF/PUE/VER (1.6)	2.3	2.3
<b>INH Resistance</b>					
<i>katG</i>	29-353	Deletion <sup>1</sup>	NL (2.7)	2.7	2.7
	249	CGC→TGC <sup>1</sup>	NL (5.4)	5.4	5.4
	271	ACC→S <sup>3</sup>	NL (7.1)	7.1	14.2
		ACC→P <sup>3</sup>	NL (7.1)	7.1	
	275	ACC→TCC <sup>1</sup>	NL (2.7)	2.7	2.7
	307	GGA→GAA <sup>1</sup>	NL (2.7)	2.7	2.7
	311	GAC→GAG <sup>1</sup>	VER (5.9)	5.9	5.9
	315	AGC→ACC	DF (100 <sup>*</sup> ), NL (64.9, 53.7, 35.7), VER (52.9), SON (42.9)	47.9 <sup>*</sup>	50.6
		AGC→ACA	NL (2.7)	2.7	
	318	GAG→GTA <sup>1</sup>	VER (5.9)	5.9	5.9
	328	TGG→TGC	VER (5.9)	5.9	5.9
	331	AGT→TGT <sup>1</sup>	VER (5.9)	5.9	5.9
	727	GCC→GAC <sup>1</sup>	NL (2.7)	2.7	2.7
<i>inhA</i>	-15	C→T	SON (28.6), NL (8.1), TAM (7.7)	14.8	14.8
<i>oxyR-ahpC</i>	-39	C→T	NL (3.1)	3.1	3.1
	-32	G→A	NL (9.4)	9.4	9.4
	-17; -12	+A; +CCA <sup>2</sup>	SON (8.3)	8.3	8.3
	-10	C→T	NL (3.1)	3.1	3.1

**Tabla 9** Mutaciones asociadas con resistencia a isoniacida y rifampicina en cepas de *M. tuberculosis* en diferentes estados de México desde 2001 a 2013



En México diversos estudios han utilizado la técnica de espigotificación para realizar el análisis de diversidad genética. En la tabla 10 se muestran los diferentes espigotipos obtenidos para diferentes cepas aisladas de distintos estados de la República.

SIT <sup>a</sup>	Spoligotype description	Octal number	Clade <sup>b</sup>
1	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	0000000000003771	Beijing
2	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	000000004020771	H2
3	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	000000007720771	H3
4	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	000000007760771	U
8	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	40003777413771	EA15
17	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	677737607760771	LAM2
19	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	677777477413771	EA12 Manila
20	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	677777607760771	LAM1
33	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	776177607760771	LAM3
34	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	776377777760771	S
37	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	777737777760771	T3
42	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	777777607760771	LAM9
46	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	77777770000000	U
47	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	77777774020771	H1
49	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	777777777720731	H3
50	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	77777777720771	H3
51	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	77777777760700	T1
52	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	77777777760731	T2
53	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	7777777760771	T1
54	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	7777777763771	Manu2
60	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	777777607760731	LAM4
64	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	777777607560771	LAM6
70	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	70007677760671	X3
73	■□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□	77773777760731	T3-T2

**Tabla 10.** Genotipo de los aislados de *M. tuberculosis* de diferentes estados de México

Las familias más predominantes hasta la fecha incluyen Harlem. H, LAM, X y T que se detectaron casi en todos los estados analizados. Los sublinajes asociados incluyen T1, LAM9, H3 y H1. Específicamente, los tipos compartidos más predominantes son SIT53 (T1, 3.9%), SIT119 (X1, 6.9%), SIT19 (EAI2-Manila, 6.3%) y SIT42 (LAM9, 3.0%).

El genotipo Beijing ha sido reportado en Puebla (125), Jalisco (126), Baja California, Sinaloa, Veracruz (127) y San Luis Potosí (122).

## VI Discusión

La TB continúa siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial. La reciente selección de cepas de *M. tuberculosis* MFR lo ha agravado aún más, debido a que la diseminación de estas cepas implicaría un tratamiento más costoso y menos efectivo que el ya existente contra cepas de *M. tuberculosis* sensibles a todos los medicamentos de primera línea.

Dentro de los programas Nacionales de Control de la Tuberculosis es de vital importancia conocer el perfil de resistencia y el tipo de cepa con el fin de poder identificar los principales focos de infección, para desarrollar mejores estrategias de control y manejo de los pacientes MFR con el objetivo de romper la cadena de transmisión de la enfermedad y de esta forma abatir el índice de contagio. A nivel epidemiológico al tener conocimiento de los diferentes subtipos de micobacterias que están presentes en un país les permite a los programas Nacionales de Control de la TB desarrollar planes de acción estratégicos con el fin de proteger a la población susceptible de adquirir la enfermedad.

