



78  
2y

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE LA COEXISTENCIA DE  
DOS O MAS CEPAS DE MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS EN UN MISMO PACIENTE  
CON TUBERCULOSIS PULMONAR,  
MEDIANTE EL USO DE LA TECNICA  
DE RAPD - PCR**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

RICARDO MENDEZ MEZA



MEXICO D. F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

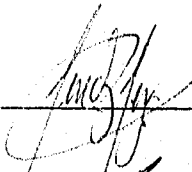
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

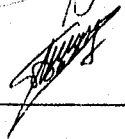
Presidente      Prof. **PENICHE QUINTANA ELDA**  
Vocal            Prof. **GARZA VELASCO RAUL**  
Secretario      Prof. **ENCISO MORENO JOSE ANTONIO**  
1er. suplente   Prof. **CEVALLOS FERRIZ MARIA ESTELA**  
2do. suplente   Prof. **TORRES MALDONADO LEDA CAROLINA**

Sitio donde se desarrolló el tema: Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, C.M.N. Siglo XXI, IMSS.

**Sustentante:** Ricardo Méndez Meza.



---



---

**Asesor:** Dr. José Antonio Enciso Moreno.

## **DEDICATORIAS**

### **A MIS PADRES**

MICAELA Y RICARDO:

ESTE TRABAJO VA DEDICADO A USTEDES PORQUE SIEMPRE  
ESTUVIERON A MI LADO BRINDANDOME SU APOYO Y  
COMPRENSIÓN Y GRACIAS A ELLO PUDE LOGRAR ESTA META.  
GRACIAS POR SIEMPRE.

UN ABRAZO Y UN BESO.

### **A MIS HERMANOS**

ENRIQUE, PATRICIA Y EDUARDO.

**A MI ESPOSA**

SUSANA:

POR CONFIAR EN MI. A TI CON MUCHO AMOR.

**A MI HIJO**

RICARDO:

PORQUE ERES PARTE FUNDAMENTAL EN MI VIDA.

GRACIAS POR ESPERARME. NO TE VOY A DEFRAUDAR.

**A MI FACULTAD.**

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**A DIOS.**

**GRACIAS POR DEJARNOS JUGAR CON TU CREACIÓN.**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MI ASESOR**

DR JOSE ANTONIO ENCISO MORENO.

### **A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO**

GLORIA CALDERÓN, NORMA PERNAS, LUIS ANGEL MALDONADO,  
MARIBEL ORTÍZ, PATRICIA LLAGUNO, MONICA MADRIGAL,  
MAURICIO SARAZOLA, HILDA VALDES:

PORQUE JUNTOS PASAMOS BUENOS MOMENTOS EN EL  
LABORATORIO.

### **AL DR. DAVID ANGULO GONZALEZ**

POR ENSEÑARME GRAN PARTE DE LO QUE APRENDI EN EL  
LABORATORIO, YA QUE SIN SU AYUDA NO HUBIESE LLEVADA A  
CABO ESTE PROYECTO.

**A MIS SUEGROS FRANCISO Y JOSEFINA**

**A MIS PROFESORES DE LA FACULTAD**

POR LA FORMACIÓN ACADÉMICA QUE DE ELLOS RECIBÍ.

UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL A LOS PROFESORES **ELDA  
PENICHE Y RAUL GARZA** POR TODO EL APOYO QUE ME DIERON  
PARA CONCLUIR ESTE TRABAJO.

**A LA QFB. LOURDES SIGALES**

GRACIAS POR AYUDARME CON TUS CONSEJOS Y TU AMISTAD.

**A ENRIQUE MENDEZ**

POR DARMÉ LA MANO CUANDO LO NECESITABA.



**A MI AMIGO EMILIO RENDON GUZMAN**

**A MI AMIGA KARLA LOPEZ MARTINEZ**

**A MIS COMPAÑEROS DE LA FACULTAD**

EDGAR "LA ARAÑA", FREDDY, LENIN, LUIS ANGEL, SERGIO,  
MARCELA, MARIA EUGENIA, ERIKA, SUSANA MONTERO, EMMA,  
LETICIA, ARACELI, ERICK, CARLOS, GUADALUPE, JUAN JOSE,  
MIRIAM, ZITLALI.

**A LA M. en C. LEDA TORRES MALDONADO**

## ÍNDICE.

	Página
<b>ÍNDICE</b>	1
<b>1 OBJETIVOS</b>	3
<b>2 JUSTIFICACIÓN</b>	4
<b>3 ANTECEDENTES</b>	6
<b>3.1 La tuberculosis como un problema de salud pública mundial</b>	6
3.1.1 Tuberculosis	6
3.1.2 Infección por tuberculosis	6
3.1.3 Incidencia anual de enfermedad y muerte	7
3.1.4 Impacto de la epidemia HIV-SIDA	8
3.1.5 Tuberculosis en los Estados Unidos	9
3.1.6 Tuberculosis en México	12
<b>3.2 Agentes etiológicos de la tuberculosis</b>	12
3.2.1 Etiología	12
3.2.2 Diagnóstico en el laboratorio	14
3.2.3 Biología de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
3.2.4 Características genéticas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
<b>3.3 Epidemiología molecular</b>	17
3.3.1 Epidemiología basada en la técnica del Análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción de DNA genómico (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)	18
3.3.2 La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction)	20
3.3.3 Epidemiología molecular basada en ensayos de Amplificación al Azar de DNA Polimórfico mediante PCR (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR)	22
<b>3.4 Resistencia de <i>M. tuberculosis</i> a isoniazida</b>	23
<b>3.5 Coexistencia de dos o más cepas de <i>M. tuberculosis</i>.</b>	25

<b>4 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	27
4.1 Pacientes y tipo de muestra	27
4.2 Procesamiento de las muestras	27
4.3 Cultivo	28
4.4 Identificación	29
4.5 Pruebas de sensibilidad a antifímicos	30
4.7 Aislamiento de DNA genómico de los subcultivos	31
4.8 Amplificación de DNA por RAPD-PCR	32
4.9 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación	34
4.10 Análisis densitométrico de los productos de amplificación de PCR	35
<b>5 RESULTADOS</b>	37
5.1 Pacientes y tipo de muestra.	37
5.2 Patrones de sensibilidad a antifímicos	37
5.3 Análisis de RAPD-PCR de los subcultivos aislados	38
5.4 Análisis estadístico	43
<b>6 ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	45
6.1 Extracción de DNA	45
6.2 Amplificación por PCR	46
6.3 Coexistencia de dos cepas de <i>M. tuberculosis</i>	52
<b>7 CONCLUSIONES</b>	55
<b>8 APENDICE</b>	56
<b>9 BIBLIOGRAFÍA</b>	58

## **I. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

1. Identificar con base a los patrones polimórficos de DNA amplificado por RAPD-PCR, la coexistencia de 2 o más cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en un mismo individuo.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Establecer la técnica de RAPD-PCR para la tipificación de distintos aislamientos de *M. tuberculosis* a partir de muestras de expectoraciones de pacientes con TB pulmonar.
2. Analizar los patrones de amplificación de DNA polimórfico en subcultivos de *M. tuberculosis* obtenidos de un mismo paciente.
3. Establecer modelos de agrupamiento de subcultivos de *M. tuberculosis* mediante análisis de grupo jerárquico en base a los índices de similitud obtenidos en función de los patrones de bandas de DNA amplificado por RAPD-PCR.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis (TB) ha resurgido como un problema importante de Salud Pública a nivel mundial debido, entre otras causas, a la asociación de la TB con la infección por HIV, a falta de un adecuado seguimiento en el tratamiento de los pacientes con TB y al surgimiento de brotes de cepas multirresistentes. Además, varios reportes mencionados posteriormente indican que un gran porcentaje de casos de TB se deben a transmisión activa, más que a una reactivación de una infección latente.

Durante mucho tiempo se ha discutido la posibilidad de la coexistencia de varias cepas de *M. tuberculosis* en un mismo paciente, sin que se haya podido confirmar del todo este fenómeno. Además, debido al aumento en el número de casos de TB por una infección reciente, es más alta la posibilidad de la coexistencia de dos o más cepas de *M. tuberculosis* en un mismo paciente.

Sin embargo, durante mucho tiempo se careció de técnicas que permitieran diferenciar aislamientos de *M. tuberculosis*. Como se menciona más adelante, recientemente han surgido técnicas basadas en Biología Molecular con las cuales se han podido diferenciar a cepas distintas de *M. tuberculosis*. Estas técnicas, que son la de ensayos de RFLP y la de RAPD-PCR, se basan en comparar los patrones de bandas de DNA polimórfico obtenidos a partir de DNA genómico entre aislamientos de una misma especie.

No obstante, los ensayos de RFLP requieren de más DNA genómico ( $10^{-6}$  g) de alta pureza e integridad. Además, todo el procedimiento para el ensayo de RFLP requiere de 2 días aproximadamente para poder llevarse a cabo. Por otro lado, el análisis por RAPD-PCR, se puede llevar a cabo con cantidades más pequeñas de DNA ( $10^{-9}$  a  $10^{-8}$  g) y no necesita la

utilización de DNA purificado como ocurre en los ensayos para RFLP. Igualmente, todo el proceso se puede efectuar en aproximadamente un día de trabajo.

Con base en lo anterior consideramos que usando RAPD-PCR podremos determinar si existe o no coexistencia de dos o más cepas de *M. tuberculosis* en un mismo individuo con TB pulmonar mediante el análisis de subcultivos obtenidos al azar.

### 3. ANTECEDENTES.

#### 3.1 LA TUBERCULOSIS COMO UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA MUNDIAL.

##### 3.1.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa, generalmente de curso subagudo o crónico que afecta órganos y tejidos humanos, preponderantemente al tejido pulmonar y es causada por bacilos del género *Mycobacterium*. La mayor parte de los casos de TB en el hombre se deben a *Mycobacterium tuberculosis*. La infección ocurre como resultado de la inhalación del microorganismo. Las gotitas de Flugge, que contienen microorganismos viables se expulsan como consecuencia de la tos o el estornudo. Éstas se diseminan a muy corta distancia y cuando se evaporan dejan residuos que contienen los núcleos de la gota, los cuales pueden permanecer suspendidos en el aire durante tiempo prolongado y son lo suficientemente pequeños para alcanzar los alvéolos pulmonares y así infectar a aquellos individuos que los aspiran<sup>17</sup>.

##### 3.1.2 Infección por tuberculosis.

Las enfermedades causadas por el género *Mycobacterium* son de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, principalmente en países tropicales y subdesarrollados<sup>19</sup>. Por ejemplo, Kochi en 1991 había estimado que aproximadamente un tercio de la población mundial, o aproximadamente  $1.7 \times 10^9$  individuos, estaban ya infectados con *M. tuberculosis*<sup>16</sup>. Además, la TB representa un 25 % de todas las muertes previsibles a nivel mundial (más de 3.5 millones de muertes anualmente)<sup>24</sup>. En países industrializados, el

80% de los individuos infectados tienen una edad promedio de 50 años o más. En cambio, en los países en vías de desarrollo, la mayoría de las personas infectadas tienen menos de 50 años de edad<sup>16</sup>.

### **3.1.3 Incidencia anual de Enfermedad y Muerte.**

En la tabla 3.1 se muestra la distribución del número actual de casos y de muertes. En 1992 ocurrieron más de 8 millones de casos de TB. De estos casos, 3.3 millones ocurrieron en la región del Sudeste de Asia; 1.9 millones en la región del Pacífico Oeste; 1.2 millones en África, y 1.6 millones, incluyendo a los 199,000 casos que ocurrieron en países industrializados, se presentaron en el resto del mundo. La TB presenta un mayor impacto en los países del tercer mundo, ya que ahí ocurren el 95 % de los casos. El 80 % de estos casos se presentó en personas en edad productiva (edades de 15 a 59 años). De acuerdo al reporte en 1989 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, WHO), en los países en vías de desarrollo se presentan 1.3 millones de casos y 450,000 muertes por TB en niños menores de 15 años de edad<sup>17</sup>.

La mortalidad debida a la TB era, antes del surgimiento de los fármacos antituberculosos, de entre el 50 % y 60 %<sup>24</sup>. Aunque actualmente las tasas de mortalidad han disminuido debido a la significativa proporción de los casos que son detectados y tratados. Sin embargo, se ha podido estimar que cerca de 3.7 millones de personas murieron por TB en 1992; de los cuales 1.2 millones ocurrieron en la región del Sudeste de Asia, 672,000 en la región del Pacífico Oeste, 468,000 en la región Africana, y 426,000 en el resto del mundo (tabla 3.1).



Tabla 3.1: Incidencia y mortalidad para TB estimadas a nivel global en 1992<sup>a</sup>.

Área	Incidencia		Mortalidad	
	No. de casos	Tasa <sup>b</sup>	No. de muertes	Tasa <sup>b</sup>
Sudeste de Asia	3,263,000	240	1,142,000	84
Pacífico Oeste	1,921,000	136	672,000	48
África	1,182,000	214	468,000	85
Este del Mediterráneo	683,000	166	266,000	65
América	584,000	128	117,000	26
Este de Europa	197,000	47	29,000	7
Países Industrializados	199,000	22	14,000	2
Todas las regiones	8,029,000	146	2,078,000	49

<sup>a</sup> Tomada de Snider *et al*, 1994<sup>38</sup>.

