

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DERARROLLO INTEGRAL REGIONAL**

**Genotipificación y Perfil de Fármaco-Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* Aislados de Pacientes con Tuberculosis Pulmonar del
Municipio de Durango**

TESIS

**Tesis para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias en Biomedicina**

Presenta:

Yvain de los Angeles Salinas Delgado

Director Interno:

Dra. en C. Martha Guadalupe Sosa Macías

Director Externo:

Dr. en C. Gerardo Martínez Aguilar

Victoria de Durango, Dgo., Junio del 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 9:30 horas del día 9 del mes de Junio del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN DGO para examinar la tesis titulada:

"Genotipificación y perfil de fármaco-resistencia de Mycobacterium tuberculosis aislados de pacientes con tuberculosis pulmonar del Municipio de Durango."

Presentada por el alumno:
SALINAS
Apellido paterno

DELGADO
Apellido materno

YVAÍN DE LOS ÁNGELES
Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	0	4	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Martha Guadalupe Sosa Macías

Dr. Gerardo Martínez Aguilar

Dr. José Antonio Enciso Moreno

Dr. Ismael Antonio Lares Aser

Dr. Carlos Galaviz Hernández

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. JOSÉ BERNARDO PROAL NAJERA
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 19 de junio del 2009

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN en su sesión Unidad Durango Ordinaria No. 5 celebrada el día 12 del mes de Mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

SALINAS
Apellido paterno

DELGADO
Apellido materno

YVAÍN DE LOS ÁNGELES

Nombre (s)

Con registro:

A	0	8	0	0	4	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría en Ciencias en Biomedicina

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Genotipificación y Perfil de Fármaco-Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* Aislados de Pacientes con Tuberculosis Pulmonar del Municipio de Durango"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designa como Director de Tesis al C. Profesor:
Dr. Gerardo Martínez, Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

El Director de Tesis

Dr. Gerardo Martínez

Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías

El Aspirante

El Presidente del Colegio

Salinas Delgado Yvain de los Angeles

Dr. José B. Peral Najera



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día **9** del mes **JUNIO** del año **2010**, el (la) que suscribe **SALINAS DELGADO YVAÍN DE LOS ÁNGELES** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA** con número de registro **A080046**, adscrito a **CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **DRA. MARTHA GUADALUPE SOSA MACÍAS** y del **DR. GERARDO MARTÍNEZ AGUILAR** y cede los derechos del trabajo intitulado **GENOTIPIFICACIÓN Y PERFIL DE FÁRMACO-RESISTENCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* AISLADOS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR DEL MUNICIPIO DE DURANGO**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **ivainsalinas@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Yvaín de los A. Salinas D.
YVAÍN DE LOS ÁNGELES SALINAS DELGADO
Nombre y firma

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO ESTATAL DE
SALUD PÚBLICA DE DURANGO, EN LA UNIDAD DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL GENERAL DE ZONA #
1 DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, EN LA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA DEL INSTITUTO MEXICANO
DEL SEGURO SOCIAL DE ZACATECAS Y EN EL CENTRO
INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO
INTEGRAL REGIONAL DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD DURANGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. EN C.
MARTHA GUADALUPE SOSA MACÍAS Y EL DR. GERARDO
MARTÍNEZ AGUILAR CON ASESORÍA DEL DR. EN C. JOSE
ANTONIO ENCISO MORENO, DR. EN C. ISMAEL ALFREDO LARES
ASSEFF Y EL MVZ, PhD. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ
VELÁZQUEZ**

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a Dios por otorgarme todas sus bendiciones para poder terminar con una gran satisfacción este proyecto...., por haber puesto en mi camino a las personas que han creído en mí... las cuales sé que siempre me ofrecerán todo su apoyo y confianza.

A toda mi familia por todo su gran amor y apoyo incondicional....

Especialmente a mis padres: José Armando Salinas Espinoza y Ma. De Gpe. Delgado

Pacheco

A mis grandes amigos y Maestros

A todos Muchas Gracias!!..

Contenido

GLOSARIO.....	iii
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.....	vi
RELACIÓN DE CUADROS.....	vii
RELACIÓN DE FIGURAS.....	viii
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.2. TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS.....	7
2.3. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
2.4. PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS EN MÉXICO.....	12
2.5. GRUPOS DE ALTO RIESGO PARA ADQUIRIR Y DESARROLLAR TUBERCULOSIS.....	13
2.6. PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS.....	14
2.7. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.....	17
2.8. CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS.....	18
2.9. MÉTODOS MOLECULARES DE TIPIFICACIÓN DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
2.10. TUBERCULOSIS DROGORRESISTENTE EN MÉXICO.....	26
III. JUSTIFICACIÓN.....	31
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	31
V. OBJETIVO.....	31
5.1 Objetivo General.....	31
5.1.1 Objetivos Específicos.....	31
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
6.1. Diseño metodológico.....	32
6.2. Tamaño de muestra.....	32
6.3. Criterios de selección.....	32
6.3.1. Criterios de inclusión.....	32

6.3.2. Criterios de exclusión.	32
6.3.3. Criterios de eliminación.	32
6.4. Universo de estudio.	32
6.4.1. Universo muestral.	33
6.5. Variables.	33
6.5.1. Variables intervinientes.	33
6.6. Características clínicas y demográficas.	33
6.7. Recolección de Muestras.....	34
6.7.1. Baciloscopias.	34
6.8. Descontaminación de muestras de expectoración.	34
6.8.1 Cultivo.	34
6.8.2. Extracción de ADN genómico.....	35
6.8.3. Cuantificación de DNA genómico.	35
6.9. Métodos de genotipificación.	35
6.9.1. “ <i>Spoligotyping</i> ”.	35
6.9.2. MIRU-VNTR.....	36
6.10. Determinación de Drogorresistencia.	37
6.10.1. Método BACTEC TB-460 (Becton Dickinson)	37
VII. RESULTADOS.	39
VIII. DISCUSIÓN.....	48
IX. CONCLUSIONES.....	52
X. SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS POSTERIORES.	53
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	54

GLOSARIO.

Absceso. Inflamación del tejido del organismo caracterizado por la hinchazón y la acumulación de pus.

ADN (ácido desoxirribonucleico). Molécula que codifica los genes que forman la estructura y función de los organismos vivos y permiten la transmisión de información genética de una generación a otra.

ADN genómico. Secuencia de ADN cromosómico de un gen o un segmento génico, que incluye la secuencia de ADN de regiones codificadoras y no codificadoras.