Desafortunadamente una limitación para México es que existen pocos estudios relacionados con la epidemiología molecular de la TB.

La finalidad del presente trabajo fue realizar una búsqueda en artículos científicos acerca de los estudios realizados para la detección molecular de la resistencia para isoniacida y rifampicina y la genotipificación de aislados de *M. tuberculosis* MFR, asimismo la elaboración de un protocolo de investigación para poder realizar a futuro, el análisis molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* MFR

aisladas de hospitales y clínicas del ISSSTE en el Distrito Federal, ya que hasta el momento no se cuenta con ningún estudio de caracterización molecular en esta institución de salud.

Las técnicas moleculares utilizadas para la genotipificación fueron la determinación de 12 MIRU-VNTR y la determinación de espoligotipos. Ambas técnicas proveen en conjunto una buena discriminación entre aislados de *M. tuberculosis* y determinan de manera confiable el genotipo de cada cepa (128).

La epidemiología molecular considera que aislamientos con genotipos idénticos conforman agrupamientos genéticos y los pacientes involucrados son fuertes candidatos a pertenecer a una misma cadena de transmisión, lo que implicaría una infección reciente. Por otra parte, los aislamientos con genotipos únicos están más relacionados con reactivaciones de infecciones latentes (129). Por tanto, el agrupamiento de aislamientos indistinguibles por tipificación molecular, se ha usado para inferir rangos de transmisión reciente de la enfermedad en una población definida (130).

Se ha reportado la presencia de cepas de *M. tuberculosis* Beijing en varios estados de México, esta cepa tiene una mayor capacidad para extenderse y causar enfermedad; en consecuencia, se consideran cepas hipervirulentas y aunque estas cepas son altamente prevalentes de Asia, también se han detectado en todo el mundo .

Estos datos de genotipificación pueden indicar una tendencia de distribución de ciertos genotipos frecuentes en México como T1, Haarlem y LAM

independientemente del diseño del estudio o del tamaño de muestra. Esto puede verificarse cuando se comparan determinados espoligotipos con aquellos reportados en estudios multicéntricos a nivel internacional donde se analiza un gran número de aislados de *M. tuberculosis*, como fue el caso del estudio de Brudey y colaboradores (2006). Adicionalmente, en dicho estudio, Brudey y colaboradores reportaron una distribución de los linajes del complejo *M. tuberculosis* en varias regiones del mundo. En el caso del continente americano los linajes más comunes son LAM, T, Haarlem y X. El linaje Beijing es más común en América del Norte que en Centroamérica y es poco común en América del Sur.

La familia T es la más común, esta familia se encuentra ampliamente distribuida en todos los continentes, sin embargo las frecuencias varían de una región geográfica a otra. En Pakista, Tanveer y col (2008) encontraron un 2% de esta familia en 926 aislados de *M.tuberculosis*, en contraste con el linaje CAS (Cepas centroasiáticas) que alcanza un 61% de frecuencia. En Venezuela, Aristimuño y col en el 2006 solo identificaron el 10% de sus cepas como la familia T y el más frecuente fue la familia LAM con un 74%. Estos resultados apuntan a una condición particular en la población mexicana donde el linaje T es muy frecuente y puede indicar que es muy particular terreno genético del mestizo mexicano lo que hace que sea más susceptible a adquirir y mantener a este fenotipo, a diferencia de las demás poblaciones estudiadas.

Los códigos obtenidos por MIRU-VNTR mostraron un mayor polimorfismo en los MIRUs 10, 16, 23, 26,31 y 40, obteniendo un número variable de copias para cada uno de ellos entre las distintas cepas. Por otro lado los MIRUs 2, 4, 20, 24, 27 y 39

presentaron un polimorfismo más bajo tal y como lo mostraron los estudios realizados por Supply y col en 2001 y Mazar y col, 2001

En cuando a la resistencia a isoniacida de las cepas MFR se puede comentar que las mutaciones más importantes se presentaron de manera general en el gen *katG*, dentro del cual la mutación presentada con mayor frecuencia fue la sustitución Ser315Thr y Arg463Leu, aunque esta mutación también se puede presentar en aislados de *M. tuberculosis* sensibles a isoniacida, en la mayor parte de los casos las cepas que presentan esta mutación exhiben resistencia fenotípica a isoniacida; esta misma mutación también se ha encontrado en cepas de *M. tuberculosis* Beijing . En un estudio reciente realizado por Zenteno y colaboradores (2009) se ha reportado en cepas aisladas en el sureste de México la mutación 315 como una de las más comunes en aislados MFR (67%).