<sup>b</sup> Por 100, 000 habitantes.

### 3.1.4 Impacto de la epidemia HIV-SIDA

En algunos países se han producido incrementos marcados en la incidencia de la TB debido a la pandemia por la infección del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (Human Immunodeficiency Virus, HIV). Debido a la capacidad del HIV para destruir al sistema inmune, se han encontrado evidencias de una asociación entre TB e infección con HIV. Así, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), ha surgido como el factor de riesgo más importante para la progresión de un estado latente de la infección por TB a la enfermedad clínica<sup>33</sup>.

El programa global de la OMS para el SIDA estima que en 1992 al menos 13 millones de adultos estarían infectados con HIV a nivel mundial<sup>48</sup>. Además, también se ha estimado, que cerca de un 85 % de las infecciones con HIV han ocurrido en los países en vías de desarrollo, y la gran mayoría de éstas se han presentado en el grupo de edad de los 15 a los 49 años. Por lo que se ve que el impacto de la infección por HIV en el desarrollo de la TB ha sido más grande en adultos jóvenes, donde la prevalencia de la infección por TB es alta ya que este grupo

presenta un mayor riesgo para contraer la infección por HIV, ocurriendo este fenómeno principalmente en países en vías de desarrollo.

Además, mediante el uso de estimaciones de la prevalencia de la infección por TB en varias regiones, se ha calculado que desde el comienzo de la pandemia de HIV hasta la mitad del '93, más de 5 millones de personas han presentado una infección tanto por TB como por HIV <sup>25</sup>. El número de casos de TB reportados en varios países, han hecho evidente el incremento en el riesgo para TB. Por ejemplo, en varios países al sur del Sahara, en África, en donde había disminuido la incidencia de la enfermedad, el número de casos reportados de TB se ha incrementado notablemente durante los ochentas. Entre un período de 7 años comprendido de 1985 a 1991, el número anual de casos en Zambia casi se triplicó y se incrementó en Malawi en más del doble. En Tanzania y Burundi, estos índices se incrementaron hasta un 70% y 40%, respectivamente. También el índice de mortalidad se vio incrementado en estos países <sup>25</sup>.

### **3.1.5 Tuberculosis en los Estados Unidos.**

Hasta 1984, en los Estados Unidos se había experimentado una disminución significativa en los casos de TB. Así, en 1953 ocurrieron 84,304 casos, mientras que en 1984 se registraron 22,225 casos siendo el promedio anual de disminución en el número de casos de aproximadamente 5.3 % por año. Sin embargo, de 1985 a 1992, el número de casos reportados se ha incrementado en cerca del 20 %. Para calcular el número de casos esperados, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control, CDC), usaron la tendencia en el número de casos de 1980 a 1984. Así, estimaron que de 1985 hasta 1990, se

presentaron cerca de 51,000 casos adicionales a los esperados. Además, la tasa de casos en áreas urbanas se incrementó más rápidamente en comparación a la tasa de casos en áreas rurales.

De los 26,673 casos reportados en 1992, cerca del 71% ocurrieron en minorías étnicas y raciales. El número de casos entre blancos no hispanos disminuyó un 10% en el período de 1985 a 1992, y para americanos nativos la disminución fue de un 23%. Sin embargo, para las poblaciones consideradas como minoritarias, el número de casos se incrementó un 27% entre negros, 46% entre asiáticos y personas de las Islas del Pacífico y 75% entre hispanos.

De 1985 hasta 1992, todos los grupos de edad, a excepción de los pacientes de 65 años o más, experimentaron un incremento en el número de casos. Los incrementos más grandes en el número y porcentaje de casos (3,686; 55%) fueron entre personas de 25 a 44 años de edad. Sin embargo, hubo un incremento del 36 % en el número de casos entre pacientes de 4 años de edad y un incremento de 34 % en niños de 5 a 14 años de edad.

De todos los pacientes con TB reportados en 1992 al CDC, el 27 % habían nacido en otros países. Los números y porcentajes de los pacientes nacidos en otros países se incrementó de 4,925 y 22% en 1986, hasta 7,270 y 27% en 1992.

Otro factor importante en el aumento de la incidencia de la TB en los países industrializados ha sido la epidemia de HIV. Los incrementos más grandes en el número de casos reportados de TB ocurrieron en áreas geográficas donde existían grupos impactados grandemente por la epidemia de HIV. Los registros del CDC de la seroprevalencia a HIV en clínicas de tuberculosis pulmonar, han mostrado una alta prevalencia de infección por HIV en pacientes con TB. Los datos de seroprevalencia reunidos de 13 ciudades, probando al menos 50

sueros por año en el periodo de 1989 a 1991, mostraron tasas de seroprevalencia de 13.1% en 1989, 17.8% en 1990, y 21.4% en 1991. Los análisis de tendencias en este estudio mostraron un aumento significativo en la seroprevalencia a HIV entre negros e hispanos <sup>22</sup>.

Uno de los problemas más importantes acerca de los casos recientes de TB ocurridos en los Estados Unidos, ha sido la presencia de brotes de TB con resistencia múltiple a fármacos (TB-RMF). Estos brotes se presentaron en una gran variedad de sitios, incluyendo hospitales, cárceles, refugios para personas sin casa, casas de ayuda para pacientes con SIDA y asilos de ancianos. Un estudio hecho por el CDC, que incluyó el periodo de 1990 hasta agosto de 1992, reportó que el número de personas involucradas en estos brotes y que presentaron TB-RMF era de 297. Además, las cepas de TB-RMF involucradas en estos brotes, eran en su mayoría resistentes tanto a isoniazida como a rifampicina, fármacos de primera línea para el tratamiento de la TB. Además, las cepas involucradas en los brotes de dos hospitales fueron resistentes a 7 fármacos antituberculosos. Las consecuencias de la resistencia a isoniazida y a rifampicina, fueron graves para los pacientes involucrados. Así, la duración mínima de la terapia se extendió de 18 a 24 meses, la mortalidad se vio incrementada (entre 72% y 89%) y, por último, el tiempo medio entre el intervalo de diagnóstico de TB y muerte fue de 4 a 12 semanas. Otro evento presentado en estos brotes fue que el 80 % de los casos se presentó en personas con HIV. Por otro lado, también en la investigación de estos brotes se demostró que existe transmisión de la infección hacia trabajadores del área de la salud. Así, por lo menos 17 cuidadores de salud y trabajadores de cárceles desarrollaron TB con microorganismos multiresistentes <sup>9</sup>.

### 3.1.6 Tuberculosis en México.

En México, la incidencia de la TB pulmonar mostró un descenso desde una tasa de 70 por cada 100,000 habitantes en 1940, hasta una tasa menor de 20 por cada 100,000 habitantes a partir de 1976. De entonces a la fecha las tasas reportadas se encuentran entre 10 y 20 por 100,000 habitantes. Sin embargo, a partir de datos calculados, y de acuerdo al número de individuos susceptibles tomando en cuenta los sub registros, se estimó en 1993 que en 1995 la incidencia pudiera incrementarse a un número aproximado de 45 por 100,000. En el futuro se espera un comportamiento similar al de otros países, donde la incidencia de SIDA se ha acompañado de un incremento en la incidencia de TB pulmonar<sup>15</sup>.

De los casos de infección por TB en México, el 92% de las muertes por TB se deben a las localizaciones pulmonares, menos del 1 % a la meníngea y 7.2 % a otras localizaciones<sup>17</sup>.

## 3.2. AGENTES ETIOLÓGICOS DE LA TUBERCULOSIS

### 3.2.1 Etiología.

El género *Mycobacterium*, perteneciente a la familia *Mycobacteriaceae*, comprende microorganismos inmóviles, no capsulados, aerobios, que se tiñen con dificultad, pero una vez teñidos resisten la decoloración con alcohol-ácido. Estas bacterias son ligeramente curvas o de forma bacilar y miden de 0.2 a 0.6 por 1.0 a 10.0  $\mu\text{m}$ . Estos microorganismos poseen una pared celular muy rica en lípidos<sup>31</sup>.

En general, la tasa de crecimiento de las micobacterias es baja y se requieren de 2 a 8 semanas en promedio para detectar crecimiento en medios micobacteriológicos convencionales. Sin embargo, la detección de su crecimiento puede ser más rápida utilizando un sistema

radiométrico que detecta el metabolismo de un sustrato marcado con  $^{14}\text{C}$  (ácido palmítico). Al llevarse a cabo dicho metabolismo por parte de las micobacterias, se libera  $^{14}\text{CO}_2$  el cual es cuantificado y reportado como un Índice de Crecimiento que indica el desarrollo de micobacterias en el medio de cultivo <sup>31</sup>.

*Mycobacterium tuberculosis* es el principal patógeno causante de TB en el hombre, aunque también puede infectar a monos, cerdos, perros y loros. *M. tuberculosis*, causa en el humano más del 95% de los casos de TB. Por otro lado, *M. bovis*, infecta ganado vacuno, cerdos, caballos y ocasionalmente perros, gatos y ovejas aunque también puede ser causa de enfermedad para el hombre en las comunidades donde no existe control de la TB bovina. Por su parte *M. africanum*, también infecta humanos aunque sólo se ha aislado en África. Estas tres especies comprenden al complejo de *M. tuberculosis* <sup>17</sup>.

Las micobacterias distintas a *M. tuberculosis* o MOTT (Mycobacteria other than tuberculosis), que se han encontrado en especímenes clínicos, fueron agrupadas en 1959 por Runyon. Este investigador estableció un sistema de agrupamiento para las MOTT en base a la capacidad de algunas de ellas de sintetizar un pigmento no hidrosoluble, de color amarillo naranja brillante, dependiendo de si eran incubadas o no en presencia de luz. Así, el grupo I consistía de las micobacterias fotocromógenas, las cuales producen pigmento en presencia de luz. El grupo II consistía de las especies escotocromógenas, las cuales producen el pigmento tanto en presencia como en ausencia de luz. El grupo III de las especies no fotocromógenas, incluye a las micobacterias que no producen pigmento y son de crecimiento lento. Finalmente el grupo IV incluye a las especies de rápido crecimiento que requieren menos de una semana de incubación a 25 o a 37° C para la aparición de colonias <sup>31</sup>.

En la tabla 3.2 se muestra la clasificación más adecuada de las MOTT propuesta originalmente por Wolinski en 1979 y refinada por Woods y Washington en 1987. Esta clasificación está basada en patogenicidad humana de las micobacterias <sup>31</sup>.

**Tabla 3.2: Clasificación de las MOTT en base a su patogenicidad en humanos.**

<b>GRUPO</b>	<b>ESPECIES</b>
Especies patógenas en humanos	<i>M. leprae</i>
Especies potencialmente patógenas en humanos	<i>M. avium-intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , complejo <i>M. fortuitum-chelonae</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. haemophilum</i>
<b>Micobacterias saprófitas que raramente causan enfermedades en humanos</b>	
De crecimiento lento	<i>M. gordonae</i> , <i>M. asiaticum</i> , complejo <i>M. terrae-triviale</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. paratuberculosis</i> .
De crecimiento intermedio	<i>M. flavescens</i>
De crecimiento rápido	<i>M. thermoresistibile</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. vaccae</i> , complejo <i>M. parafortuitum</i> , <i>M. phlei</i>

### 3.2.2 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico en el laboratorio de las enfermedades causadas por micobacterias depende de la detección y aislamiento de BAAR a partir de las muestras clínicas. En general, en la mayoría de los laboratorios clínicos se realiza una tinción a la muestra clínica con la técnica de Ziehl-Neelsen para la búsqueda de BAAR. Sin embargo, esta técnica carece de especificidad y de sensibilidad, ya que no se puede distinguir entre especies del género *Mycobacterium*, y los BAAR, sólo se pueden observar cuando una muestra clínica contiene 10,000 o más microorganismos por mL <sup>49</sup>.

Para el cultivo de micobacterias se utilizan medios especiales. Los medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias consisten tanto de un medio primario no selectivo, como de un medio selectivo. Hay tres tipos generales de formulaciones que pueden emplearse para la elaboración tanto de medios selectivos como de no selectivos. Ejemplos de ellos son a) medios líquidos como el medio BACTEC Middlebrook 7H12; b) medio con base de huevo como el Lowenstein-Jensen (L-J), Petragnani, o American Thoracic Society (ATS); y c) medios semisintéticos con base de agar (Middlebrook 7H10 y 7H11). Estos últimos contienen cantidades específicas de sales, vitaminas, cofactores, ácido oleico y glucosa (enriquecimiento), catalasa y biotina (estimulantes del crecimiento de bacilos dañados), albúmina (la cual estimula el crecimiento de las bacterias al unirse a productos tóxicos como metales pesados) y glicerol.

El cultivo en medios especiales para micobacterias es mucho más sensible porque permite detectar de 8 a 10 microorganismos viables por muestra, aunque en los medios convencionales sólidos, se requiere de prolongados periodos de incubación para detectar desarrollo de microorganismos.