ADN minisatélite. Secuencia de ADN de hasta 60 pares de bases.

ADN polimerasa. Enzima que sintetiza una nueva cadena de ADN usando como molde una cadena de ADN previamente sintetizada.

Aislado. Cultivo puro de un organismo.

Ambispectivo. Estudio retrospectivo y prospectivo.

Amplificación. Se refiere a la producción exponencial de copias adicionales de una secuencia de ADN por reacción enzimática.

Antifímico. Medicamento usado contra de la tuberculosis.

Antimicrobiano. Sustancia o molécula que inhibe el desarrollo de microorganismos.

ARN (ácido ribonucleico). Ácido nucleico formado a partir de un modelo de ADN, que contiene ribosa, en lugar de desoxirribosa.

Bacilífero. Cuando la microscopía directa de una muestra de expectoración espontánea o inducida arroja resultados positivos.

Cepa. Es la progenie y el subcultivo de una colonia única aislada en un cultivo puro.

Electroforesis. Técnica para la separación de moléculas basada en su migración en un gel u otro medio sujeto a un campo eléctrico.

Enzimas de restricción. Enzima que reconoce secuencias específicas de ADN. Estas enzimas cortan el ADN algunas veces en el sitio blanco y otras veces en regiones cercanas al mismo.

Factores de riesgo. Son aquellos que están asociados con un riesgo aumentado de contraer una enfermedad.

Fenotipo. Características bioquímicas, fisiológicas y morfológicas de un individuo, determinadas por su genotipo y el ambiente en el que se expresa. Expresión de algún gen o genes determinados.

Genotipificación. Análisis del polimorfismo genético de un organismo útil en su caracterización y clasificación.

Hacinamiento. Hogares en los que habitan más de 3 personas por cuarto.

Hibridación *in situ*. Es una técnica para determinar la localización de una secuencia específica de ARN dentro de un tejido o célula por una sonda de una sola cadena de ácido nucleico complementarias de doble hebra.

Hibridación Fase Reversa. Método que utiliza sondas de oligonucleótidos inmovilizadas dentro de un soporte sólido y la hibridación subsecuente de ADN amplificado y marcado con algún compuesto como biotina o digoxigenina.

Iniciadores “Primers”. Corto segmento de ácidos nucleicos que se unen a una hebra de ADN complementaria y permiten que comience la síntesis de una nueva cadena de ADN. Iniciadores de ARN se usan en las células e iniciadores de ADN en la reacción de PCR.

Inmunodeficiencia. Estado anormal del sistema inmunitario por el cual la inmunidad es inadecuada y disminuye la resistencia a las infecciones.

Locus. Posición de un gen en un cromosoma (plural loci).

Nucleótido. Molécula compuesta de una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y un grupo fosfato.

Oligonucleótido. Molécula corta de ADN (habitualmente de 8 a 50 pares de bases) sintetizada para utilizarse como sonda o iniciador.

Reacción en cadena de la polimerasa. Técnica en la cual, los ciclos de desnaturalización, alineación y extensión con ADN polimerasa, son usados para amplificar exponencialmente un número de copias de una secuencia de ADN blanco usando iniciadores específicos a un gen determinado.

Resistencia. Fenómeno por el cual ciertos organismos que eran especialmente sensibles a determinadas sustancia químicas ya no lo son.

Secuencia de Inserción. Es la secuencia de ADN bacteriano que lleva solo el gen necesario para su transposición.

Tuberculosis Extrapulmonar. Diseminación de bacilos de la tuberculosis de lesiones pulmonares a través de el torrente sanguíneo, con lo cual la infección puede abarcar cualquier órgano o sistema.

Tuberculosis multidrogorresistente. Resistencia al menos a isoniacida y rifampicina, además de todas las fluoroquinolonas (Ofx, Cpx, Lfx, Mfx, Rfx, Gfx) más uno de los 3 inyectables (capreomicina, kanamicina, aminacina).

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.

°C	Grados Centígrados
BAAR	Bacilo Ácido Alcohol Resistente
DR	Repetición Directa
DT2	Diabetes Tipo 2
IS6110	Elemento de Inserción IS-6110
Kb	Kilobases
L-J	Löwenstein Jensen
MDR	Multidrogorresistente
min	Minutos
MIRU	Unidad Repetida Interespaciada de Mycobacterium
ml	Mililitros
M	Molar
mM	Milimolar
Mpm	Marcador de Peso Molecular
µm	Micrómetros
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
TB	Tuberculosis
TBL	Tuberculosis Latente
TBPA	Tuberculosis Pulmonar Activa
TBP	Tuberculosis Pulmonar
VNTR	Repetición en Tándem de Número Variable
XDR	Extremadamente drogo-resistente
ZN	Ziehl-Neelsen

RELACIÓN DE CUADROS.

Cuadro 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes con tuberculosis de los cuales fueron obtenidos los aislados de este estudio	39
Cuadro 2. Código SpolDB4 ó SIT de aislados de MTB.	42
Cuadro 3. Número de copias de MIRU-VNTR por aislado.....	42
Cuadro 4. Perfiles de drogo-resistencia por el método BACTEC TB-460 en aislados de MTB.	46

RELACIÓN DE FIGURAS.

Figura 1. Diagnóstico de la tuberculosis en la antigüedad.....	4
Figura 2. Representaciones esquemáticas de los bacilos tuberculosos mostrando sus formas y organización de la pared de la micobacteria.	6
Figura 3. Transmisión de la tuberculosis desde un paciente con TBP.....	7
Figura 4. Balance entre la invasión de la micobacteria y la respuesta inmunitaria del hospedador.....	11
Figura 5. Reporte de número de casos de TB en distintos Estados de la República Mexicana en el año 2008.....	12
Figura 6. Nuevos casos de Tuberculosis a nivel mundial en el año 2007. Control Global de tuberculosis: Organización mundial de la salud 2009.....	16
Figura 7. Vista microscópica de bacilos Ácido Alcohol Resistentes en Tinción Ziehl-Neelsen.....	17
Figura 8. Colonias de <i>M. tuberculosis</i> en medio sólido Löwenstein-Jensen.....	20
Figura 9. Método de tipificación RFLP-IS6110.....	22
Figura 10. Método de tipificación MIRU-VNTR.....	23
Figura 11. Método de tipificación “ <i>Spoligotyping</i> ”.....	25
Figura 12. Casos de resistencia a fármacos (TB-MDR Y XDR) en México 2002-2007.....	27
Figura 13. Tuberculosis multidrogorresistente en estados de México durante el período.....	28
Figura 14. Esquema de tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES).....	29
Figura 15. Fórmula para determinar el número de copias de cada MIRU por aislado de MTB y dirección electrónica donde es posible comparar aislados a nivel mundial.	37
Figura 16. Proceso de muestras de expectoración en el laboratorio.....	38
Figura 17. Análisis de Dendrograma de “ <i>Spoligotyping</i> ”.....	41
Figura 18. Análisis de Dendrograma por el método MIRU-VNTR.....	44
Figura 20. Ubicación de casos de tuberculosis en la capital y en el estado de Durango.....	47

RESUMEN.