Con respecto a la detección de mutaciones en el gen *rpoβ* se aplicó un método propuesto por Fan y colaboradores para detectar mutaciones en los codones 516, 526 y 531.

En estudios realizados en México para el análisis de mutaciones en el gen *rpoβ* para aislados de *M. tuberculosis* MFR; López Álvarez y colaboradores en el 2010 reportan una mutación previamente no reportada en el codón 469.

## **VII. Conclusiones**

La mayoría de los reportes sobre resistencia a isoniacida sugieren que las mutaciones katG Ser315Thr, conjuntamente con la mutación del promotor del gen inhA, explican la mayor parte de la resistencia a isoniacida.

En el caso de rifampicina las mutaciones más frecuentes en el gen rpoβ fueron en los codones 531 y 526.

El linaje Beijing se disemina dentro de los estados de Guerrero, Sinaloa y Veracruz

Los genotipos frecuentes en México son T1, Haarlem y LAM

Los MIRUs que muestran mayor polimorfismo son 10, 16, 23, 26,31 y 40. Por otro lado los MIRUs 2, 4, 20, 24, 27 y 39 presentaron un polimorfismo más bajo

## **Perspectivas**

Realizar la caracterización molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* MFR que se han aislado durante 2014-2015 en las diferentes clínicas y hospitales del ISSTE en el Distrito Federal, identificando los genes que confieren resistencia así como conocer el genotipo de las diferentes cepas mediante el análisis de espoligotipo y MIRUs-VNTR .

## VIII Referencias

1. Betzaida Cuevas Córdoba, Drug resistant tuberculosis: molecular mechanisms and diagnostic methods. vol.28. num 09. Noviembre 2010.
2. Mc nerney R, Maeuer M, Abubakar I, Marais B, Mc Hugh td. 2012. Tuberculosis diagnosticas and biomarker: needs, callenges, recent advances and apportunities. J infect dis. 2:5147-58
3. Antituberculosis drug resistance in the word, [Fecha de consulta: 15-Mayo-2015]  
Disponible en: [http://www.who.int/entity/tb/publications/2008/dis\\_report4\\_26feb08.pdf](http://www.who.int/entity/tb/publications/2008/dis_report4_26feb08.pdf)
4. Organización Mundial de la Salud. Informe Mundial sobre la tuberculosis 2012. [Fecha de consulta 13-abril-2015]. Disponible en: <http://bitacoramedica.com/oms-publica-el-informe-mundial-sobre-tuberculosis-2012/>
5. Hilda Ruiz, Vera Alvarado M, Remel M. 2014. Mutaciones asociadas a resistencia a rifamopicina e isoniacida de cepas de Mycobacterium tuberculosis aislados durante los años 2012 y 2013. Revitsa de medicina interna de Guatemala. vol 17.
6. World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO Report 2004. [Fecha de consulta: 08-Febrero-2015]. Disponible en: [www.who/htm/Tb/2004.331](http://www.who/htm/Tb/2004.331)
7. Ortiz Marin D, Ariztizabal Beatriz. Molecular methods in the diagnosis of tuberculosis.2013. Medicina upb 32 (2)



8. Agapito J, Neyra V, Castro J, Accinelli r.2002. Caracterizacion de las mutaciones en el gen rpoB asociadas a la rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. Rev. Peru. Med. Salud Publica. vol 19. num3.
9. Leung et, Ho PL, Yuen KY, Woo WL, Lam th. 2006. Molecular characterization of isoniazid resistance mycobacterium tuberculosis identification of a novel mutation in inhA. antimicrob. agents chemother. 50: 1075-8.
10. Arraiz N, Bermudez V, Urdaneta B. Resistencia a drogas en Mycobacterium tuberculosis. Bases moleculares. AV-FT. Vol 24. Num1.
11. Catañeda L, Sanchez J, Moran MC. 2003. El papel de las tecnicas de la biología molecular en el diagnostic y control de la tuberculosis. Gac. Med. Vol 139. No. 3.
12. Ahmad S, Makeddas E. 2009. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Resp. med. 103: 177-1790
13. Misión de evaluación externa del programa de control de tuberculosis. Secretaria de salud. [Fecha de consulta: 16-enero-2016]. Disponible en: [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/reporte\\_final\\_mexico.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/reporte_final_mexico.pdf)
14. Chatterjee D.1997. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. Opin. Chem. Boil. 1: 579-588