El sistema BACTEC utiliza un sistema radiométrico para la detección del metabolismo de un sustrato marcado con  $^{14}\text{C}$  y permite reducir el tiempo de detección de crecimiento de las micobacterias. El sistema BACTEC utiliza el medio líquido BACTEC Middlebrook 7H12 (Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems, Towson, MD, USA). En términos generales, el procedimiento parte de poner el sedimento de las muestras descontaminadas (0.5 mL), al vial BACTEC 12B que contiene un sustrato marcado con  $^{14}\text{C}$  (ácido palmítico) y una mezcla de antibióticos a concentraciones definidas y estandarizadas por el fabricante. Con el metabolismo de las micobacterias se libera  $^{14}\text{CO}_2$  que es detectado por el equipo BACTEC



460. Las lecturas del  $^{14}\text{CO}_2$  son convertidas a una escala denominada Índice de Crecimiento (Grow Index, GI) que va desde 0 hasta 999. Un valor de  $\text{GI} \geq 10$  es significativo para determinar el desarrollo positivo de las micobacterias<sup>34</sup>.

### 3.2.3 Biología de *Mycobacterium tuberculosis*.

Robert Koch fue quien descubrió al bacilo causante de la TB. Este microorganismo inicialmente se denominó *Bacterium tuberculosis* por Zoppf en 1883, y posteriormente Lehmann y Neumann en 1886 le asignaron el nombre de *Mycobacterium tuberculosis*, debido presumiblemente a la naturaleza de crecimiento lento de los organismos y a su apariencia rugosa semejante a la de los hongos en el medio de cultivo. La morfología típica de *M. tuberculosis* vista con tinción de BAAR, es la de un bacilo ligeramente curvo, de 0.3 a 0.6 por 1.0 a 4.0  $\mu\text{m}$ <sup>31</sup>.

### 3.2.4 Características genéticas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Al analizar el genoma de *M. tuberculosis* se han encontrado elementos repetitivos de DNA. En la tabla I se muestran los elementos de inserción encontrados en *M. tuberculosis*. La secuencia de uno de estos elementos, designado IS6110, lo reportaron por primera vez Thierry *et al*<sup>40,41</sup>. Este elemento se ha relacionado con la familia IS3 de secuencias de inserción, la cual se presenta en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*<sup>29</sup>. Por otro lado, McAdam *et al*<sup>21</sup> secuenciaron el elemento de inserción aislado por Zainuddin y Dale<sup>51</sup> y lo designaron IS986. Sin embargo, dado que estos dos elementos difieren en sólo unos pocos pares de bases, se ha considerado que son uno solo; esto es, IS6110<sup>43</sup>.

IS6110 tiene una longitud de 1,361 pares de bases (en inglés bp), además, de entre las varias especies de micobacterias examinadas, IS6110 se detectó solamente en las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*<sup>40, 41</sup>.

Aparte de IS6110, se han encontrado en *M. tuberculosis* otros elementos de inserción, los cuales se reportan en la tabla 3.3.

**Tabla 3.3: Elementos de inserción encontrados en *M. tuberculosis***

Elemento	Tamaño (bp)	Fuente	Rango de huésped	No. de copias	Relacionado con	Referencia
IS6110	1,344	<i>M. tuberculosis</i>	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	0-25	La familia IS3 de Enterobacterias	McAdam <i>et al.</i> , 1990; Thierry <i>et al.</i> , 1990; Hermans <i>et al.</i> , 1991
IS1081	1,324	<i>M. bovis</i>	Complejo <i>M. tuberculosis</i> <i>M. xenopi</i>	5-7	IS256 de <i>S. aureus</i>	Small y van Embden, 1994.
DR	36	BCG	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	10-50		Hermans <i>et al.</i> , 1991; Small y van Embden, 1994.
MPTR	10	<i>M. tuberculosis</i>	Complejo <i>M. tuberculosis</i> <i>M. goodii</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. gastri</i> <i>M. szulgai</i>	>100	Chi y REP de <i>E. coli</i>	Small y van Embden, 1994.
PGRS	30	<i>M. tuberculosis</i>	Complejo <i>M. tuberculosis</i>	>100		Small y van Embden, 1994.

### 3.3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

El análisis de las rutas de transmisión de la TB, así como el rastreo de posibles fuentes de infección, requiere de la capacidad para discriminar entre cepas de *M. tuberculosis*. Se han usado una gran variedad de métodos para la tipificación de cepas. Hasta hace poco, todos los métodos recaían en el estudio de características fenotípicas, como la serotipificación,

sensibilidad a bacteriófagos<sup>8</sup>, o sensibilidad a antifímicos. Sin embargo, todas estas técnicas tienen limitaciones intrínsecas. Por ejemplo la diferenciación por sensibilidad a antifímicos tiene la desventaja de que varias cepas pueden presentar patrones similares de resistencia. La tipificación con bacteriófagos tiene un uso limitado debido a que solamente se han encontrado pocos tipos diferentes de fagos<sup>5, 10</sup>. Además, la tipificación con fagos requiere de un laboratorio especializado y consume mucho tiempo. Por último, la serotipificación no puede diferenciar cepas dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

### **3.3.1 Epidemiología basada en la técnica del Análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción de DNA genómico (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)**

En base a lo dicho anteriormente, existe la necesidad de desarrollar una técnica rápida y simple para tipificar cepas de *M. tuberculosis*. La técnica del Análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción de DNA genómico (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), se ha usado extensamente para evaluar variabilidades genéticas<sup>12</sup>. Los marcadores moleculares ya descritos (IS6110/IS986), se emplearon por primera vez como sondas para análisis por RFLP por Hermans<sup>13</sup> y por Cave<sup>3</sup>. Estos elementos de inserción son útiles para diferenciar cepas epidemiológicamente no relacionadas, debido a que su número de copias es altamente variable y además presentan variados sitios de integración dentro del genoma. Esto genera un alto grado de polimorfismo en los fragmentos de DNA que contienen a IS6110; obtenidos por el corte con enzimas de restricción<sup>3, 13, 20, 22</sup>. Este polimorfismo se aumenta por la capacidad de IS6110 para trasponerse dentro del genoma sin seguir una

especificidad del blanco de inserción<sup>13, 14, 22, 28</sup>. A pesar del alto grado de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción asociados a IS6110 entre cepas de *M. tuberculosis*, no se ha observado trasposición de IS6110 durante crecimientos prolongados, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>11, 30</sup>. Esto está en acuerdo con observaciones que indican que IS6110 es un excelente marcador genético para la tipificación de cepas individuales de *M. tuberculosis* durante microepidemias, infecciones nosocomiales, y en la diseminación clonal de cepas multiresistentes<sup>2, 6, 7, 8, 13, 20, 28, 30, 35, 40, 44</sup>.

Gracias al estudio del polimorfismo de los patrones de DNA obtenidos por RFLP, también se ha podido observar que un gran porcentaje en el número de casos de TB se debe a infecciones recientes más que a la reactivación de una infección latente<sup>8, 35</sup>.

Sin embargo, con el ensayo de RFLP basado en IS6110, no se encontró ningún cambio en los patrones de bandas, en cepas a las que se les indujo resistencia *in vitro* a antifímicos de primera línea como etambutol, estreptomina, rifampicina e isoniazida. Además, se reportó el caso de un paciente de quien se aisló una cepa de *M. tuberculosis* antes y después de un tratamiento ineficaz. El aislamiento inicial fue sensible y el aislamiento postratamiento presentó resistencia. Sin embargo, no se encontró cambio en los patrones de DNA entre los dos aislamientos, lo cual indica que esta cepa se transformó en resistente durante el tratamiento<sup>44</sup>. Por otro lado, se reportó recientemente que no hay una relación aparente entre resistencia a antifímicos y los patrones de RFLP<sup>42</sup>.

### 3.3.2 La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o Polymerase Chain Reaction tradicional (PCR) permite la amplificación selectiva de una región específica de DNA imitando el fenómeno *in vivo* de replicación de DNA. Para la reacción se necesitan los siguientes componentes: una cadena sencilla de DNA como blanco, iniciadores (secuencias de oligonucleótidos complementarias a los extremos de la secuencia definida de DNA a amplificar), desoxinucleótidos trifosfato y una enzima DNA polimerasa termoestable <sup>32</sup>. Las cadenas sencillas de DNA que servirán como molde, se pueden separar fácilmente por simple calentamiento del DNA de doble cadena a temperaturas cercanas a la de ebullición. El punto de inicio de la síntesis de DNA se puede especificar adicionando un iniciador específico que se alinee, mediante el apareamiento de todas sus bases, a la secuencia blanco en ese punto. Así, la primer característica importante de la PCR, es que la DNA polimerasa puede ser dirigida para sintetizar una región específica de DNA <sup>45</sup>.

En un DNA de doble cadena, las dos cadenas de DNA pueden servir como moldes para la síntesis con la adición de un iniciador para cada cadena. Para una reacción de PCR específica, los iniciadores elegidos son aquellos que flanquean la región que va a ser amplificada. Así, las nuevas cadenas de DNA sintetizadas, las cuales comprenden al iniciador, se extienden hacia la posición del iniciador localizado en la cadena complementaria. Los nuevos sitios de unión al iniciador se generan en cada nueva cadena de DNA sintetizada. La mezcla de reacción se calienta nuevamente para separar tanto las cadenas originales de DNA como las recién sintetizadas, las cuales están disponibles para posteriores ciclos de hibridación del iniciador, síntesis de DNA, y separación de las cadenas. El resultado neto de una reacción de PCR, es que

al fin de un número determinado de ciclos (n), la reacción contiene teóricamente un máximo de  $2 \times n$  moléculas de DNA de doble cadena que son copias de la secuencia de DNA presente entre los iniciadores. Así, la segunda característica importante de la PCR es la amplificación exponencial de grandes cantidades de la región específica de DNA <sup>45</sup>.

A los pasos anteriores de a) calentamiento para separación del DNA de doble cadena, b) alineamiento específico de los iniciadores a la cadena sencilla de DNA blanco, y c) extensión de las nuevas cadenas de DNA, se les denomina un ciclo de PCR, y los pasos se denominan desnaturalización, alineamiento y extensión, respectivamente. Cada uno de estos pasos requiere de condiciones de temperatura y tiempo específicos.

Debido a los cambios de temperatura, se requiere de una enzima en particular. Así, se utiliza la enzima termoestable *Taq* polimerasa cuya vida media es de 40 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$  <sup>32</sup>. Originalmente se usó en la PCR la DNA polimerasa de *Escherichia coli*; sin embargo, esta enzima al no ser termoestable era destruida a las temperaturas necesarias para separar la doble cadena de DNA, por lo que se tenía que añadir enzima fresca nuevamente en cada ciclo, lo que provocaba variaciones en los resultados y solía ser un proceso muy tedioso.

Un avance técnico importante surgió del aislamiento de una DNA polimerasa, resistente a altas temperaturas, que se obtuvo de una bacteria termófila denominada *Thermus aquaticus*, la cual normalmente vive en aguas con temperaturas de  $75^{\circ}\text{C}$ . Esta enzima tiene una temperatura óptima de  $72^{\circ}\text{C}$  y es razonablemente estable a  $94^{\circ}\text{C}$ . De esta forma la *Taq* polimerasa se añade solamente una vez y permanece activa hasta completar un número determinado de ciclos de amplificación. Con este desarrollo se facilitó la automatización de la reacción de PCR a través

del uso de termocicladores los cuales se programan para las temperaturas y tiempos necesarios para la amplificación por PCR <sup>45</sup>.

### **3.3.3 Epidemiología molecular basada en ensayos de Amplificación al Azar de DNA Polimórfico mediante PCR (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR)**

Una nueva técnica utilizada para la generación de patrones de DNA polimórficos, basada en la reacción de PCR, es la de ensayos de Amplificación al Azar de DNA polimórfico mediante PCR (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR). En este método se eligen condiciones de baja astringencia con lo que se generan una amplia gama de productos de amplificación. Normalmente en una PCR específica se eligen condiciones de alta astringencia asegurando así la unión específica del iniciador a su secuencia blanco. Estas condiciones de alta astringencia se obtienen con temperaturas de alineamiento altas (62-68° C) y concentraciones relativamente bajas de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM). Mediante una reducción intencional en la astringencia en la etapa de alineamiento (disminuyendo la temperatura de alineamiento y aumentando la concentración de MgCl<sub>2</sub> en la reacción) y escogiendo un iniciador que se pueda unir arbitrariamente a cualquier región dentro del genoma, se pueden producir patrones de bandas de amplificación de DNA que son útiles para la diferenciación de distintos microorganismos. Así, se desarrollan dos o más ciclos de PCR en condiciones de baja astringencia al inicio de la amplificación, cuya síntesis inicial permite la estabilización de la interacción molde-iniciador. Después de esos dos ciclos en condiciones relajadas, se realizan ciclos subsecuentes bajo condiciones de temperatura de alineamiento específicos <sup>46</sup>.

Los polimorfismos en los patrones de huellas digitales de DNA generados por RAPD-PCR pueden usarse para distinguir individuos altamente relacionados. Por ejemplo, se han podido diferenciar aislamientos de una misma especie de bacterias, tales como *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus pyogenes* y *Borrelia burgdorferi* <sup>46</sup>.