Introducción: *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infecta un tercio de la población mundial, un 10% de estos desarrollaran tuberculosis activa y 2 millones de personas mueren cada año. Los estudios epidemiológicos sobre tuberculosis tienen un mayor impacto cuando se complementan con las técnicas moleculares de genotipificación.

Objetivos general: Determinar los genotipos y fenotipos de drogo-resistencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis pulmonar del municipio de Durango.

Material y Métodos: Se realizó un estudio transversal ambispectivo. Se aislaron 23 cepas de MTB obtenidas en los años 2007 a 2009. Se obtuvo información sobre variables demográficas y clínicas de los pacientes. Los aislados fueron genotipificados por el método de “*Spoligotyping*” y por MIRU-VNTR. Los resultados obtenidos se analizaron en la base de datos www.miru-vntrplus.org y SpolDB4 www.pasteur-guadeloupe.fr. Para determinar el perfil de drogo-resistencia a drogas de primera línea isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomycin y pirazinamida se utilizó el método BACTEC TB-460.

Resultados: Se identificaron 11 cepas con patrones únicos con el método de “*Spoligotyping*” y 12 aislados agrupados en 4 clusters. Por MIRU-VNTR se identificaron 2 cadenas de transmisión de MTB y un caso de zoonosis por *M. caprae*. Tres aislados de MTB presentaron multidrogorresistencia

Conclusiones: Se identificaron 2 cadenas de transmisión por MTB, el primer caso de tuberculosis pulmonar por *M. caprae* en el país y tres aislados con multidrogorresistencia.

Palabras claves: Tuberculosis, Genotipificación, “*Spoligotyping*”, MIRU-VNTR, *Mycobacterium tuberculosis*, Epidemiología.

ABSTRACT.

Background: A third of the world population is infected by *Mycobacterium tuberculosis* and the 10% of those will develop active tuberculosis. Two millions of people die each year by tuberculosis. Molecular epidemiology is a essential to used in the control of TB that combines traditional epidemiological studies and molecular genotyping techniques.

Objectives: To determine the genotypes and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Durango, México.

Material and Methods: Cross-sectional ambispective study. Twenty three strains of *Mycobacterium tuberculosis* were isolated from 2007 to 2009. Demographic and clinical variables of patients were collected. Isolates were genotyped by "Spoligotyping" and MIRU-VNTR methods. The results were analyzed using the www.miru-vntrplus.org, and SpolDB4 www.pasteur-guadeloupe.fr data bases. The drugs resistance profile to first line drugs isoniazid, rifampin, ethambutol, streptomycin and pyrazinamide was determined by the BACTEC TB-460 assay.

Results: Eleven strains had individual patterns by "Spoligotyping" and 12 isolates were integrated into four clusters. By using MIRU-VNTR it was possible to show two transmission chains of *M. tuberculosis*. One case of zoonotic disease by *M. caprae* were documented. Three isolates presented multidrug-resistance.

Conclusions: We identified two transmission chains of *M tuberculosis*, the first case of pulmonary tuberculosis by *M. caprae* in the country and three isolates with multidrug resistance.

Key words: Tuberculosis, Genotyping, "Spoligotyping", MIRU-VNTR, *Mycobacterium tuberculosis*, Epidemiology.

I. INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por especies del género *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis*. Esta enfermedad es considerada como un problema de salud pública. La infección se transmite principalmente a través de secreciones respiratorias expulsadas por la persona enferma cuando tose, habla, estornuda o puede ocurrir también por el consumo de alimentos contaminados. *Mycobacterium tuberculosis* habitualmente se adquiere en etapas tempranas de la vida, condicionando a una infección aguda frecuentemente asintomática con desarrollo de inmunidad, formación de granuloma y calcificación. Se calcula que un tercio de la población mundial está infectada por MTB. El 90% de estos individuos desarrollarán tuberculosis latente (TBL). Aproximadamente de un 5 a 10% (200 millones en el mundo) de estos individuos progresarán a tuberculosis activa en alguna etapa de su vida. La presencia de VIH/SIDA, Diabetes tipo 2 y enfermedades crónicas pulmonares son factores de riesgo para el desarrollo de TB. La desnutrición, hacinamiento, abuso de alcohol, tabaco y drogas aceleran la progresión de TBL a tuberculosis pulmonar activa (TBPA).

El panorama epidemiológico de la tuberculosis en México es tan preocupante como en el resto de los países en desarrollo. La organización mundial de la salud (OMS) estima que la tasa actual es de 50/100 000 habitantes. En algunas regiones del país, como en el caso de Durango, la carencia de infraestructura de laboratorios, fallas en la detección primaria de los casos de tuberculosis y estudios formales de contactos, impide tener datos confiables de la situación real del problema. En el estado de Durango en el año 2007 se notificaron oficialmente 227 casos de tuberculosis y en el 2008, 213 casos con una tasa de 13.57/100 000 habitantes. En el año 2007, se notificaron 71 casos de tuberculosis pulmonar con una tasa de 13/100 000 habitantes, en el año 2008, 54 casos de TBP con una tasa de 10.3/100 000 habitantes.

En Durango al igual que el resto del país, el control de la tuberculosis constituye un reto enorme para los sistemas de salud, debido a: fallas en el diagnóstico, ineficiencia en la aplicación de las medidas de control de la transmisión, así como el incumplimiento del tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES), que

además condicionan la selección de cepas de MTB drogo-resistentes (MTB-MDR). En Durango no se sabe la prevalencia de infección por cepas resistentes.

Otro de los puntos clave para el control adecuado de la tuberculosis es la disponibilidad de un sistema de vigilancia epidemiológica eficiente que, además de contar con recursos humanos capacitados, tenga acceso a un laboratorio con capacidad para realizar pruebas de diagnóstico molecular, así como la tipificación de las clonas circulantes en la región, ya que esta información permite inferir si se trata de casos nuevos o de reactivación así como la circulación de clonas con mayor riesgo de diseminación.