15. Bailey & Scott. 2009. Diagnostico microbiologico. Medica panamericana. Buenos aires. 1160.
16. Tortoli, E., Rindi, L., García, M.J., Chiaradonna, P., Dei, R., Garzelli, C., Kroppenstedt, R.M., Lari, N., Mattei, R., Mariottini, A., Mazzarelli, G., Murcia, M.I., Nanetti, A., Piccoli, P., Scarparo, C. 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the Mycobacterium avium complex, to species rank as Mycobacterium chimaera sp. nov. Int J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1277-1285.
17. Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A. 2005. Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis and Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC). Vet. Res. 36: 411-436.
18. Brosh R, Gordon SV, Marimesse M.2002. Anew evolutionary scenario for the Mycobacterium complex. Proc. Natl. acad. SC.99:3684-3689.
19. Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev. Sci. Tech. 20: 21-54.
20. Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Garnier, T., Brosch, R., Parkhill, J., Barrell, B., Cole, S.T., Hewinson, R.G. 2001. Genomics of Mycobacterium bovis. Tuberculosis (Edinb.) 81: 157-163.
21. Brosch, R., Pym, A.S., Gordon, S.V., Cole, S.T. 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. Trends Microbiol. 9: 452-458.

22. Behr, M.A., Mostowy, S. 2007. Molecular tools for typing and branding the tubercle bacillus. *Curr. Mol. Med.* 7: 309-317.
23. Brennan PJ. 2003. Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. (Edinb)83:91-93
24. Neyrolles O, Hernandez Pando F, Pietri P, Formes L, Tailleux JA. 2006. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PLOS*. 1:43
25. Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E. III, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
26. Camus JC, Pryor MJ, Medigue C, Cole ST. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*.148:2967-2973.
27. Said-Fernández S, Becerrill-Montes P, Molina-Salinas G, Barrios-García H. y Vargas-Villarreal J. 2005. Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogoresistentes. *Enfermedades Emergentes*. 7(1): 13-19
28. Russell D. G. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell*. 2:569-586.

29. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun* 2002;70:1033–1041.
30. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5:987–995
31. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 2002;109:571–577.
32. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* 2002;109:693–697
33. Lopez M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through toll-like receptor-2. *J Immunology* 2003;170:2409–2416.
34. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 2002;109: 699–705
35. Collins HL, Kaufmann SH. The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology* 2001;103:1–9
36. Ferguson JS, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant in innate immunity and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 2000;80:173–184.
37. Schluger NW. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res* 2001;2:157–163

38. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 2001;19:93–129

39. Molecular mechanisms of the immune response in human pulmonary tuberculosis  
María Teresa Herrera Barrios\* Martha Torres Rojas\* Esmeralda Juárez Carvajal\* Eduardo Sada Díaz  
Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. vol.18 no.4 México oct./dic. 2005

40. Modificación de la Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. México. Secretaria de Salud. NOM-006-SSA2-1993. [Fecha de consulta: 18-Marzo-2015], Disponible en: <http://www.sesa-dgo.gob.mx/006SSA23.doc>

41. Balandrano CS, Anzaldo GF, Betancourt M, 1996, Manual de procedimientos de laboratorio. INDRE /SAGAR: 18 Tuberculosis. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Secretaria de Salud

42. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. [Fecha de consulta: 11-Mayo-2016]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

43. Eva Mas, Julio Poza, Jesús Ciriza, Pilar Zaragoza, Rosario Osta y Clementina Rodellar. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). [Fecha de consulta 05-Abril-2016] Disponible en:

[http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/title/fundamento-reaccion-cadena-polimerasa-pcr/id/49295970.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/fundamento-reaccion-cadena-polimerasa-pcr/id/49295970.html)

44. Anderson. M. Perfecting the polymerase chain reaction. Laboratory Equipment Digests. 1:30-31.

45. González, Andrade Fabricio. El Nuevo Código de la Niñez y la Adolescencia y la Prueba Material del ADN, Consejo de la Juriscatura, Hospital Metropolitano; 2004, pág. 36

46. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J Vis Exp. 2012; 62: 3923.