Recientemente se ha utilizado dicha técnica para la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis*. En dicho estudio, la temperatura de alineamiento en los ciclos de PCR, fue baja (36° C). Además se utilizaron iniciadores de 20 bases, que correspondían a segmentos específicos del DNA de *M. tuberculosis* y la cantidad de DNA genómico requerido para la prueba fue de sólo 20 ng. Así, estos investigadores pudieron diferenciar un bajo número de cepas de *M. tuberculosis* mediante los productos de amplificación de DNA <sup>17</sup>.

Este método resulta ser una excelente metodología para diferenciar aislamientos de TB, principalmente porque no requiere conocimiento previo del genoma del microorganismo y porque además se necesita muy poca cantidad de DNA genómico, que en el caso de *M. tuberculosis*, es muy ventajoso considerando su lento crecimiento.

#### **3.4. RESISTENCIA DE *M. tuberculosis* A ISONIAZIDA.**

El tratamiento de la TB tuvo un cambio muy importante a partir de la introducción en 1952, en los esquemas de tratamiento, de la hidrazida del ácido isonicotínico (isoniazida, INH). En combinación con la rifampicina, RIF (introducida en 1963), ha formado parte del núcleo de los tratamientos contra la TB. Sin embargo, recientemente se ha incrementado el número de aislamientos de TB resistentes a uno o más antifímicos. Por ejemplo en 1993, Ellner *et al*, reportaron que de un total de 6 brotes de TB-RMF ocurridos en seis hospitales de E. U., todos



los aislamientos presentaron resistencia a INH, y la mayoría mostró resistencia tanto a INH como a RIF<sup>9</sup>.

Se ha visto que la falta de susceptibilidad de *M. tuberculosis* a los antifímicos no se debe a la presencia de plásmidos que le confieran resistencia. Esto es, en parte, a que no hay evidencias fuertes que indiquen una existencia natural de plásmidos circulares en *M. tuberculosis*<sup>11</sup>. Por lo tanto, se ha visto que los mecanismos de resistencia ocurren por cambios en el genoma.

*M. tuberculosis* normalmente es un microorganismo muy sensible a INH ya que las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para este fármaco están en el rango de 0.02-0.06 µg/ml. Los primeros hallazgos útiles para tratar de encontrar un posible mecanismo de resistencia a INH por *M. tuberculosis*, se realizaron a mitad de este siglo. En 1954, Middlebrook *et al* reportaron que cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH presentaban deficiencias en la actividad de la catalasa. Posteriormente se demostró una correlación inversa entre las CMIs para INH y la actividad de la catalasa y peroxidasa, en una amplia variedad de aislamientos de *M. tuberculosis*. Recientemente Zhang *et al* al clonar un gen denominado *katG* que codifica para la síntesis de la catalasa-peroxidasa, encontraron que la transformación con el gen funcional *katG* restablecía la sensibilidad a INH en algunos aislamientos resistentes de *M. smegmatis* y de *M. tuberculosis*<sup>52, 53</sup>.

No obstante, se ha encontrado que no todas las cepas resistentes a INH son catalasa negativa. Por ejemplo, solamente del 10 al 25 % de los aislamientos resistentes aislados en Nueva York y San Francisco eran catalasa negativa, lo cual indica la presencia de otros mecanismos de resistencia para INH<sup>1</sup> Más recientemente se ha reportado otro gen,

denominado *mha*, que se ha visto involucrado en la resistencia de *M. tuberculosis* a INH. La proteína producto del gen *mha*, tiene un 40 % de similitud en sus aminoácidos con respecto a la enzima de enterobacterias EnvM, la cual se ha asociado con la biosíntesis de los ácidos grasos, fosfolípidos y polisacáridos. Esto se ha observado porque algunas cepas resistentes a INH tienen una mutación puntual en el gen *mha* donde se encuentra cambiado el aminoácido 94 (serina por alanina)<sup>1,4</sup>.

Por lo tanto, mutaciones puntuales en el genoma de *M. tuberculosis* pueden producir mutantes resistentes a INH. Además, se pueden aislar cepas resistentes de *M. tuberculosis* a INH (CMI > 0.2 µg/mL) en una proporción relativamente alta (en una de 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> bacterias), teniéndose una frecuencia de 100 a 1.000 veces mayor que las presentadas para otros antifímicos. Por ejemplo, aislamientos resistentes a RIF se encuentran en 1 de 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> bacterias. Varios factores son los responsables en el aumento de esta frecuencia. La resistencia a rifampicina puede ser producida por una mutación puntual muy precisa que afecte una región particular de la subunidad β de la RNA polimerasa. Por otro lado, para INH cada mutación que interrumpa o altere el gen *katG* generará un aislamiento resistente. Así, se potencia la probabilidad de que una simple mutación produzca resistencia a INH<sup>51</sup>.

### **3.5. COEXISTENCIA DE DOS O MÁS CEPAS DE *M. tuberculosis*.**

En relación a la coexistencia de cepas sensibles y resistentes de *M. tuberculosis* en un mismo individuo, estudios de seguimiento han documentado el aislamiento de cepas antes y después de tratamiento con fármacos antifímicos, lo cual se ha interpretado como posible reinfección exógena, sin poder descartar la coexistencia de dichas cepas desde el inicio de la

infección ni la probable selección de éstas con los tratamientos<sup>35</sup>. Apoyando esta explicación se encuentra el reporte de un brote de TB pulmonar en pacientes con SIDA, en donde se identificó en dos casos, mediante polimorfismo de DNA, la coexistencia de dos cepas distintas de *M. tuberculosis*<sup>8</sup>. La posibilidad de que personas previamente infectadas con *M. tuberculosis* puedan ser exógenamente reinfectadas se ha debatido en el pasado. Sin embargo, gracias al estudio de cepas de *M. tuberculosis* por medio de RFLP, se ha demostrado que la infección exógena juega un papel muy importante en el número de casos de TB actualmente<sup>35, 36</sup>. Hasta el momento, la coexistencia de dos o más cepas distintas de *M. tuberculosis* se ha demostrado parcialmente<sup>8</sup>.

## 4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Pacientes y tipo de muestra.

Las muestras analizadas fueron proporcionadas por la Q.F.B. Edith Pérez y fueron expectoraciones de pacientes mayores de 16 años con sospecha clínica de tuberculosis pulmonar, quienes se encontraban hospitalizados o en manejo ambulatorio en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). De cada paciente se registraron los siguientes datos: edad, sexo, enfermedad clínica subyacente y antecedentes de tratamiento antifímico.

Las muestras se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios:

**CRITERIOS DE INCLUSIÓN:** Muestras de pacientes con infección pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* con tinción positiva en esputo para BAAR por método de Ziehl-Neelsen.

**CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:** Aquellas muestras en las que se obtuvieron 2 ó menos colonias en el cultivo.

**CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:** Muestras que a pesar de observarse BAAR por medio de una tinción de Ziehl Neelsen no fue posible recuperarlas en el cultivo. Muestras en las que el cultivo se contaminó con otras bacterias u hongos que hicieron imposible la identificación precisa de colonias de *M. tuberculosis*.

### 4.2 Procesamiento de las muestras.

La búsqueda de Bacilos Ácido Alcohol Resistentes a (BAAR) se realizó haciendo una tinción de un frotis de las expectoraciones fijadas a la flama, por medio de la técnica de Ziehl

Neelsen y realizando una observación posterior de la muestra en un microscopio con el objetivo de inmersión.

Las muestras se transfirieron a un tubo Falcon de 50 mL con tapón de rosca y se les adicionó un volumen igual de NaOH al 4 %. El tubo se cerró y se colocó en el Vórtex durante 30 seg. El material se dejó incubar a temperatura ambiente por un periodo de 20 min. Posteriormente la muestra se centrifugó en una centrifuga clínica durante de 2 min a 3,000 rpm. El sobrenadante se desechó en un recipiente con una solución de fenol al 5%. Luego, a cada muestra se añadieron aproximadamente 25 mL de agua destilada estéril. Dicha suspensión se mezcló ligeramente y se neutralizó la muestra con HCl 1.25 N. La muestra se centrifugó nuevamente durante 15 min a 3,000 rpm. El sobrenadante se desechó en un recipiente con solución de fenol al 5%. La pastilla se resuspendió en 2 mL de PBS a pH 7.4 <sup>31</sup>.

#### 4.3 Cultivo

Del sedimento de cada muestra se realizó una resiembra en medio de Agar Middlebrook 7H10 (Difco Laboratories, Detroit MI, USA), enriquecido con Middlebrook OADC (Difco Laboratories, Detroit MI, USA). La incubación en el medio de cultivo sembrado con las micobacterias se realizó a 37° C durante 8 semanas en una incubadora con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Los cultivos se revisaron semanalmente y una vez detectado crecimiento se realizó subcultivo de 4 colonias tomadas al azar en medio Middlebrook 7H10.

#### 4.4 Identificación

De cada uno de los subcultivos, se realizó una suspensión en 1 mL de amortiguador de fosfatos a pH 7.4 en tubos Eppendorf por medio de agitación con un Vórtex (Vortex, Lab-Line Instruments, Melrose Park, Ill., USA) durante 10 min. Posteriormente, la suspensión de células se dejó sedimentar durante 30 min y se ajustó a una turbidez similar al tubo No. 1 de la escala de McFarland; 0.1 mL de la suspensión final de cada muestra se inoculó en un frasco con medio de cultivo líquido BACTEC 12B (Middlebrook 7H9 enriquecido) (Becton Dickinson, Towson, Maryland, USA), previamente estabilizado con 5% de CO<sub>2</sub>. Los frascos inoculados se incubaron a 37° C y se leyó diariamente su Índice de Crecimiento (Grow Index, GI) por el sistema radiométrico automatizado BACTEC (BACTEC TB 460, Becton Dickinson, Towson, Maryland, USA). Cuando el GI alcanzó valores entre 50 y 100 en la escala del sistema BACTEC, se transfirió 1 mL del cultivo a un frasco nuevo de Medio 12B el cual contenía p-nitro- $\alpha$ -acetilamino- $\beta$ -hidroxi-propiofenona (NAP, Becton Dickinson) para la identificación de *M. tuberculosis*. Se incubaron los frascos, tanto el del cultivo original como el de la prueba de NAP, a 37° C comparando el GI de ambos por un período mínimo de 4 días.

Se consideró como de *M. tuberculosis* a toda aquella cepa obtenida de crecimiento primario, que fue BAAR positiva y que en la prueba de NAP presentara disminución o ausencia de incremento en su GI en dos determinaciones subsecuentes<sup>34</sup>.

#### 4.5 Pruebas de sensibilidad a antifímicos.

Se llevó a cabo la determinación de sensibilidad a los subcultivos obtenidos, a los antifímicos siguientes: Estreptomicina a una concentración patrón de 240 µg/mL, y una concentración final de 6 µg/mL; Isoniazida a una concentración patrón de 4 µg/mL, y una concentración final de 0.1 µg/mL; Rifampicina a una concentración patrón de 80 µg/mL, y una concentración final de 2 µg/mL; Etambutol a una concentración patrón de 300 µg/mL, y una concentración final de 7.5 µg/mL.

La evaluación de sensibilidad a estos cuatro antifímicos se hizo utilizando el sistema radiométrico BACTEC.

La solución inicial de los cuatro fármacos se realizó con agua desionizada estéril. A frascos con Medio 12B, previamente estabilizados, se les agregó 0.1 mL de la solución patrón de sólo un antifímico. Una vez adicionado éste, los frascos se conservaron a 4° C por un máximo de 7 días hasta su utilización.

Los frascos con Medio 12B, previamente complementados con cada uno de los antifímicos, se inocularon con 0.1 mL del cultivo inicial en Medio 12B cuando éste presentaba un GI de 500 a 800. Para cada cepa se incluyeron 4 frascos de Medio 12B cada uno con uno de los 4 antifímicos a probar, y un frasco control que representaba el 1% de crecimiento. Estos últimos se prepararon realizando una dilución 1:100 con amortiguador de fosfatos del cultivo inicial en Medio 12B. Posteriormente, 0.1 mL de esta dilución se inoculó en un frasco de Medio 12B sin antifímico. Todos los cultivos se mantuvieron en incubación a 37° C. Para verificar la pureza del inoculo, 0.1 mL del cultivo inicial en Medio 12B se sembró en agar sangre y se observó el desarrollo de éste durante 96 hrs.

Diariamente se realizaron lecturas de los GI registrados para el control y para cada uno de los cultivos con los antifímicos en el sistema BACTEC. Cuando se alcanzó un GI > 30 para el control, se calculó el valor del incremento en el GI ("Delta" de GI,  $\Delta$  GI), que es la diferencia entre los valores de GI con respecto a los registrados el día anterior para cada frasco. A todos los frascos con antifímicos en los que se presentó un GI mayor que el observado en su control se les tomó un inóculo, el cual se sembró en agar chocolate y se les incubó a 37° C durante 96 horas para descartar contaminación.

Los valores de corte para los antifímicos probados fueron de 6 µg/mL para Estreptomicina; 0.1 µg/mL para Isoniazida; 2 µg/mL para Rifampicina; y 7.5 µg/mL para Etambutol.