Los estudios sobre la epidemiología de la tuberculosis tienen un mayor impacto si se apoyan en herramientas moleculares. Esta estrategia integra técnicas convencionales de seguimiento epidemiológico con las técnicas moleculares de diagnóstico y genotipificación. El uso de marcadores moleculares permite identificar determinantes de la distribución, transmisión y manifestaciones de la enfermedad, haciendo más eficiente la implementación de medidas de intervención y prevención. El análisis de los fragmentos de restricción de ADN genómico, usando el elemento de inserción IS-6110 (RFLP-IS6110), es el método estándar de oro para la genotipificación de aislados de MTB. Este método considera que los aislados de diferentes pacientes con un mismo patrón de RFLP-IS6110, están epidemiológicamente relacionados, mientras que los individuos con aislados de perfil genético único, son casos de reactivación sin conexión epidemiológica entre ellos. El método de RFLP-IS6110 ha servido para identificar y rastrear cepas MTB-MDR altamente transmisibles en humanos, así como para identificar contaminación en laboratorios. Sin embargo, la complejidad, el largo tiempo de ejecución y alto costo, ha hecho necesaria la búsqueda de métodos alternativos. Uno de ellos es denominado "*Spoligotyping*", el cual utiliza hibridación en fase reversa para analizar regiones interdispersas de repetición directa en el locus DR de *M. tuberculosis*. Esta técnica genera un agrupamiento de secuencias de 36 pb, con espaciadores de 35 a 41 pb que produce un registro polimórfico con base digital. El segundo método se basa en la amplificación por PCR de estructuras tipo minisatélite identificadas en *M. tuberculosis*. Cinco secuencias de este tipo, denominadas repeticiones agrupadas

de número variable (variable number tandem repeats o VNTR), han sido usadas para genotipificar *M. tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*. Para aumentar el poder discriminatorio de los VNTR se han incluido 12 loci, denominados MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units). En conjunto el método expresa la tipificación con un código numérico de 12 dígitos, resultando efectivo para discriminar transmisión, recaídas, reactivaciones y casos de contaminación cruzada. Desde el punto de vista metodológico, esta técnica tiene gran potencial para crear bases de datos a gran escala. Al combinar los tres métodos, se logra una discriminación absoluta entre aislados de MTB, pero dadas las dificultades técnicas, bajo nivel de reproducibilidad y consumo alto de recursos y tiempo para su realización, la técnica de RFLP está quedando en desuso en muchos laboratorios de referencia epidemiológica, incluyendo los del Centro para el Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) en Estados Unidos, sustituyendo la genotipificación de aislados de MTB, por una combinación de “*Spoligotyping*” y MIRUs-VNTRs, las cuales en conjunto presentan un valor de discriminación tan bueno como el RFLP. Es por eso que en este proyecto se emplearon las dos últimas metodologías para tener un mayor conocimiento del genotipo de las cepas circulantes y de su diseminación. Además, se determinó su perfil de drogo-resistencia. Esta información será de gran ayuda en la implementación de medidas de control.

II. ANTECEDENTES.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa producida principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) también *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti* pueden afectar a humanos¹. La infección se adquiere habitualmente en etapas tempranas de la vida, condicionando a una infección aguda frecuentemente asintomática con desarrollo² de inmunidad, formación de granuloma y calcificación, denominándose a esto tuberculosis latente (TBL). Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son variadas y dependen principalmente del sitio de la infección, siendo el más frecuente los pulmones (Figura 1). La TB ha acompañado al hombre por lo menos durante los últimos 5000 años, según revelan estudios realizados en momias egipcias, mesopotámicas, incas y de Asia central. Es probable que en esa época la enfermedad haya sido producida principalmente por *M. bovis* adquirido del ganado doméstico, debido a esto se presentó en comunidades nómadas y agrícolas. Durante la formación de los grandes asentamientos comunitarios (1000 años a de C.) se inició la transmisión de *M. tuberculosis*, según lo señalan las evidencias históricas, pero es en los siglos XVI y XVII durante la revolución industrial cuando la enfermedad se convirtió en un problema de Salud Pública, ya que en esa época se establecieron grandes concentraciones humanas alrededor de los centros de producción, que vivían en condiciones de pobreza extrema. En esta época (1650) se documentó la primera epidemia de TB, a la que se atribuyó al menos el 20% de todas las muertes en Inglaterra y Gales³. En ese momento se pensaba que la enfermedad era producida por vapores nocivos (miasmas) expedidos por la basura y aguas contaminadas⁴.

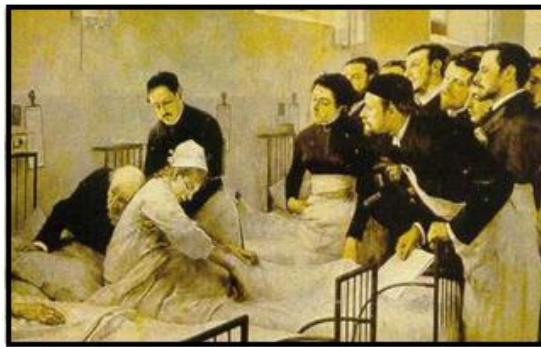


Figura 1. Diagnóstico de la tuberculosis en la antigüedad

Fuente: Manual del curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas de Caracas Venezuela

La poca atención que se le dio en testimonios escritos, hace pensar que la tuberculosis humana tuvo poca importancia en la antigüedad. Es posible que el primer agente causal haya sido *Mycobacterium bovis* o una variante, y que el hombre adquirió la enfermedad al consumir carne o leche de animales enfermos. Se cree que posteriormente *Mycobacterium tuberculosis* surgió como una mutante de *Mycobacterium bovis*⁵ sin embargo estudios filogenéticos recientes han demostrado que estas dos especies tiene un ancestro común pero son genéticamente distintas (Brosch, 2002).