47. Helí Barrón, Mario Monteghirf, Nelson Rivera Molecular, Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in paraffin-embedded pleural biopsies, Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición Alberto Guzmán Barrón. Facultad de Medicina, UNMSM. Lima, Perú. 2 Hospital San Jose, Minsa. Callao, Perú. ISSN 1025 - 5583 Págs. 11-18

48. Luis Asencios<sup>1,a</sup>, Marco Galarza<sup>1,b</sup>, Neyda Quispe<sup>1,c</sup>, Lucy Vásquez<sup>1,c</sup>, Elena Leo<sup>1,c</sup>, Eddy Valencia<sup>1,c</sup>, Juan Ramírez<sup>1,c</sup>, Margoth Acurio<sup>1,c</sup>, Rosario Salazar<sup>1,c</sup>, Alberto Mendoza -Ticona<sup>2,d</sup>, Omar Cáceres, Molecular test Genotype MTBRPLUS, an alternative to rapid detection of multidrug resistance tuberculosis, Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2012;29(1):92-98

49. Hain Lifescience [Internet]. Nehren, Germany: Hain Lifescience GmbH; 2010 [fecha de consulta: 12 julio del 2016]. GenoType® MTBDRplus; Disponible en:

<http://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/genotype-mtbdplus.htm>

50. Sharma S, Madan M, Agrawal C, Asthana AK. Genotype MTBDR plus assay for molecular detection of rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis. Indian J Pathol Microbiol 2014;57:423-6

51 Coordinación de Diagnóstico molecular. Laboratorio de Diagnóstico y Tipificación molecular. Secretaria de Salud. [Fecha de consulta: 16-Junio-2016]. Disponible en [:http://www.indre.salud.gob.mx/interior/coordinacion\\_diagnostico\\_molecular.html](http://www.indre.salud.gob.mx/interior/coordinacion_diagnostico_molecular.html)

52. Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). Mensaje Bioquímico, Vol XXVII. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

53. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon H, Drenkow J, Smittipat N, et al. Comparing genomes within the species Mycobacterium tuberculosis. Genome Res 2001;11:547-54.

54. Panduro, Arturo, Biología molecular en la clínica, 2da. Edición, Mc Graw Hill, México, 2012, pág. 54, 55

55. Arroyo, María Isabel, Morales Patricia, Sosa Paula, Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de Plasmodium: nueva técnica diagnóstica, Facultad Medicina. Medellín (Colombia), 2008.

56. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:E63.

57. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. [Fecha de consulta: 15-Enero-2016] disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m006ssa23.html>

58. Tratamiento de la tuberculosis, Programa Mundial contra la Tuberculosis Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza. [Fecha de consulta: 26-Mayo-2015] Disponible en: [www.WHO/TB/97.229.whqlibdoc.who.int/hq-1997/WHO TB 97.229.pdf](http://www.WHO/TB/97.229.whqlibdoc.who.int/hq-1997/WHO_TB_97.229.pdf)

59. Iván Renato Zúñiga Carrasco\* Janett Caro Lozano. "Pacientes con tuberculosis drogorresistente: un reto nacional en los tres niveles de salud *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* 2013 Vol. XXVII Núm. 105

60. Martínez, GJ. Caracterización microbiológica y epidemiológica molecular de cepas farmacorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en la República Mexicana. Tesis 2010. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencia Biológicas

61. Guía para la Atención de Personas con Tuberculosis Resistente a Fármacos, Secretaría de Salud, [fecha de consulta: 15-Febrero-2016] Disponible en: [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/guia\\_tb\\_mfr\\_ok.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/guia_tb_mfr_ok.pdf)



62. Tounggousova OS, Caugant DA, Sandven P, Mariandysher AO, 2002, Drug resistance of Mycobacterium tuberculosis strains isolated from patient with pulmonary tuberculosis in Archangels, Russia. Int J Tuberc Lung Dis. 6: 406-414
63. Zager EM, McNerney R.2008. Multidrug-resistant tuberculosis. BMC. Infect. Dis. 8: 1471-1481
64. Farmacorresistencia, Organización Mundial de la Salud, [fecha de consulta 20-Diciembre-2015] Disponible en: [http://www.who.int/topics/drug\\_resistance/es/](http://www.who.int/topics/drug_resistance/es/)
65. Lazlo A, Kantor IN.1994. A random simple survey of initial drug resistance among tuberculosis cases in Latin America. Bull World Health Organ. 84:603-610
66. Garcia Garcia ML, Valdespino Gomez JL, Palacios Martinez M. 1995. Tuberculosis y SIDA
67. Sifuentes OJ, Ponce de Leon A, Camacho MF, 1995. Resistencia de Mycobacterium tuberculosis en pacientes mexicanos: características clínicas y factores de riesgo: Rev Inv Clin .47: 273-281
68. Granich RM, Moore M, Binkin NJ, Mc Cray E, 2001. Drug-resistant tuberculosis in foreign-born persons from Mexico, the Philippines and Vietnam- United States, 1993-1997. Int. J Tuberc. Dis. 5:
69. Peter CR, Schultz E, Moser K, Cox M, Freeman R, Lomeli LR. 1998. Drug resistance pulmonary tuberculosis in the Baja California- San Diego Country border population. West J. Med. 169: 208-213