Las cepas se consideraron resistentes cuando al menos el 1% de la población crecía en presencia de antifímicos a las concentraciones señaladas previamente. Esto ocurrió cuando el  $\Delta$  GI del control (1% del inóculo sin antifímico) era menor al  $\Delta$  GI del problema (100% del inóculo con antifímico). Las cepas se consideraron sensibles cuando el  $\Delta$  GI del control fue mayor al  $\Delta$  GI en el medio con el antifímico.

#### **4.7 Aislamiento de DNA genómico de los subcultivos.**

Los subcultivos de *M. tuberculosis* obtenidos se sembraron en medio Middlebrook 7H10 enriquecido con Middlebrook 7H10 OADC (Difco Laboratories, Detroit MI, USA), y se incubaron a 37° C hasta la aparición de colonias. Posteriormente varias colonias se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 400 µL de TE IX (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Las micobacterias se inactivaron por calentamiento de la suspensión de células en un baño con



agua a 92° C durante 10 min (placa de calentamiento, Corning, USA). Posteriormente las células inactivadas se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A esta suspensión se le agregaron 300 µL de perlas de vidrio con diámetro promedio de 0.5 mm. (Thomas, USA) y se colocó en un Vórtex durante 7 min. Después, los tubos se centrifugaron en una microcentrífuga refrigerada Sorvall RMC 14 (DuPont, Newton, Conn., USA), a 4° C durante 7 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf nuevo, estéril, de 1.5 mL y se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto grado reactivo analítico (Merck-México, Naucalpan de Juárez, Edo. de México, México), la solución anterior se mezcló suavemente y se mantuvo a una temperatura de -70° C durante 1 hora en un ultracongelador (Hetto, Danmark). Posteriormente los tubos se centrifugaron a -4° C durante 15 min a 14,000 rpm en una microcentrífuga refrigerada Sorvall, RMC 14. La pastilla de DNA se lavó con etanol al 75% (Merck-México), se secó y resuspendió en 100 µL de amortiguador TE 1X estéril. La suspensión de DNA se guardó a -20° C hasta su uso.

#### **4.8 Amplificación de DNA por RAPD-PCR**

En una campana de flujo laminar se preparó la mezcla de reacción de PCR usando para todos los ensayos de PCR puntas ART (Aerosol Resistant Tips) con filtro (Molecular Bio-Products, San Diego, Cal., USA) para evitar contaminación con aerosoles que pudiesen acarrear moléculas de DNA.

La concentración final de la mezcla de reacción de PCR fue la siguiente: desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), dATP, dTTP, dCTP, y dGTP a 100 µM cada uno

(Boehringer Mannheim, Alemania); amortiguador de PCR 1X 10.0 mM Tris-HCl pH 8.3, 50.0 mM KCl, 0.001% (w/v) de gelatina; Iniciador A (IS986-FP 5' ACG CTC AAC GCC AGA GAC CA) (Genosys Biotechnologies Inc., Woodlands, Texas, USA) a una concentración de 1  $\mu$ M; Iniciador B (IS986-RP 5' AAT GAA CCA CCT GAC ATG AC) (Genosys Biotechnologies Inc., Woodlands, Texas, USA) a una concentración de 1  $\mu$ M; *Taq* DNA polimerasa (BiotecSA, U.N.A.M., Coyoacán, D.F., México) a 2.5 U por reacción; MgCl<sub>2</sub> 4 mM (Merck-México, Naucalpan de Juárez, Edo. de México, México); y dimetil sulfoxido (DMSO) al 5% (Sigma, St. Luis, Missouri, USA).

A un tubo de PCR se agregaron 40  $\mu$ L de la mezcla de reacción y a éste se añadieron 100 ng de DNA ajustando el volumen final a 100  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O desionizada estéril. Las muestras se centrifugaron por 5 seg. a 14,000 rpm en una microcentrífuga Sorvall MC 12 V (DuPont, Newtown, Conn., USA).

Los ciclos de amplificación por PCR se realizaron en un termociclador Gene Amp PCR System 9,600 (PERKIN ELMER, Norwalk, CT, USA). Las condiciones de reacción incluyeron un calentamiento inicial a 95° C por 5 min, seguidos de 5 ciclos de PCR en condiciones de baja astringencia, las cuales incluían un paso de desnaturalización del DNA a 95° C por 1 min, un paso de alineamiento de los iniciadores a 36° C por 1.5 min y un paso final de extensión del DNA a 72° C por 1.5 min. Después de los 5 ciclos iniciales, siguieron 30 ciclos de PCR en condiciones astringentes con los pasos de desnaturalización del DNA a 95° C por 1 min, alineamiento de los iniciadores a 62° C por 1.5 min y de extensión del DNA a 72° C por 1.5 min. Por último se incluyó un paso de extensión final de DNA a 72° C por 10 min.

Al final de la reacción, los tubos con la reacción de PCR se centrifugaron por 5 seg. en una microcentrífuga Survall MC 14V. El volumen se concentró de 100  $\mu$ L a 15  $\mu$ L, en un concentrador centrífuga Savant ASI60 (Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA).

#### **4.9 Electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación.**

Para separar los productos de amplificación obtenidos por RAPD-PCR se prepararon geles de agarosa de bajo punto de fusión al 3% con amortiguador TAE 1X (40 mM Tris-acetato a pH 8.6, 1 mM EDTA) en una cámara de electroforesis Horizon 11.14 (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Los productos de reacción de PCR ya concentrados se mezclaron con 3  $\mu$ L de amortiguador de carga 6X (azul de bromofenol al 0.25% w/v, glicerol al 30% v/v). Las mezclas se aplicaron en el gel de agarosa preparado anteriormente. La corrida se llevó a cabo por un periodo de 3 h a 100 voltios con la ayuda de una fuente de poder modelo 14 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA). Después de la corrida, los geles se tñeron en una solución de bromuro de etidio (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), a una concentración de 0.5  $\mu$ g/mL, por un periodo de 15 minutos. Posteriormente, los geles se enjuagaron por 1 min en agua desionizada. Los geles se observaron con un transiluminador de luz UV 2011 MACROUVE (UVP, Inc., San Gabriel, CA., USA) y se fotografiaron con una cámara MP4+ (Sigma Polaroid, USA), con una película tipo 55 profesional (Polaroid, Cambridge, MA, USA). El negativo se conservó para el análisis densitométrico de las bandas.

#### 4.10 Análisis densitométrico de los productos de amplificación de PCR

Los negativos de los patrones de los productos de amplificación se analizaron con la ayuda de un densitómetro Personal Densitometer SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA., USA). El densitómetro cuenta con un láser que recorre toda la imagen a analizar, que en este caso fueron los negativos de las fotografías de los geles. La imagen se procesó en valores de densidad óptica y estos datos se digitalizaron y almacenaron en un archivo de imagen, el cual se procesó en una computadora conectada al densitómetro.

El procesamiento de las imágenes se efectuó con el Software FragmeNT (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA., USA). El software analiza los datos como sigue: se localizan en la imagen las bandas tanto del marcador de peso molecular como de la muestra problema y se asigna el valor de cada banda del marcador de peso molecular. Después, las bandas del marcador de peso molecular se superponen matemáticamente a cada carril de la muestra problema. Así, cada carril tiene su propio marcador de peso molecular (Fig. 4.1). Posteriormente se determina la movilidad relativa de cada banda problema y se compara con los valores de las bandas "exportadas" para ese carril. Finalmente se obtiene un valor de peso molecular de cada banda problema. El reporte de los valores de peso molecular de las bandas de amplificación de cada subcultivo se recuperan con el software Excel (Microsoft Corp., USA)<sup>23</sup>.

El análisis estadístico de los grupos se realizó con el software estadístico SPSS (SPSS Inc., USA). Básicamente esta paquetería determina sobre una escala de similitud, el parecido entre los perfiles de bandas de DNA amplificado por RAPD/PCR de muestras problema. Así, la variable a evaluar en este caso son las bandas amplificación de diferente peso molecular de

cada aislamiento. Las muestras son los aislamientos estudiados. Así, entre mayor número de bandas en común tengan dos aislamientos, mayor índice de similitud tendrán y se agruparán en el mismo grupo en el dendograma generado. Entre menos bandas en común tengan dos aislamientos, estarán más lejanas en la escala de similitud y pertenecerán a grupos completamente distintos. Al determinar un valor de corte de un 80% de similitud entre los aislamientos podremos determinar el número de grupos formados y por lo tanto las cepas relacionadas genotípicamente entre sí<sup>26</sup>.

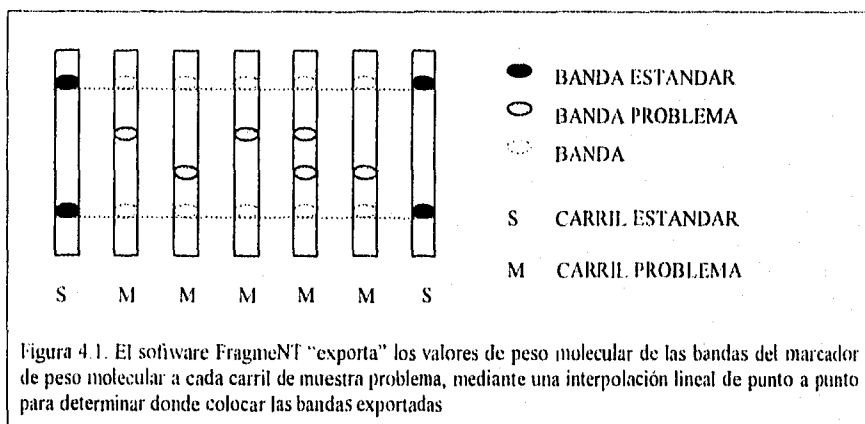


Figura 4.1. El software FragneNT "exporta" los valores de peso molecular de las bandas del marcador de peso molecular a cada carril de muestra problema, mediante una interpolación lineal de punto a punto para determinar donde colocar las bandas exportadas

## 5. RESULTADOS.

### 5.1 Pacientes y tipo de muestra.

Para llevar a cabo este trabajo, se estudiaron las muestras de expectoración provenientes de 55 pacientes. Solamente en 28 de 55 pacientes se obtuvieron cultivos positivos; de éstas, en 7 se identificaron MOTT y en 21 se identificó *M. tuberculosis*. Seis cultivos se eliminaron por haberse contaminado. Dos cultivos se excluyeron porque sólo hubo crecimiento de 2 colonias. De acuerdo a esto, finalmente el estudio se llevó a cabo con las micobacterias aisladas de trece pacientes.

De los trece pacientes con aislamiento positivo para *M. tuberculosis*, nueve fueron de sexo masculino y cuatro femenino. El rango de edad de los pacientes fue de 18 a 69 años con una mediana de 39. Como diagnóstico de enfermedades agregadas se encontró diabetes mellitus no insulino dependiente en 3 pacientes, el resto no tenían otros diagnósticos agregados. Sólo un paciente había recibido previamente antifímicos durante 2 años.

De los trece cultivos de aislamiento primario se realizaron subcultivos de 4 colonias escogidas al azar, de tal manera que se hizo el análisis a un total de 52 subcultivos.

### 5.2 Patrones de sensibilidad a antifímicos.

Con el propósito de encontrar diferencias fenotípicas entre los subcultivos del aislamiento de un mismo paciente, se determinó la sensibilidad de cada uno de los subcultivos de *M. tuberculosis* por medio del sistema BACTEC 460TB. Los resultados de sensibilidad se obtuvieron entre 4 y 8 días con una mediana de 5 días. Los perfiles de sensibilidad de las micobacterias para cada paciente fueron iguales en todos los subcultivos, a excepción de un

caso (paciente No. 7), del cual en uno de los cuatro subcultivos las micobacterias mostraron un perfil de sensibilidad diferente al de los otros tres subcultivos; los resultados de este caso se muestran en la tabla 5.1. El subcultivo 7d fue resistente y los subcultivos 7a, 7b y 7c sensibles a INH. Las pruebas de sensibilidad para este paciente se realizaron por duplicado encontrándose el mismo resultado, con lo que se evitó un posible error en la determinación de sensibilidad a sus subcultivos.

**Tabla 5.1: Sensibilidad de los subcultivos del paciente No. 7**

Subcultivo	Antifímicos			
	Estreptomicina	Isoniazida	Rifampicina	Etambutol
a	sensible	sensible	sensible	sensible
b	sensible	sensible	sensible	sensible
c	sensible	sensible	sensible	sensible
d	sensible	resistente	sensible	sensible

Tabla 5.1: El patrón de sensibilidad se obtuvo utilizando el sistema radiométrico BACTEC. Estreptomicina, 6 µg/mL. Isoniazida, 0.1 µg/mL. Rifampicina, 2 µg/mL. Etambutol, 7.5 µg/mL.

En la tabla 5.2 se muestran los perfiles de sensibilidad de los 52 subcultivos de *M. tuberculosis*. En esta tabla se puede apreciar que los cultivos no susceptibles presentan resistencia únicamente a isoniazida y a rifampicina.