Desde el siglo XVI Fracastoro hablo sobre de la transmisión y contagio de la enfermedad, pero fue hasta el periodo de 1785-1793, que médicos franceses e ingleses dieron gran importancia a las granulaciones y a los tubérculos que se transformaban en una masa purulenta hasta constituirse en grandes abscesos pulmonares.⁶ En 1865 Villemin demostró experimentalmente la contagiosidad y transmisibilidad de la TB mediante inoculación de acures y conejos de material proveniente de pulmones humanos con le enfermedad.⁶ En 1882 Roberto Koch identifica al bacilo tuberculoso hoy conocido como *M. tuberculosis*, y lo aísla en un medio de cultivo coagulado, a base de suero y papa, entrando esta patología en el listado creciente de enfermedades infectocontagiosas. El 24 de marzo de 1882, Robert Koch comunicó a la Sociedad de Fisiología de Berlín que, mediante coloración con derivados de anilina de material obtenido de lesiones humanas y también de bovino, había descubierto al bacilo que producía la tuberculosis.⁶ En 1902, Vallée y Carre notifican sus investigaciones sobre tuberculosis animal, especialmente bovinos animales que pudieran ser reservorios de agentes infecciosos e introducen la noción de que la tuberculosis pulmonar puede contraerse tanto por vía digestiva como por vía respiratoria.⁶

2.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *Mycobacterium tuberculosis*.

El *M. tuberculosis* es un bacilo aerobio estricto, inmóvil, de forma ligeramente curvada, ácido alcohol resistente, de crecimiento lento (ciclo de replicación de 16-18 h) con una longitud que oscila de 1 a 4 micras. Al microscopio los conglomerados bacilares adquieren una forma característica, descrita como "en cuentas de rosario". Se conoce ahora que las propiedades estructurales de la pared bacteriana hacen

que sea poco vulnerable a la acción de los agentes antimicrobianos y los mecanismos de defensa naturales del hospedero.

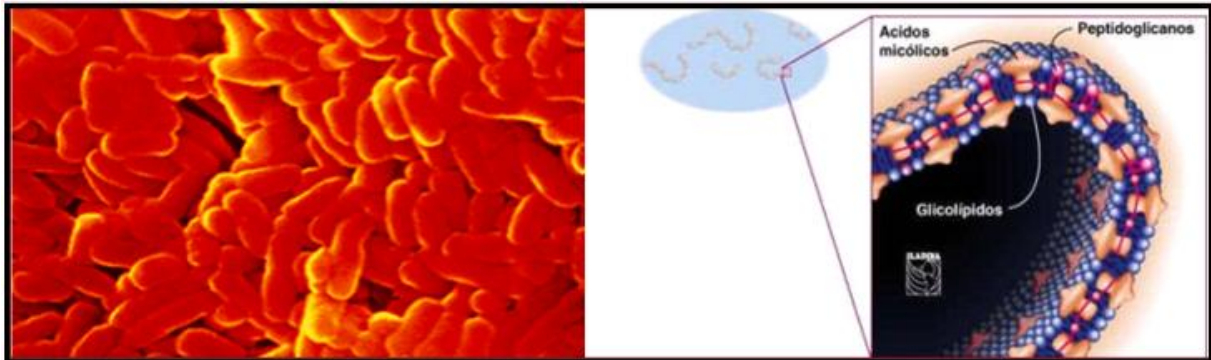


Figura 2. Representaciones esquemáticas de los bacilos tuberculosos mostrando sus formas y organización de la pared de la micobacteria.

Fuente: Manual del curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas de Caracas Venezuela

La constitución de la pared celular de *M. tuberculosis* es una de las más complejas entre los microorganismos conocidos. Es dos veces más gruesa y fuerte que la de los gérmenes gram negativos, por lo que se considera como una verdadera coraza lipídica, difícilmente penetrable, que otorga a la micobacteria su típica resistencia a la acción del alcohol y los ácidos. Los principales componentes de dicha pared son peptidoglicanos y ácidos micólicos (Figura 2), unidos entre sí por medio de enlaces covalentes, D-arabino-D-galactán. Además, posee un alto contenido de glicolípidos en particular α - α' -trehalosa dimicolato (TDM) y $\alpha\alpha'$ -trehalosa monomicolato (TMM) los cuales le confieren propiedades hidrófobas y de ácido-alcohol resistencia a la decoloración, característica que es utilizada para su identificación por la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN).^{7,8} La pared de las micobacterias se encuentra separada de la membrana celular por el espacio periplásmico.

Esta se puede subdividir en cuatro capas: la interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico, con cadenas cortas de alanina esta capa constituye el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. Externamente, hay otras 3 capas compuestas por polímeros de arabinosa y galactosa, otra por ácidos micólicos y por lipoarabinomana.

Para su crecimiento las micobacterias requieren de una concentración de CO₂ de 5 a 10% y ambiente húmedo que les permita sintetizar sus lípidos. La temperatura

óptima de crecimiento es de 35 a 37°C con un pH de 7. Un cultivo requiere de 2 a 4 semanas para desarrollarse completamente.

Este microorganismo es sensible al calor, rayos ultravioleta y al sol. La naturaleza hidrofóbica de su pared celular lo hace impermeable y por tanto resistente a muchos antibióticos.^{5,9}

2.2. TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS.

M. tuberculosis y otras micobacterias productoras de TB, se transmiten a partir de un paciente bacilífero con tuberculosis pulmonar (Figura 3) por medio de pequeñas gotas de secreciones respiratorias producidas al toser, estornudar o hablar. La tos puede generar hasta 3000 gotitas infecciosas, una persona que habla durante cinco minutos se asocia con igual cantidad de bacilos expulsados, mientras que los estornudos de enfermos producen una cantidad mucho mayor. Una vez en el exterior las gotas de secreción pierden una parte de su contenido acuoso por evaporación y dejan un núcleo de 1-5 μm de diámetro (gotitas de flügge) el cual es rico en bacilos.¹⁰ Estas pequeñas gotas infectantes pueden permanecer suspendidas en el aire y con viabilidad durante períodos prolongados y son tan pequeñas que entran fácilmente al pulmón hasta los alvéolos, lugar donde los bacilos se replican.¹¹ Por lo tanto, el aire de una habitación ocupada por una persona con TBP puede seguir siendo infeccioso aún cuando el paciente se ausente transitoriamente de ella.