70. Mision de evaluación externa del programa de control de tuberculosis, Secretaría de Salud, [Fecha de consulta: 16-Marzo-2016] Disponible en:

Reporte Final México - Cenaprece - Secretaría de Salud

[www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/.../reporte\\_final\\_mexico.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/.../reporte_final_mexico.pdf)

71. Evaluación Externa del Programa de Control de Tuberculosis de México, Secretaria de Salud, [fecha de consulta 20-Diciembre-2015] Disponible en:

[http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/reporte\\_final\\_mexico.pdf](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/reporte_final_mexico.pdf)

72. Kant S, Maurya AK, Kushawa RAS, Nag VL, Prasad R. 2010. Multi-drug resistant tuberculosis: An iatrogenic problem. *Bioscience Trends*.4:48-55

73. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, Jensen P, Bayona J. 2010. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet*. 375:1830-1843

74. Herrera-Leon L, Molina T, Saiz P, Saez-Nieto JA, Jimenez MS. 2005. New multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*.49:144-147

75. Hillemann D, Kubica T, Agzamova R, Venera B, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. 2005. Rifampicin and isoniazid resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis strains isolated from patients in Kazakhstan. *Int J Tuberc Lung Dis*.9:1161-1167

76. Quirós-Roldán E, Airoidi M, Moretti F, Carosi G. Bases moleculares de resistencia de M. tuberculosis. *Rev Diagn Biol*. 2001; 50:200-3

77. Said S, Becerril P, Molina G, Barrios H. Tuberculosis causada por cepas de *M. tuberculosis* drogorresistentes. *Enf Emerg*. 2005; 7:13-9
78. Arraiz N, Bermudez V, Urdaneta B. 2005. Resistencia a drogas de *Mycobacterium tuberculosis*: bases moleculares. *Archivos venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 24: 1-13
79. García R, Lado L, Túnez V, Pérez Del Molinol ML, Cabarcos A. Tratamiento actual de la tuberculosis. *An Med Interna Madrid*. 2003; 20:43-52.
80. Araya P, Velasco M, Tognarelli J, Arias F, 2011. Detection of genes associated with drug resistance in Chile. *Rev Med Chile*. 139: 467-473).
81. Guo H, Seet Q, Denkin S, Parsons L, Zhang Y. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *J Med Microbiol* 2006;55:1527-1531
82. Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendón A, Yang Z, Cave MD, Graviss EA. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol* 2004;53:107-113.)
83. Zenteno-Cuevas R, Zenteno JC, Cuellar A, Cuevas B, Sampieri CL, Riviera JE, et al. Mutations in *rpoB* and *katG* genes in *Mycobacterium* isolates from the southeast of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:468-47
84. Wu XQ, Lu Y, Zhang JX, Liang JQ, Li HM, Zhang GY, et al. Detection of the mutations in *katG* 315 and *inhA* -15 of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from chinese patients. *Chin Med J (Engl)* 2006;119:230-233.
85. Zolay Romay, Nallet Arráiz, Alisbet Fuenmayor, Carmen Ramírez, Luis Rojas y Rafael París, 2012. Detection of S315T mutation in the *katg* gene as a strategy for identification of isoniazid-resistant *Mycobacterium*

- tuberculosis in a reference laboratory. Rev. chil. infectol. vol.29 no.6 Santiago
86. Herrera-Leon L, Molina T, Saiz P, Saez-Nieto JA, Jimenez MS. 2005. New multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother.49:144-147.
87. Wada T, Maeda S, Tamaru A, Imai S, Hase A, Kobayashi K. Dual-Probe Assay for Rapid Detection of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis by Real-Time PCR. Journal Clinical Microbiology. 2004; 42:5277-85
88. Veziris N, Cambau E, Sougakoff W, Robert J, Jarlier V. 2005. Resistance to antituberculous drugs. Arch Pediatr. 12 Suppl 2:S102-109
89. Jiao WW, Mokrousov I, Sun GZ, Li M, Liu JW, Narvskaya O, Shen AD. 2007. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Beijing, China. Chin Med J.20:814-819
90. Agapito J, Neyra V, Castro J, Accinelli A. 2002. Caracterización de las mutaciones en el gen rpoB asociadas a la resistencia a rifampicina en pacientes con tuberculosis pulmonar. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 19 (3)
91. Araya P, Velasco M, Tognarelli J, Arias F, 2011. Detection of genes associated with drug resistance in Chile. Rev Med Chile. 139: 467-473
92. Heep M, Brandstätter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rüh-Gerdes S, et al. Frequency of rpoB mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates. J Clin Microbiol 2001;39:107-110