### 5.3 Análisis de RAPD-PCR a los subcultivos aislados.

El análisis de los patrones de sensibilidad de los subcultivos de *M. tuberculosis* puede ayudar a distinguir entre dos cepas diferentes de dicho microorganismo. Sin embargo, para tener una mayor confiabilidad en los resultados, se hizo un análisis de RAPD-PCR a los 52 subcultivos de *M. tuberculosis* a los cuales previamente se les determinó sensibilidad a antifímicos. Esto se hizo con el propósito de determinar si los subcultivos de un mismo paciente que presentaron distintos perfiles de sensibilidad mostraban diferencias a nivel de las

bandas de amplificación de DNA. Además, también se quería observar por medio del análisis de RAPD-PCR si los demás subcultivos de un mismo paciente con igual patrón de sensibilidad observaban el mismo patrón de bandas de DNA amplificado, lo cual debería de ocurrir si provenían de la misma cepa de *M. tuberculosis*.

Tabla 5.2: Patrones de sensibilidad de 52 subcultivos de *M. tuberculosis*.

AISLAMIENTO	SUBCULTIVO	SENSIBILIDAD			
		EST	INH	RIF	ETB
1	a, b, c, d.	S	S	S	S
2	a, b, c, d.	S	S	S	S
3	a, b, c, d.	S	S	S	S
4	a, b, c, d.	S	S	S	S
5	a, b, c, d.	S	S	S	S
6	a, b, c, d.	S	R	S	S
7	a, b, c	S	S	S	S
7	d.	S	R *	S	S
8	a, b, c, d.	S	R	R	S
9	a, b, c, d.	S	S	S	S
10	a, b, c, d.	S	R	R	S
11	a, b, c, d.	S	R	S	S
12	a, b, c, d.	S	S	S	S
13	a, b, c, d.	S	R	R	S

Tabla 5.2: El patrón de sensibilidad se obtuvo utilizando el sistema radiométrico BACTEC. EST = Estreptomina, 6 µg/mL. INH = Isoniacida, 0.1 µg/mL. RIF = Rifampicina, 2 µg/mL. ETB = Etambutol, 7.5 µg/mL. \* Este aislamiento fue el único que presentó distinto patrón de sensibilidad con respecto a sus otros 3 subcultivos.



En la figura 5.1 se observa que los patrones de bandas de amplificación de DNA obtenidas por RAPD-PCR son distintos para aislamientos de *M. tuberculosis* provenientes de diferentes pacientes. Sin embargo se aprecia que dichos patrones son iguales para los subcultivos de todos los aislamientos, incluyendo el aislamiento que presentó patrón de sensibilidad distinto (subcultivos 7a , 7b y 7c y 7d).

En la tabla 5.3 se muestran esquemáticamente los patrones de las bandas encontradas para cada aislamiento. Como ya se mencionó, los perfiles de bandas de amplificación por RAPD-PCR de los 13 aislamientos fueron distintos, lo cual nos indica que esta técnica, en esta población de cepas, fue capaz de distinguir distintos aislamientos de *M. tuberculosis*.

En todos los aislamientos se encontró una banda de amplificación de DNA con el mismo peso molecular de 196 pares de bases.

Por medio del análisis estadístico, se pudo determinar las similitudes en cuanto a los patrones de bandas de amplificación de DNA de los 13 aislamientos manejados (figura 5.2). Así, considerando un porcentaje de similitud de las cepas de un 80 % se forman 3 grupos principales (tabla 5.4).

Figura 5.1: Análisis mediante RAPD - PCR DE diferentes aislamientos de *M. tuberculosis*.

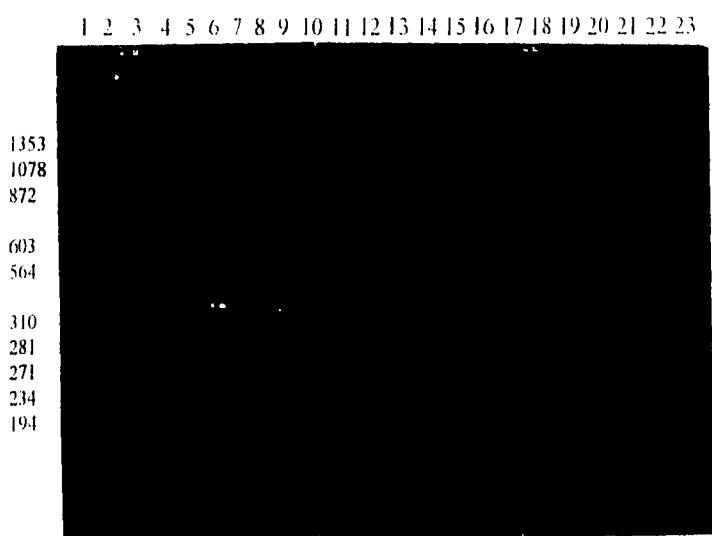


FIGURA 5.1 Electroforesis en gel de agarosa al 3 % con amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001M), de los productos amplificados por RAPD-PCR de diferentes subcultivos de *M. tuberculosis*. La corrida se llevó a cabo a 100 voltios durante 3 horas.

Distribución de las muestras. Carriles 1 y 10: marcador de peso molecular  $\lambda$ Iind III -  $\phi$ x 174Hlac III. Carriles 2-5: subcultivos del paciente 6. Carriles 6-9: subcultivos del paciente 7 \*. Carriles 11-14: subcultivos del paciente 1. Carriles 15-18: subcultivos del paciente 3. Carriles 19-22: subcultivos del paciente 5. Carril 23 control negativo, sin DNA de *M. tuberculosis*.

\* Nota: El paciente 7 fue el que presentó dos cepas de *M. tuberculosis* con diferente patrón de sensibilidad a antimicrobianos.

Tabla 5.3: Perfiles de bandas de DNA amplificado por RAPD-PCR de 13 aislamientos de *M. tuberculosis*.

*	13	12	11	8	2	5	6	4	3	9	7	10	1
833	-												
776					-								
608			-										
550							-						
381						-							
351	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-
325											-		
285	-					-							
267		-											
242						-						-	-
233										-	-		
223				-		-							
202	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
196	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
184						-							-
173				-			-						
166			-										
161						-				-	-	-	-
154	-	-											
142							-		-			-	
138						-							-
132	-	-											
125			-										
111		-											
103	-											-	

Tabla 5.3: A la izquierda de la tabla se muestran las movilidades relativas expresadas en pares de bases (\* pb) de todas las bandas de DNA amplificado por RAPD-PCR de los subcultivos analizados. En la parte superior de la tabla se muestran los números asignados a cada aislamiento de *M. tuberculosis*.

### 5.3 Análisis estadístico.

Por medio del análisis estadístico se pudieron determinar las similitudes en cuanto a los patrones de bandas de amplificación de DNA de los 13 aislamientos manejados (figura 5.2). Así, considerando un porcentaje de similitud de las cepas de un 80% se pueden formar 3 grupos principales (tabla 5.4).

**Figura 5.2. Análisis de grupo jerárquica. Dendograma usando el método de enlace completo.**

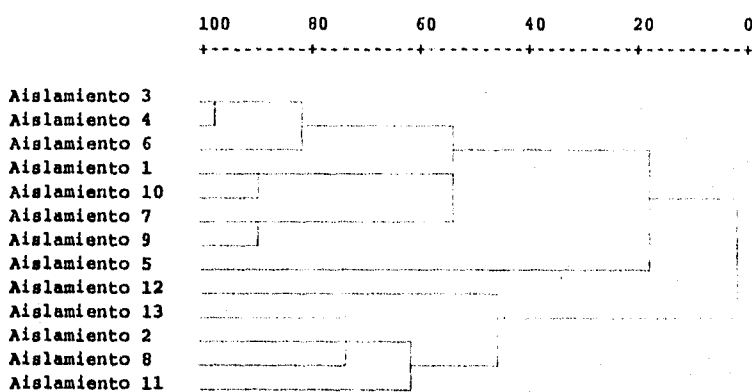


Figura 5.3. Análisis por grupo jerárquico de los patrones de bandas de DNA obtenidos por RAPD-PCR de los diferentes aislamientos de *M. tuberculosis* estudiados. En la fig. 3 se muestra la distribución de grupos al graficar el Coeficiente de Similitud obtenido en la gráfica de diferenciación. A la izquierda se tienen los números de aislamientos mientras que en la parte superior se localiza la escala de similitud entre estos aislamientos.

Tabla 5.4: Agrupación de los aislamientos de *M. tuberculosis*, de acuerdo a su índice de similitud en función de sus bandas de amplificación.

NO. DE GRUPO.	NUMERO DE AISLAMIENTO.
GRUPO 1	3, 4,6
GRUPO 2	1,10.
GRUPO 3	7,9.
GRUPO 4	5
GRUPO 5	12
GRUPO 6	13
GRUPO 7	2
GRUPO 8	8
GRUPO 9	11

Tabla 5.4: En la tabla se indica el agrupamiento de los aislamientos en base a su índice de similitud y considerando un 80% de homología entre éstos.

## 6. ANALISIS DE RESULTADOS.

### 6.1 Extracción de DNA

Para llevar a cabo los ensayos de RAPD-PCR, se necesitaba una técnica que permitiera liberar adecuadamente el DNA de las micobacterias. Las características principalmente buscadas para esta técnica eran: que el proceso de extracción fuera rápido, que se pudieran obtener rendimientos adecuados de DNA y que este DNA extraído tuviera las características de pureza e integridad para usarse en PCR.

Sin embargo, debido a que la pared celular de *M. tuberculosis* es muy resistente, los procedimientos normales de lisis para la posterior extracción de DNA, incluyen el uso de enzimas proteolíticas, las cuales no son 100 % eficientes. Además, se requieren numerosos pasos posteriores para la purificación del DNA con el inconveniente de la pérdida y degradación de los ácidos nucleicos<sup>32</sup>. Por otro lado, la sonicación con perlas de vidrio de muestras clínicas de pacientes con sospecha de TB, se ha utilizado con buenos resultados para liberar el DNA de *M. tuberculosis* presente en la muestra para su posterior aplicación en PCR<sup>19</sup>. Así, se utilizó con éxito la agitación con Vórtex de suspensiones de cultivos puros de *M. tuberculosis* con perlas de vidrio, para la extracción de DNA en condiciones de integridad y de pureza tales que pueda utilizarse para los ensayos de PCR. El tiempo de extracción de DNA fue de aproximadamente 2 horas, en comparación con los procesos de lisis enzimáticas y de extracción fenólica de DNA los cuales duraban aproximadamente día y medio.

Las cantidades promedio de DNA extraídas usando el ensayo con las perlas de vidrio, fueron de aproximadamente 1,5 µg de DNA por muestra y el promedio de DNA para el ensayo

de lisis enzimática fue de aproximadamente 0.55 µg de DNA por muestra a partir de cantidades ligeramente variables de micobacterias. Por lo tanto, con el método de las perlas de vidrio se obtuvieron casi 2 veces más de DNA en comparación del método de lisis enzimática.

Así, el método utilizado para la liberación de DNA de los subcultivos de las micobacterias fue un método físico, en el cual se producía el rompimiento de las células al ser golpeadas con perlas de vidrio durante el agitación en Vórtex.

## **6.2 Amplificación por PCR.**

Un método alternativo al RFLP para generar patrones de bandas de DNA polimórfico y que permite también diferenciar a dos individuos a nivel de DNA, es la técnica de RAPD-PCR. La característica principal de los ensayos de RAPD-PCR, es la utilización de iniciadores no específicos y bajas temperaturas en los ciclos de alineamiento de la reacción de PCR. Estas dos características son las más sobresalientes de dicho ensayo y las requeridas para permitir un alineamiento al azar de los iniciadores dentro del genoma blanco y poder generar patrones de bandas de DNA polimórfico.

En el laboratorio ya se contaba con un protocolo de amplificación específica para DNA de *M. tuberculosis*. Por lo tanto, solo se modificaron del ensayo de amplificación específica, los iniciadores y la temperatura de alineamiento de los mismos.

Yu y Pauls <sup>50</sup> recomiendan el uso de oligonucleótidos de 10 bases de longitud, cuyas secuencias no correspondan a ninguna región específica del genoma de *M. tuberculosis* para ensayos de RAPD-PCR. Además, sugieren que la temperatura de alineamiento sea de 36° C. Con estas especificaciones se logró amplificar DNA de dos cepas no relacionadas,

denominadas A y B. Sin embargo, no se pudieron diferenciar estas dos cepas de *M. tuberculosis*. Un ejemplo de ello se muestra en la figura 1, en donde se puede observar que casi todas las bandas son compartidas por las dos cepas.

Figura 6.1: Amplificación mediante RAPD-PCR de DNA proveniente de dos cepas diferentes de *M. tuberculosis* usando iniciadores de 10 bases.