Figura 3. Transmisión de la tuberculosis desde un paciente con TBP

FUENTE: <http://www.profesorviaweb.com/tag/tuberculosis>

La infección por el bacilo tuberculoso ocurre por la confluencia de factores exógenos tales como contacto con un paciente enfermo, el grado de proximidad con el mismo, duración del contacto y el ambiente donde se produce el contacto. En teoría, una sola gota infectante, conteniendo un bacilo tuberculoso es suficiente para producir la infección, pero en la práctica, se requiere una exposición prolongada y numerosas gotas infectantes para que se produzca el contagio. Esta afirmación se sustenta en estudios realizados en contactos donde se demostró que pacientes con TBP, cuya expectoración posee bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) visibles con el microscopio (más de 100 BAAR/ml de expectoración), son los principales transmisores de la infección y pueden infectar hasta un 50% de sus contactos. Por el contrario, los pacientes con baciloscopía negativa, a pesar de cultivo positivo pueden transmitir la micobacteria a aproximadamente un 5% de sus contactos. Actualmente se considera que cada paciente bacilífero puede en un año transmitir el agente causal a aproximadamente 20 contactos⁶. El hacinamiento es uno de los factores más importantes en la transmisión de los bacilos. Se calcula que aproximadamente el 27% de los contactos que cohabitan con pacientes bacilíferos contraen la infección. Sin embargo, en ambientes cerrados se reportan índices mayores. Las enfermedades que producen alteración de la inmunidad celular como: silicosis, linfoma, leucemia, otros tipos de cáncer hemofilia, insuficiencia renal crónica, diabetes y VIH/SIDA favorecen el desarrollo de la TBPA. La TBP no tratada suele ser mortal, cerca de un tercio de los pacientes muere durante el primer año después del diagnóstico y la mitad durante los cinco primeros años.

Debido a que el agente causal penetra al organismo casi de forma exclusiva por la vía respiratoria, la TB se localiza generalmente en los pulmones hasta en un 70% de los pacientes con tuberculosis activa.¹² Sin embargo, en una proporción variable, dependiendo de factores predisponentes, se puede producir una diseminación hematogena, que darán lugar a TB en cualquier otro órgano denominándose como tuberculosis extrapulmonar. Las localizaciones extrapulmonares más frecuentes son: ganglios linfáticos, pleura, sistema genitourinario, sistema osteoarticular, meninges y peritoneo. Otras formas menos frecuentes son la otitis tuberculosa, abdominal

(asociada a adenopatías abdominales caseosas), genital (con el subsecuente riesgo de esterilidad), renal y pericarditis tuberculosa.

2.3. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN POR *Mycobacterium tuberculosis*.

La tuberculosis constituye un paradigma de la interacción entre un agente exógeno y la respuesta inmunitaria del huésped. La infección por *M. tuberculosis* generalmente es por vía aérea. De esta manera, el bacilo es fagocitado por los macrófagos alveolares en el sitio de la implantación; en un lapso de pocos días, el bacilo se multiplica intracelularmente, puede alcanzar las vías linfáticas y sanguíneas para diseminarse a otros tejidos. En un 30% de los casos los macrófagos son incapaces de destruir a las micobacterias, ya que no impiden la unión fago-lisosoma y continúan creciendo en el interior de los fagosomas, favoreciendo la progresión de la enfermedad. Cuando el macrófago muere el bacilo es liberado e ingerido por otro macrófago, este proceso continúa y forma una lesión primaria, la cual puede ser identificada después como una calcificación. Histopatológicamente, en el foco de infección se genera un granuloma, que se caracteriza por la presencia de tejido necrótico intragranulomatoso y que con la adquisición de la inmunidad se completa su organización. Con la aparición de la inmunidad, los macrófagos infectados se tornan más activos destruyendo la mayoría de los bacilos y los restantes pasan a un estado estacionario, estableciendo la fase latente de la infección. En la medida que los macrófagos drenan el tejido necrótico, los bacilos latentes pueden pasar al espacio alveolar donde pueden reactivar su crecimiento. De esta manera se mantiene la infección durante años. Clínicamente, la infección tuberculosa latente no genera síntomas. Su diagnóstico se basa en el test cutáneo de Mantoux o prueba de PPD (Protein Purific Derived). Los individuos con TBL no pueden transmitir la infección. Sin embargo, en un 10% de los casos, la supresión del crecimiento bacilar se pierde, reanudándose el crecimiento y bajo ciertos factores inmunosupresores se pasa a una fase activa de la infección⁶.

Existen dos tipos de infección secundaria: la primera resulta de la re-infección, de un paciente con TBL por una nueva micobacteria. La segunda forma denominada de reactivación, es causada por bacilos tuberculosos que sobreviven a la lesión primaria

(Figura 4). La reactivación generalmente se inicia en el vértice pulmonar, sitio donde la tensión de oxígeno es mayor. La tuberculosis de reactivación se caracteriza por lesiones crónicas en el tejido, formación de granulomas, calcificación y fibrosis.¹³

El 70% de las personas con exposición a un caso bacilífero se mantienen sin infección, mostrando la importancia de la respuesta inmune innata para el control de la tuberculosis, el 30% restante quedan infectadas, estimándose que el 90% de estos individuos presentarán tuberculosis latente (TBL) durante toda su vida sin mostrar síntomas clínicos, pero presentando bacilos vivos en lesiones granulomatosas de pulmón y en nódulos linfáticos. Desde el punto de vista de salud pública, la OMS estima que una tercera parte de la población mundial es portadora de *M. tuberculosis*, y que un 10% (aproximadamente 200 millones) tiene riesgo de desarrollar tuberculosis pulmonar activa, un 5% en progresión lenta y el 5% restante en progresión rápida. Se estima que globalmente entre 8 y 10 millones de personas desarrollan TBP cada año. En los países en vías de desarrollo la TB es responsable de 3 millones de muertes anuales.^{14,15}