93. Brudey K, Driscoll J R, Rigouts L, Prodinger W M, Gori A, Al-Hajj S A, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 2006; 6: 23
94. Kato Maeda M, Small PM, 2000, How molecular epidemiology what we know about tuberculosis, West. J Med. 172:256-259.
95. Gomez Marin JE, Leon Franco CI, Inirida Guerrero M, 2002, IS6110 fingerprinting of sensitive and resistant strains (1991\*-1992) of Mycobacterium tuberculosis in Colombia. Mem. Ins. Oswaldo Cruz. 97:1005-1008
96. Cave MD, Yang ZH, Stefanova R, 2005. Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns. J Clin. Microbiol. 48:228-1233
97. Van Deutekom H, Supply P, Haas EWP, Willery E., 2005. Molecular typing OF Mycobacterium tuberculosis by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Variable-Number Tandem Repeat Analysis a More Accurate Method for for Identifying Epidemiological Links between patients with Tuberculosis. J Clin Microbiol. 43:4473-4479
98. Pareek M, Evans J, Innes J, Smith G, Hingley-Wilson S, Loughheed K E, et al. Ethnicity and mycobacterial lineage as determinants of tuberculosis disease phenotype. Thorax 2013; 68 (3): 221-9.
99. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas W H, Hermans P W, Martin C, et al. Comparison of methods based on different molecular

- epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (8): 2607-18
100. Brudey K, Driscoll J R, Rigouts L, Prodinger W M, Gori A, Al-Hajj S A, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006; 6: 23
101. Ritacco V, Iglesias M J, Ferrazoli L, Monteserin J, Dalla Costa E R, Cebollada A, et al. Conspicuous multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain. *Infect Genet Evol* 2012; 12 (4): 711-7
102. Kallenius G, Koivula T, Ghebremichael S, Hoffner S E, Norberg R, Svensson E, et al. Evolution and clonal traits of Mycobacterium tuberculosis complex in Guinea-Bissau. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (12): 3872-8. )
103. Taype C A, Agapito J C, Accinelli R A, Espinoza J R, Godreuil S, Goodman S J, et al. Genetic diversity, population structure and drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in Peru. *Infect Genet Evol* 2012; 12 (3): 577-85)
104. Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, et al. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of Mycobacterium tuberculosis in Peru. *PLoS One* 2012; 7 (11): e49651.)

105. Mokrousov I, Ly H M, Otten T, Lan N N, Vyshnevskiy B, Hoffner S, et al. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography. *Genome Res* 2005; 15 (10): 1357-64.)
106. Von Groll A, Martin A, Félix C, Prata P F, Honscha G, Portaels F, et al. Fitness study of the RDRio lineage and Latin American-Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 58 (1): 119-27
107. Mathema B, Kurepina N, Yang G, Shashkina E, Manca C, Mehaffy C, et al. Epidemiologic consequences of microvariation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 2012; 205 (6): 964-74.
108. Plikaytis B B, Marden J L, Crawford J T, Woodley C L, Butler W R, Shinnick T M. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1994; 32 (6): 1542-6.)
109. Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la Xa Región de Chile Marcos Mancilla E., Alexis Martínez H., Christian Palavecino B., Germán Rehren S., Pedro Lucero L., Gloria León R. y Ana-M Zárraga O, *Rev Chil Infect* 2006; 23 (3): 220-225.
110. Mónica Sequera C, Víctor Delgado S., Wolfan Araque M., Mariela Torrealba O., Raimunda Núñez M., Omaira Da Mata J., Edgar Abadía P., Howard Takiff y Jacobus De Waard, *Mycobacterium tuberculosis*: Espoligotipos en el Estado Carabobo, Venezuela, *Rev Chil Infect* 2008; 25 (5): 362-367

111. Kanduma E, McHugh TD, Gillespie SH. 2003. Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: an users guide. J Appl Microbiol.94:781-791.)
112. Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. 2003. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. Clin Microbiol Infect.8:694-704.
113. Mazars E, Lesjean S, Banuls A, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, et al. Highresolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(4):1901--1906.
114. Nachamkin I, Kang C, Weinstein MP. 1997. Detection of resistance to isoniazid, rifampin, and streptomycin in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis by molecular methods. Clin Infect Dis.24:894-900
115. Fan XY1, Hu ZY, Xu FH, Yan ZQ, Guo SQ, Li ZM. Rapid detection of rpoB gene mutations in rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in shanghai by using the amplification refractory mutation system. J Clin Microbiol. 2003 Mar;41(3):993-7.
116. Allix-Béguet C, Fauville-Dufaux M, Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2008;46:1398-406.