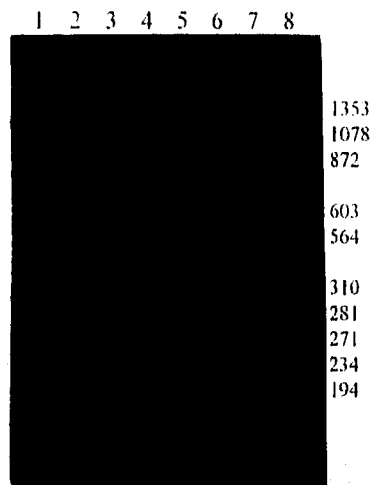


Fig. 6.1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE IX de los productos de amplificación de DNA de dos cepas distintas de *M. tuberculosis* 2 y 5 con iniciadores de 10 bases. Carriles 1 a 3, tres ensayos distintos de amplificación de DNA de la cepa 2. Carriles 4 a 7, 4 ensayos distintos de amplificación de DNA de la cepa 5. Carril 8 marcador de peso molecular  $\lambda$ Hind III- $\phi$ X174/Hae III. Secuencia de los iniciadores 5' GTG CAA TGA G, 5' CAA TGC GTC T.



Recientemente, Linton y sus colaboradores <sup>18</sup> fueron capaces de diferenciar cepas de *M. tuberculosis* utilizando iniciadores de 20 nucleótidos que comprendían secuencias específicas de *M. tuberculosis*. En este trabajo se emplearon 2 de los iniciadores denominados IS986-FP e IS986-RP, que habían funcionado para el grupo de Linton <sup>18</sup>. Sin embargo, bajo las condiciones de dichos autores, aquí no se pudo amplificar DNA. Se nota que las concentraciones de los reactivos en la mezcla de reacción de PCR en dicho trabajo, eran bajas en comparación a aquéllas de los ensayos donde se había conseguido amplificación con iniciadores de 10 bases. Por lo tanto, modificando las condiciones de reacción propuestas por Linton a las que se habían manejado anteriormente para la amplificación con iniciadores de 10 bases, se realizaron ensayos de RAPD/PCR.

También se probó un iniciador diseñado con anterioridad por nosotros para amplificación específica de un segmento de 382 bases del elemento de inserción IS6110. El iniciador denominado IS6110-L tenía la siguiente secuencia de 5' ATC GAG GTG GCC AGA TGC AC.

Las condiciones de reacción de PCR utilizadas, fueron de 30 ciclos en condiciones de baja astringencia a una temperatura de alineamiento de 36°C. Bajo estas condiciones se produjeron bandas de amplificación de DNA tal como se muestra en la figura 6.2. En este ensayo, los patrones de amplificación de DNA para ambas cepas son distintos al utilizarse las diversas combinaciones entre los tres iniciadores.

Figura 6.2: Amplificación mediante RAPD-PCR de DNA proveniente de dos cepas diferentes de *M. tuberculosis* usando iniciadores de 20 bases.

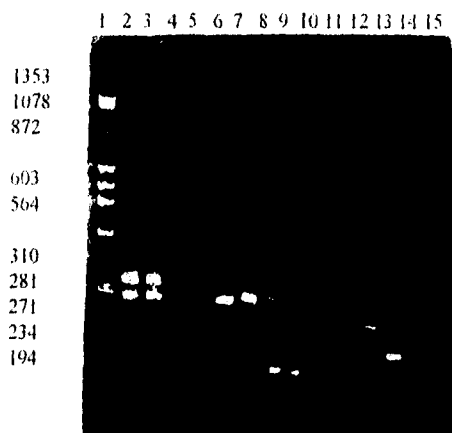


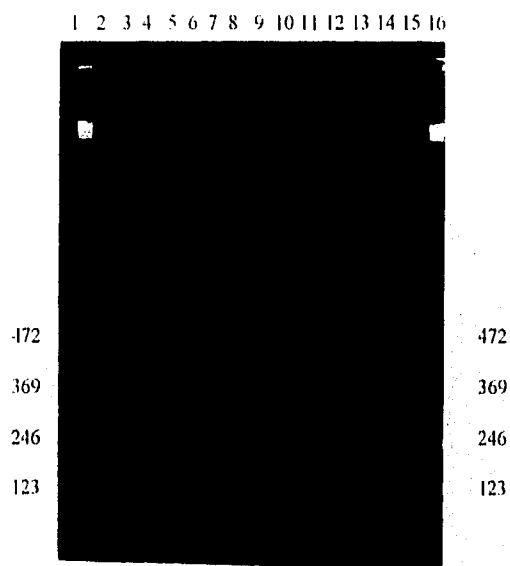
Fig 6.2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE IX de los productos de amplificación de DNA de dos cepas distintas de *M. tuberculosis* A y B con iniciadores de 20 bases. Carril 1 marcador de peso molecular  $\lambda$ Hind III- $\phi$ X174/Hae III. Carril 2 cepa A primer IS6110-L. Carril 3 cepa B primer IS6110-L. Carril 4 cepa A primer IS986-R. Carril 5 cepa B primer IS986-R. Carril 6 cepa A primer IS986-F. Carril 7 cepa B primer IS986-F. Carril 8 cepa A primer IS6110-L + IS986-R. Carril 9 cepa B primer IS6110-L + IS986-R. Carril 10 cepa A primer IS6110-L + IS986-F. Carril 11 cepa B primer IS6110-L + IS986-F. Carril 12 cepa A primer IS986-F + IS986-R. Carril 13 cepa B primer IS986-F + IS986-R. Carril 14 control sin DNA iniciadores IS6110-L + IS986-F. Carril 15 control sin DNA iniciadores IS6110-L + IS986-R. Secuencia de los iniciadores IS6110-L 5' ATC GAG GTG GCC AGA TGC AC; IS986-FP 5' ACG CTC AAC GCC AGA GAC CA; IS986-RP 5' AAT GAA CCA CCT GAC ATG AC

Con base en estos resultados se utilizaron el par de iniciadores de IS986-FP e IS986-RP para los ensayos de amplificación de los subcultivos de *M. tuberculosis*. Con estos iniciadores los patrones de bandas de amplificación de DNA fueron más heterogéneos entre las cepas A y B, en comparación con los patrones generados con las demás combinaciones de iniciadores.

Dado que el número de bandas obtenidas era reducido, para potenciar la reacción de PCR y obtener un mayor número de bandas de amplificación de DNA, se modificaron ciertas condiciones de reacción. Así, se disminuyeron los 30 ciclos en condiciones de baja astringencia a solo 5, con 30 ciclos posteriores en condiciones astringentes. La temperatura de alineamiento se calculó según la fórmula reportada por Rolfs<sup>32</sup> y correspondió a 62° C. Con este cambio se permitió la amplificación específica y selectiva, en los últimos 30 ciclos, de las principales bandas de DNA obtenidas en los primeros 5 ciclos de amplificación. La modificación anterior permitió seleccionar la amplificación de las principales bandas obtenidas al azar en los primeros ciclos, para evitar la amplificación de bandas poco definidas en los productos de amplificación. Simultáneamente se efectuó otro cambio en la mezcla de reacción, agregando dimetil sulfóxido (DMSO) que es un agente potenciador de la reacción de PCR. Este compuesto actúa como un agente desnaturizante del DNA, permitiendo un mejor alineamiento de los iniciadores<sup>32</sup>.

Con estas modificaciones logramos generar patrones de amplificación de DNA para diferenciar distintos aislamientos de *M. tuberculosis*. Esto se puede ver claramente en la figura 6.3, donde se observan los patrones de amplificación de DNA para 12 subcultivos provenientes de 3 pacientes. Interesantemente, los patrones de amplificación de DNA para los subcultivos de un mismo paciente son iguales y para subcultivos de diferentes pacientes son distintos.

**Figura 6.3: Amplificación mediante RAPD-PCR de DNA proveniente de tres aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* usando iniciadores de 20 bases.**



**Fig. 6.3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE IX de los productos de amplificación de DNA de tres aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* con iniciadores de 20 bases. Carriles 1 y 16 marcador de peso molecular escalera de 123 pares de bases. Carriles 2 al 5 subcultivos del paciente 13. Carriles 6 al 10 subcultivos del paciente 12. Carriles 11 al 15 subcultivos del paciente 9. Secuencia de los iniciadores IS986-FP 5' ACG CTC AAC GCC AGA GAC CA; IS986-RP 5' AAT GAA CCA CCT GAC ATG AC.**

### 6.3 Coexistencia de dos cepas de *M. tuberculosis*.

Para poder determinar la coexistencia de dos o más cepas de *M. tuberculosis* en un mismo paciente con TB pulmonar, era necesario contar con técnicas adecuadas para poder aislar a diferentes cepas de *M. tuberculosis*. La técnica elegida para averiguar dicha coexistencia fue la de RAPD-PCR, por sus ventajas en la práctica.

Así, de cada paciente con TB pulmonar que entró al estudio se realizaron aislamientos de 4 colonias a partir de un solo primoaislamiento. La selección de las cuatro colonias fue al azar. Posteriormente se hizo una prueba fenotípica a los cuatro subcultivos de cada paciente. Dado que se disponía de un método de determinación de sensibilidad automatizado, se analizaron los perfiles de sensibilidad a 4 antituberculosos principales (estreptomina, isoniazida, rifampicina y etambutol). El método ocupa al sistema radiométrico BACTEC. De esta manera, mediante los perfiles de sensibilidad a antituberculosos, elaborados para los 52 subcultivos de *M. tuberculosis* provenientes de 13 pacientes, se determinó la coexistencia en un mismo paciente de dos poblaciones de micobacterias, una sensible a la isoniazida (INH) y otra resistente a dicho fármaco (población resistente 7d y población sensible 7a, 7b y 7c, tabla 5.1). Esta diferencia a nivel fenotípico se analizó con un estudio a nivel de DNA. Para esto se utilizó el ensayo de amplificación de DNA por RAPD-PCR ya estandarizado.

Sin embargo, al analizar los patrones de amplificación de DNA de todos los subcultivos, se encontró que dichos patrones eran iguales entre los subcultivos provenientes de un mismo paciente. Incluso, los patrones de DNA fueron idénticos en los subcultivos 7a y 7b, 7c y 7d, los cuales habían presentado diferencias en los patrones de resistencia a INH (figura 5.1). Con el ensayo de RAPD-PCR, sin embargo se pudieron diferenciar las cepas de *M. tuberculosis*

aisladas de distintos pacientes. Por lo tanto era de esperarse que los subcultivos 7d y 7a, 7b y 7c presentaran distintos perfiles de sensibilidad si hubiesen tenido como origen dos infecciones con dos cepas distintas de *M. tuberculosis*.

Cabe la posibilidad de que los subcultivos 7a, 7b y 7c al presentar una mutación espontánea haya dada origen al subcultivo 7d. Esto es posible en parte porque, como ya se mencionó, una cepa al cambiar de sensible a resistente no presenta una diferencia en los patrones de DNA antes y después de la transformación. Esto se debe parcialmente, a que los cambios en la resistencia a INH provienen en algunos casos, de mutaciones puntuales en algunos genes de *M. tuberculosis* como son el gen *katG*<sup>52,53</sup> y el gen *mha*<sup>1,4</sup>, y que la tasa de mutantes naturales a INH sea muy alta en comparación de otros antifímicos<sup>53</sup>, como se mencionó previamente en la introducción. Por lo tanto, es probable que la presencia de dos cepas con distinto perfil de sensibilidad en un mismo paciente no se deban a una reinfección por una segunda cepa de *M. tuberculosis*.

De manera interesante, los resultados de la amplificación por RAPD-PCR del DNA genómico, indican que todos los subcultivos presentaron una banda de 196 pares de bases. Esta banda podría representar un probable marcador genético en *M. tuberculosis*. Este hallazgo implica varios puntos importantes. Primero, en estudios de brotes causados por micobacterias este ensayo podría identificar si dichas micobacterias pertenecen al grupo de *M. tuberculosis* y, además, permitiría definir patrones de DNA útiles para el seguimiento del brote. Si esta banda representa a un marcador específico de *M. tuberculosis* puede utilizarse como sonda para ensayos de RFLP. Se ha observado que el marcador más utilizado para diferenciar cepas de

*M. tuberculosis* IS6110 no siempre es útil para diferenciar aislamientos de *M. tuberculosis* que no tienen relación epidemiológica <sup>42</sup>. Para corroborar esta hipótesis, es necesario realizar análisis de RAPD-PCR a un mayor número de cepas de *M. tuberculosis*, así como a varias cepas del género *Mycobacterium* diferentes a *M. tuberculosis*.

## 7. CONCLUSIONES.

Aunque el análisis del perfil de sensibilidad en 52 subcultivos de *M. tuberculosis* obtenidos a partir de 13 pacientes con tuberculosis pulmonar mostró subcultivos con distintos patrones de sensibilidad en un mismo paciente, el análisis por RAPD - PCR demostró que tal diferencia fenotípica no es observable genotípicamente usando este último método.

El cambio de resistencia observado en el subcultivo de un paciente, probablemente se haya debido a cambios mutacionales puntuales, lo cual ya ha sido anotado por otros autores. Por lo que se piensa que la presencia de dos subcultivos de *M. tuberculosis* se debe a una mutación natural por parte del aislamiento sensible que haya generado al aislamiento resistente. Por lo que se descarta una reinfección en el paciente del cual se aislaron dichos subcultivos.

El análisis por grupos de los patrones de bandas de amplificación por PCR de DNA de 13 aislamientos de *M. tuberculosis* mostró una gran diversidad entre estas cepas, ya que considerando un nivel de homología mayor del 80%, sólo se formaron 3 grupos principales. Esta gran diversidad genotípica en los aislamientos estudiados implica, una gran plasticidad genética en los aislamientos mexicanos de *M. tuberculosis*, aunque necesariamente se requiere un mayor número de aislamientos para establecer esta conclusión.