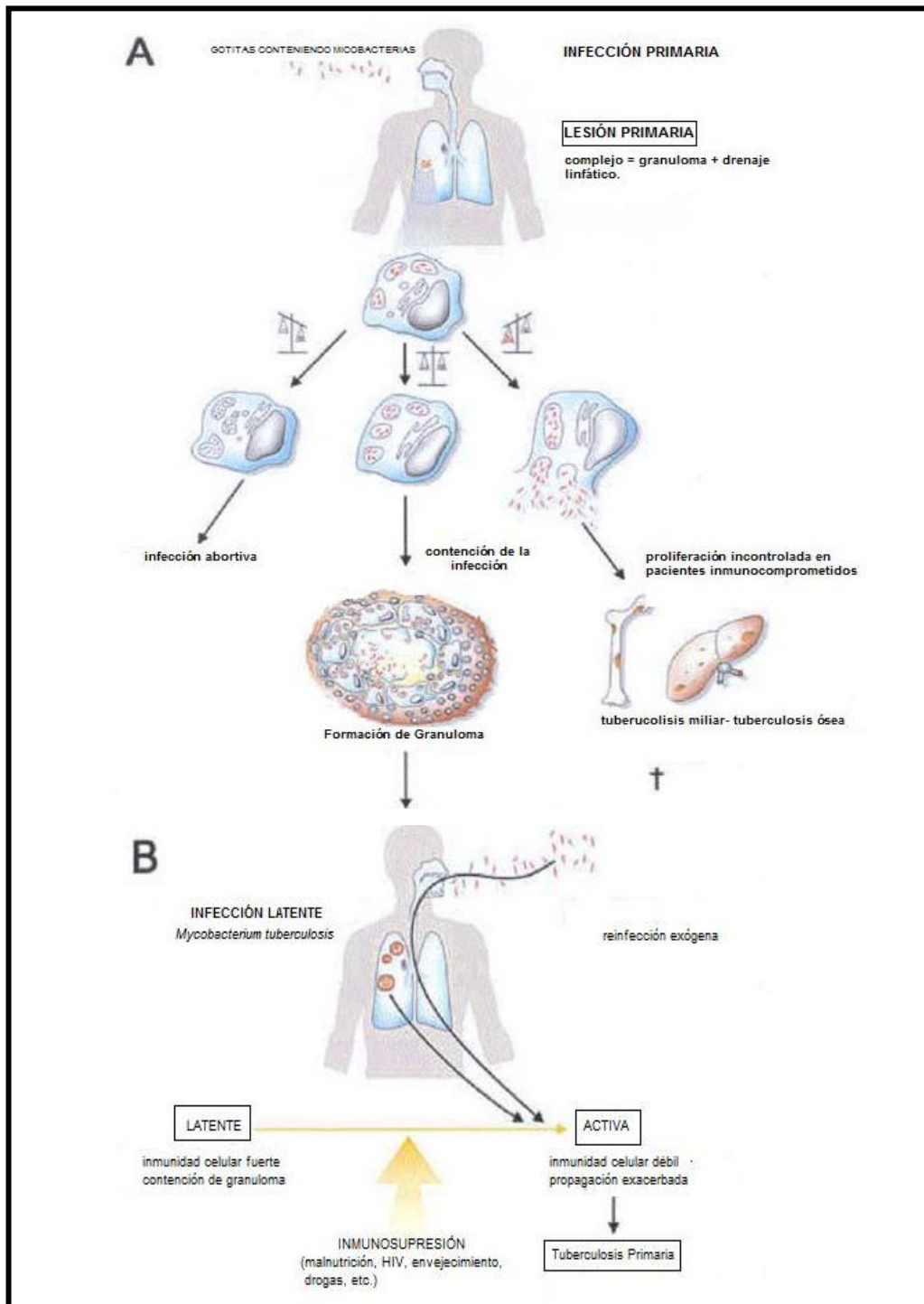


Figura 4. Balance entre la invasión de la micobacteria y la respuesta inmunitaria del hospedador

Fuente: Manual del curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas de Caracas Venezuela

2.4. PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS EN MÉXICO.

En México la TB ocupa el lugar número 17 entre las causas de muerte y el segundo de muerte provocada por un solo agente infeccioso.¹⁶ En el año 2006 la OMS reportó en México una tasa de 50/100 000 habitantes.¹⁶ En el año 2007 se reportaron 17, 243 nuevos casos de TB en todas sus formas con la siguiente distribución: 84% pulmonar, 1% meníngea, 5% ganglionar y 10% en otras formas.¹⁷

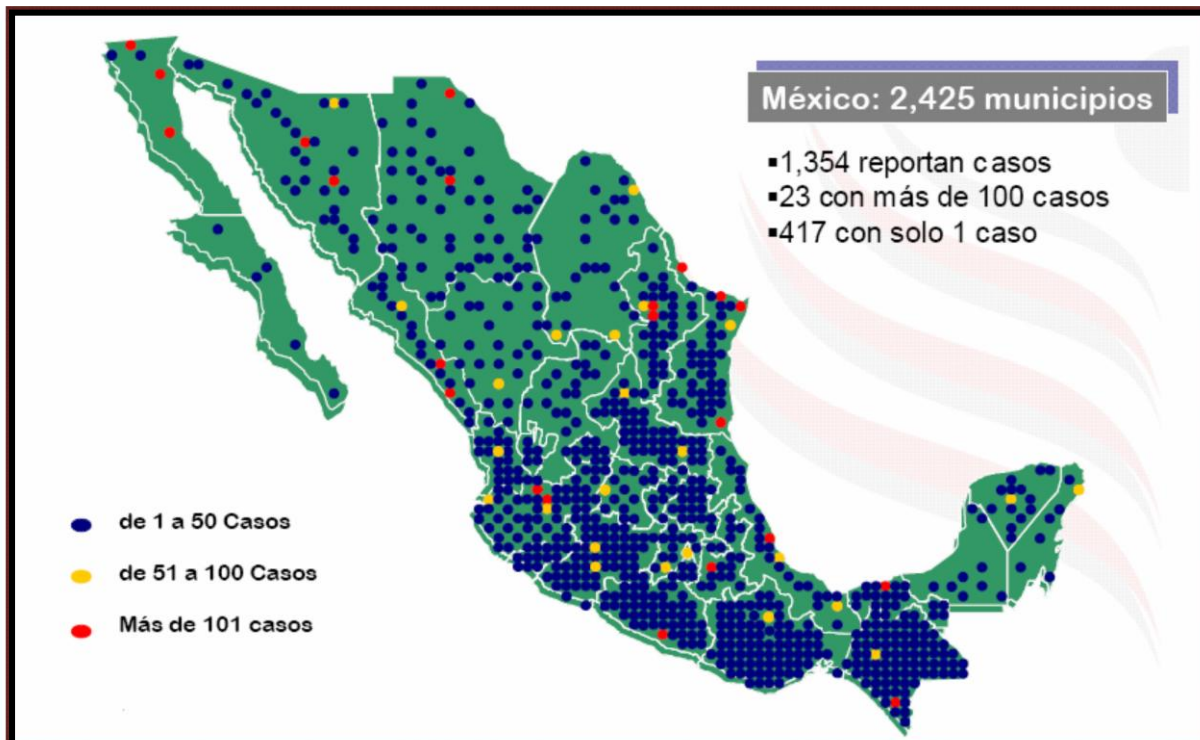


Figura 5. Reporte de número de casos de TB en distintos Estados de la República Mexicana en el año 2008