117. Alvarez-Gordillo GC, Halperin-Frisch D, Blancarte-Melendres L, Vazquez-Castellanos JL. Risk factors for antitubercular drug resistance in Chiapas, Mexico. *Salud Publica Mex* 1995;37(5):408-416.)
118. Olvera-Castillo R. Farmacorresistencia secundaria en tuberculosis. Tendencia en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001;14:151-159
119. Said-Fernandez S C-OG, Becerril-Montes P, Navarro-Marmolejo L, Valdovinos-Chavez S. Perfiles de resistencia a medicamentos antituberculosos de primera y segunda elección en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de enfermos con tuberculosis pulmonar radicados en el sector noroeste de la ciudad de Monterrey y atendidos por el IMSS. *RESPYN* 2001;4
120. Alvarez-Gordillo GC, Sandoval-Trujillo H, Bojalil-Jaber LF. Tuberculosis resistant to treatment with antitubercular drugs. A study in the state of Chiapas, Mexico. *Aten Primaria* 1999;24(4):209-214.)
121. Garza-Gonzalez E, Gonzalez GM, Renteria A, Cruz-Pulido W, Rivera G, Bocanegra-Garcia V. A pyrosequencing method for molecular monitoring of regions in the *inhA*, *ahpC* and *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(6):607-612
122. Garza-Gonzalez E, Gonzalez GM, Renteria A, Cruz-Pulido W, Rivera G, Bocanegra-Garcia V. A pyrosequencing method for molecular monitoring of regions in the *inhA*, *ahpC* and *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(6):607-612.

123. Velasco-Rodriguez VM P-GA, Esquivel-Molina C, Sanchez-Cabral O, Martinez-Ordaz V, Cicero-Sabido R. Epidemiología y resistencia primaria a farmacos en casos incidentes de tuberculosis pulmonar. Rev Med IMSS 2004;42:301-306
124. Garza-Gonzalez E, Gonzalez GM, Renteria A, Cruz-Pulido W, Rivera G, Bocanegra-Garcia V. A pyrosequencing method for molecular monitoring of regions in the inhA, ahpC and rpoB genes of Mycobacterium tuberculosis. Clin Microbiol Infect 2010;16(6):607-612
125. Martinez-Gamboa A, Ponce-de-Leon A, Galindo-Fraga A, Bobadilladel-Valle M, Kato-Maeda M, Robertson BD et al. Molecular analysis of Mycobacterium tuberculosis strains with an intact pks15/1 gene in a rural community of Mexico. Arch Med Res 2008;39(8):809-814
126. Macias-Parra M, Kumate-Rodriguez J, Arredondo-Garcia JL, LopezVidal Y, Castanon-Arreola M, Balandrano S et al. Mycobacterium tuberculosis Complex Genotype Diversity and Drug Resistance Profiles in a Pediatric Population in Mexico. Tuberc Res Treat 2011;2011:239042
127. Martinez-Guarneros A, Rastogi N, Couvin D, Escobar-Gutierrez A, Rossi LM, Vazquez-Chacon CA et al. Genetic diversity among multidrugresistant Mycobacterium tuberculosis strains in Mexico. Infect Genet Evol 2013;14:434-443
128. Jafarian M, Aghali-Merza M, Farnia P, Ahmadi M, Masjedi M R, Velayati AA. 2010. Synchronous comparison of Mycobacterium tuberculosis epidemiology strains by "MIRUVNTR" and "MIRU-VNTR and Spoligotyping" technique. Avicenna J Med Biotechnol.2:145-152)

129. Lucerna MA, Rodríguez-Contreras R, Barroso P, Martínez MJ, Sánchez-Benítez ML, García de Viedma D. Epidemiología molecular de la tuberculosis en Almería. Factores asociados a transmisión reciente. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:174-8.
130. Allix-Béguec C, Fauville-Dufaux M, Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1398-406.