Se encontró una banda de amplificación de DNA con una movilidad relativa de 196 pares de bases en todos los subcultivos analizados. Dicha banda de amplificación podría utilizarse como un marcador molecular específico de *M. tuberculosis*.



## 8. APENDICE.

### A: Preparación de soluciones.

- Hidróxido de sodio al 4% (NaOH 4%).

Pesar 40 g de NaOH y disolverlos en 1000 mL de H<sub>2</sub>O desionizada estéril. Almacenar a temperatura ambiente en recipiente de plástico por no más de 6 meses.

- Fenol al 5%.

Pesar 5 g de fenol y disolverlos en 100 mL de H<sub>2</sub>O desionizada estéril. Almacenar a temperatura ambiente en un recipiente frasco de vidrio ámbar por no más de 4 meses. Preparar la solución en una campana y usar guantes y goggles, debido a que la aspiración de sus vapores y su contacto con la piel son tóxicos.

- Amortiguador PBS pH 7.4.

Pesar 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Disolver lo anterior en 800 mL de H<sub>2</sub>O desionizada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Aforar a 1 litro con H<sub>2</sub>O desionizada. Alicuotar la solución y esterilizarla en autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

- Etanol al 75 %.

Medir 75 mL de etanol absoluto. Agregar 25 mL de H<sub>2</sub>O desionizada estéril. Almacenar a temperatura ambiente.

- Iniciadores 50 µM.

Disolver el liofilizado con H<sub>2</sub>O desionizada estéril. Alicuotar en tubos Ependorf de 500 µL, en volúmenes de 50 µL cada uno. Almacenar las alícuotas a -20° C.

- Amortiguador de PCR 10X.

100 mM Tris-HCl pH 8.3

500 mM KCl

0.01% (w/v) gelatina

Disolver los reactivos con H<sub>2</sub>O desionizada estéril. Esterilizar por filtración usando una membrana con poro de 0.2 µm de diámetro. Almacenar las alícuotas a -20° C.

- MgCl<sub>2</sub> 40 mM.

Solución patrón 100 mM. Disolver 2.033 g de MgCl<sub>2</sub>•H<sub>2</sub>O en 80 mL de H<sub>2</sub>O desionizada.

Aforar a 100 mL con H<sub>2</sub>O desionizada. Esterilizar por filtración.

MgCl<sub>2</sub> 40 mM. Medir 4 volúmenes de MgCl<sub>2</sub> 40 mM y añadirles 6 volúmenes de H<sub>2</sub>O desionizada. Esterilizar por filtración. Almacenar a temperatura ambiente.

- Amortiguador TAE 1X.

Pesar 242 g de Tris base. Disolver en 600 mL de H<sub>2</sub>O desionizada. Añadir 57.1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0). Mezclar bien lo anterior. Aforar a 1 litro con H<sub>2</sub>O desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

- Amortiguador de carga 6X.

Pesar 25 mg de azul de bromofenol y disolverlos en 7 mL de H<sub>2</sub>O desionizada. Añadir 3 mL de glicerol y volver a disolver. Guardar en alícuotas de 1 mL a 4.0° C.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Banerjee, A., Dubnau F., Quemard A., Balasubramanian V., Um K. S., Wilson T., de Lisle G., Jacobs W. R. Jr. 1994. *mha*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 263:227-230.
2. Beck-Sagué, C., Dooley, S. W., Hutton, M. D., Otten, J., Breeden, A., Crawford, J. T., Pitchenik, A. E., Woodley, C., Cauthen, G., y Jarvis, W. R. 1992. Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. *JAMA*. 268:1280-1286.
3. Cave, M. D., Eisenach, K. D., McDermott, P. F., Bates, J. H., y Crawford, J. T. 1991. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol. Cell. Probes*. 5:73-80.
4. Cole S. T. 1994. *Mycobacterium tuberculosis*: drug-resistance mechanisms. *Trends Microbiol.* 2:411-415.
5. Crawford, J., y Bates, H. J. 1984. Phage typing of mycobacteria, pp. 123-132. En: Kubika, G. P., y Wayne, L. G. The mycobacteria: a sourcebook. Parte A. Marcel Dekker, Inc., New York..
6. Daley, C. L., Small, P. M., Schechter, G. F., Schoolnik, G. K., McAdam, R. A., Jacobs, W. R. Jr, y Hopwell, P. C. 1992. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus: an analysis using restriction fragment length polymorphisms. *N. Engl. J. Med.* 326:231-235.
7. Dooley, S. W., Villarino, M. E., Lawrence, et al. 1992. Nosocomial transmission of tuberculosis in a hospital unit for HIV-infected patients. *JAMA*. 267:2632-2634.

ESTO TIENE QUE SER  
SACA DE LA BIBLIOTECA

8. Edlin, D. R., Tokars, J. Y., Grieco, M. H., Crawford, J. T., Williams, J., Sordillo E. M., Ong, K. R., Kilburn, J. O., Dooley, S. W., Castro, K. G., Jarvis, W. R., y Holmberg, S. D. 1992. An outbreak of multidrug resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 326:1514-1521.
9. Ellner, J.J., Hinman, A. R., Dooley, S. W., Fischl, M. A., Sepkowitz, K. A., Goldberger, M. J., Shinnick, T. M., Iseman, M. D., y Jacobs, W. R. Jr. 1993. Tuberculosis Symposium: Emerging Problems and Promise. *J. Infect. Dis.* 168:537-51.
- 10.Engel, H. W. B. 1978. Mycobacteriophage and phage typing. *Ann. Microbiol.* 129A:75-90.
- 11.Falkinham III, J. O., y Crawford, J. T. 1994. Plasmids. En Tuberculosis: Pathogenesis, Protection an Control. Editado por Bloom, B.R. American Society for Microbiology. USA.
- 12.Gill, P., Jeffreys, A. J., y Werrett, D. J. 1985. Forensic appliaction of DNA 'fingerprint'. *Nature* (London) 318:577-579.
- 13.Hernans, P. W. M., van Soolingen, D., Dale, J. W., Schuitema, A. R. J., McAdam, R. A., Catty, D., y van Embden, J. D. A. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 28:2051-2058.
- 14.Hermans, P. W., van Soolingen, D., Bik, E. M., de Haas, P. E. W., Dale, J. W., y van Embden, J. D. A. 1991. The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 59:2695-2705.
- 15.Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 1993. Tuberculosis. Boletín informativo. pp 115-116.

16. Kochi, A. 1991. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 72:1-6.
17. Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O., y Santos, J. I. 1994. Manual de Infectología Clínica. 14va. Edición. Méndez Editores. México. Cap. 17. Tuberculosis e Infecciones por Micobacterias Atípicas. pag 225-246.
18. Linton, C. J., Jalal, H., Leeming, J. P., y Millar, M. R. 1994. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 32:2169-2174.
19. Martinetti-Lucchini, G., y Altwegg, M. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by Polymerase Chain Reaction. En: Methods in DNA Amplification. Editores Rolfs A., Weber-Rolfs I. y Finckh U.
20. Mazurek, G.H., Cave, M. D., Eisenach, K. D., Wallace, R. J. Jr., Bates, J. H., y Crawford, J. T. 1991. Chromosomal DNA fingerprinting patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:2030-2033.
21. McAdam, R. A., Hermans, P. W. M., van Soolingen, D., Zainuddin, Z. F., Catty, D., van Embden, J. D. A., y Dale, J. W. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol. Microbiol.* 4:1607-1613.
22. Mendiola, M. V., Martín C., Otaí, I., y Gicquel, B. 1992. Analysis of regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Res. Microbiol.* 143:767-772.
23. Molecular Dynamics. Fragment Analysis. User's Guide. Version 1.1. 1994. Molecular Dynamics Inc. California, USA. pag. B-1 a B-3.

24. Murray, C.J.L., Styblo, K., y Riullon, A. 1990. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention, and cost. *Bull. Int. Union Tuberc.* 65:6-24.
25. Narain, J. P., Raviglione, M. C., Kochi, A. 1992. HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention. *Tuberc. Lung Dis.* 73:311-321.
26. Norusis M. J. SPSS for Windows: Professional Statistics, Release 6.0. 1993. SPSS Inc. Chicago, USA. Cap 3, Cluster Analysis. pag 83-110.
27. Onorato, I., McCombs, S., Morgan, M., McCray, E. 1993. HIV infection in patients attending tuberculosis clinics, United States, 1989-1992. Program Abstr. 33rd Intersci. Conf. *Antimicrob. Agents. Chemoter.*, abstr. 1363.
28. Otaï, I., Martin, C., Vincent-Lévy-Frébault, V., Thierry, D., y Gicquel, B. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:1252-1254.
29. Prère, M. F., Chandler, M., y Ofayet, O. 1990. Transposition in Shigella: isolation and analysis of IS911, a new member of the IS3 group of insertion sequences. *J. Bacteriol.* 172:4090-4099.
30. Rastogi, N., Ross, B. C., Dwyer, B., Goh, K. S., Clavel-Sérès, S., Jeantlis, V., y Cruaud, P. 1992. Emergence during unsuccessful chemotherapy of multidrug resistance in a strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:901-907.
31. Roberts, G. D., Koneman, E. W., y Kim, Y. K. *Mycobacterium*. Capítulo 34.. En: Manual of Clinical Microbiology. Editado por Balows, A. 5ª edición. 1991. American Society for Microbiology. Washington, D. C.

32. Rolfs, A., Schuller, Y., Finckh, U., y Weber-Rolfs, I. PCR: clinical diagnostics and research. 1992. Editorial Springer Verlag. Berlin, Alemania. Cap. I pp 1-21; cap VI pp 74-78.
33. Selwyn, P. A., Hartel, D., Lewis, Y. A. 1989. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug abusers with human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 320:545-550.
34. Siddiqi, S. H. 1989. BACTEC TB System, Product and procedure manual. Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems. Towson, Maryland, USA.
35. Small, P. M., Schafer, R. W., Hopewell, P. C., Singh, S. P., Murphy, M. J., Desmond, E., Sierra, M. F., y Schoolnik. 1993. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 328:1137-1144
36. Small, P. M., et al. 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *N. Engl. J. Med.* 330:1703-1709.
37. Small, P. M., y van Embden, J. D. A. 1994. Molecular epidemiology of tuberculosis. En *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection an Control*. Editado por Bloom, B.R. American Society for Microbiology. USA.
38. Snider, D. E., Raviglione, M., Kochi, A. 1994. Global burden of tuberculosis. En *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection an Control*. Editado por Bloom, B.R. American Society for Microbiology. USA.
39. Styblo, K. 1990. Overview and epidemiologic assessment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on control in developing countries. *Rev. Infect. Dis.* 11 (Supl. 2):S339-S346.

40. Thierry, D., Brisson-Noël, A., Vincent-Lévy-Frébault, V., Nguyen, S., Guesdon, J.L., y Gicquel, B. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Insertion Sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 28:2668-2673.
41. Thierry, D., Cave, M. D., Eisenach, K. D., Crawford, J. T., Bates, J. H., Gicquel, B., y Guesdon, J.L. 1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.* 18:188.
42. Torrea, G., Levee, G., Grimont, P., Martin, C., Chanteau, S., y Gicquel, B. 1995. Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. *J. Clin. Microbiol.* 33:1899-1904.
43. van Embden, J. D. A., Cave, M. D., Crawford, J. T., Dale, J. W., Eisenach, K. D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T. M., y Small, P. M. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31:406-409.
44. van Soolingen, D., Hermans, P. W. M., de Haas, P. E. W., Sol, D. R., y van Embden, J. D. A. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an Insertion Sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:2578-2586.
45. Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, y Zoller, M. Recombinant DNA 2da ed. 1992. Scientific American Books. New York, USA. Cap 6.
46. Welsh, J., y McClelland, M. Fingerprinting using arbitrarily primed PCR: application to genetic mapping, population biology, epidemiology, and detection of differentially expressed



- RNAs. En Mullis K. B., Ferré F., Gibbs R. A., editores. The Polymerase Chain Reaction. 1994. Birkhauser Boston.
47. World Health Organization. 1989. Childhood tuberculosis and BCG vaccine. En EPI Update Supplement. World Health Organization, Geneva.
48. World Health Organization. 1993. Global programme on AIDS. The HIV/AIDS pandemic: 1993 overview. WHO/EPA/CNPEVA/93.1.
49. Yeager, H., Lacy, J., Smith, L. R., y LeMaistre, C. A. 1967. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Am. Rev. Respir. Dis.* 95:998-1004.
50. Yu, K. y Pauls K. P. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Res.* 20:2606
51. Zainuddin, Z. F., y Dale, J. W. 1989. Polymorphic repetitive DNA sequences in *Mycobacterium tuberculosis* detected with gene probe from a *Mycobacterium fortuitum* plasmid. *J. Gen. Microbiol.* 135:2347-2355.
52. Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., y Cole, S. 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature (London)*. 358:591-593.
53. Zhang, Y., y Young, D. B. 1993. Molecular mechanisms of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol.* 3:109-113.