Fuente:<http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/CURSO20HG/lunes/Programa20TB20situaciC3B3n20actuaI20y20retos.pdf>

En el estado de Durango en el año 2006 se notificaron oficialmente 240 casos de tuberculosis, para el 2007 fueron 227 casos con una tasa de 15/100 000 habitantes. La mayor parte de los casos notificados en el año 2007 se diagnosticaron en la capital del Estado (71 del total /227) con una tasa de 13/100 000 habitantes¹⁷ pero es muy probable que estos datos presenten sub-registro, ya que en Durango, al igual que en el resto del país, el control de la tuberculosis constituye un reto enorme para los sistemas de salud debido a: fallas en el diagnóstico, poca énfasis en la aplicación

de las medidas de control de la transmisión, así como por el incumplimiento del tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) que además condicionan la selección de cepas de MTB multidrogoresistentes (MTB-MDR). Es así que por el sub-registro, si consideramos que la tasa de casos de tuberculosis calculada por la OMS para México es de 50/100 000 habitantes, en Durango se presentarían 800 casos de tuberculosis anualmente. Si bien los datos epidemiológicos no son certeros en ningún sentido, esto se extiende porque en Durango no se tiene información completa y mucho menos se sabe de la prevalencia de infección por cepas resistentes.

2.5. GRUPOS DE ALTO RIESGO PARA ADQUIRIR Y DESARROLLAR TUBERCULOSIS.

En general, los factores que se asocian con la adquisición de la infección, el desarrollo de la enfermedad y la mortalidad son complejos. Su presencia depende entre otras cosas, de aspectos sociales, económicos, culturales, biológicos y médicos. La OMS estima que en el ámbito mundial más del 70% de los pacientes con TBP son VIH positivos y que esta infección es el factor de riesgo más importante conocido para la reactivación de una infección tuberculosa latente. Esto se acentúa en el continente africano, específicamente para el área subsahariana, donde se encuentra el 70% de los coinfectados, de allí que esta sea la región que presenta mayor tasa de incidencia por TB de todas las formas clínicas. Cerca de un tercio de las personas VIH positivas están infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), y de estas, un ocho por ciento vive en latinoamérica. La presencia del VIH aumenta la conversión de TBL a enfermedad activa en mas de diez veces , por lo que se le considera como el factor de riesgo independiente más importante conocido en el mundo y puede ocurrir en cualquier momento de la evolución de la infección¹⁸.

Por otro lado las fallas en los sistemas de salud para el control de la enfermedad, así como el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas asociadas al envejecimiento y los malos hábitos alimenticios de la población, son factores de riesgo para el desarrollo de tuberculosis pulmonar. La co-morbilidad de diabetes y

tuberculosis puede incrementar las tasas de tuberculosis casi al mismo nivel que la co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana.¹⁹ Así, hay estudios indican que el riesgo de desarrollar tuberculosis pulmonar activa es de 3 a 11 veces mayor en personas con DT2 que en personas sin la enfermedad.^{18,19}

2.6. PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS.

La tuberculosis afecta tanto a países desarrollados como aquellos en vías de desarrollo. La diferencia entre unos y otros está en la prevalencia de factores de riesgo que contribuyen a una mayor o menor incidencia en la mortalidad, así como en la disponibilidad, apego al tratamiento y control de contactos. La mayor parte de las muertes por tuberculosis se deben a diagnósticos tardíos.²⁰

En los países en desarrollo, esta enfermedad ha sido un reto constante para las poblaciones y los servicios de salud, ya que estos presentan el 90% de los nuevos casos en todo el mundo, situaciones como: pobreza, desnutrición y la insuficiente accesibilidad a la terapéutica marcan esta tendencia.²¹

La "reemergencia" de la tuberculosis desde mediados de la década de los 80, ha estado estrechamente ligada a la epidemia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana²², acentuándose en naciones asiáticas y africanas. Así por ejemplo, la región Subsahariana se revela un aumento de la incidencia a más de 300 casos por 100 000 habitantes, agrupándose en estas áreas cerca de 50% de las personas co-infectadas²³ con VIH.

Desde los años de 1980 hasta 1999 el número de casos nuevos de TBP notificados anualmente en todo el continente americano ha fluctuado entre 227,137 y 253, 239. En el año 1980 se reportaron en América 227,137 casos nuevos de tuberculosis, con una tasa de incidencia de 33.4 por 100 000 habitantes. Para el año 1986 no se registró mucha variación, se reportaron 227.277 nuevos casos con una incidencia de 34,2 por cada 100 000 habitantes. A partir del año 1990 se inició un rápido incremento de nuevos casos notificados anualmente.

En 1996 el centro para el control de enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) de Estados Unidos de América (EUA) estimó que en México se presentaron 55, 631 casos nuevos de TBP²⁴ pero los registros epidemiológicos oficiales solo reportaron la

quinta parte. En México 8 millones de personas se enferman de tuberculosis cada año.²⁵

La tasa de incidencia anual varía de 356 por 100 000 habitantes en África y 41 por 100 000 en América.²⁶ Para las mujeres en edad reproductiva, la tuberculosis es la mayor causa de muerte por un agente infeccioso en el mundo y la principal causa de muerte entre las personas con VIH / SIDA.²⁷ En 2005 el país con la mayor incidencia estimada de tuberculosis fue Suazilandia con 1262 casos por cada 100 000 personas. La India tiene el mayor número de infecciones con más de 1,8 millones de casos.²⁸

En el Reino Unido la tasa de incidencia de tuberculosis va desde 40 por 100.000 en Londres hasta menos de 5 por 100 000 en zonas rurales al oeste de Inglaterra, por lo que la media nacional es de 13 por 100 000. Las tasas más altas en Europa occidental se sitúan en Portugal (31,1 por 100 000 en 2005) y España (20 por 100 000). Estos contrastan con tasas de 113 por 100 000 en China y 64 por 100 000 en Brasil. En los EUA la tasa fue de 4,9 por 100 000 personas en 2004.²⁹

En América Latina la tendencia cambia según el nivel de desarrollo, la calidad de los sistemas de atención en salud, la cobertura y las acciones de control. Con respecto a la mortalidad, los países que tienen las tasas de defunción por tuberculosis pulmonar son: Perú (18.4), Guatemala (10.7), Uruguay (8.9), México (7.6) y Panamá (6.5).²⁸

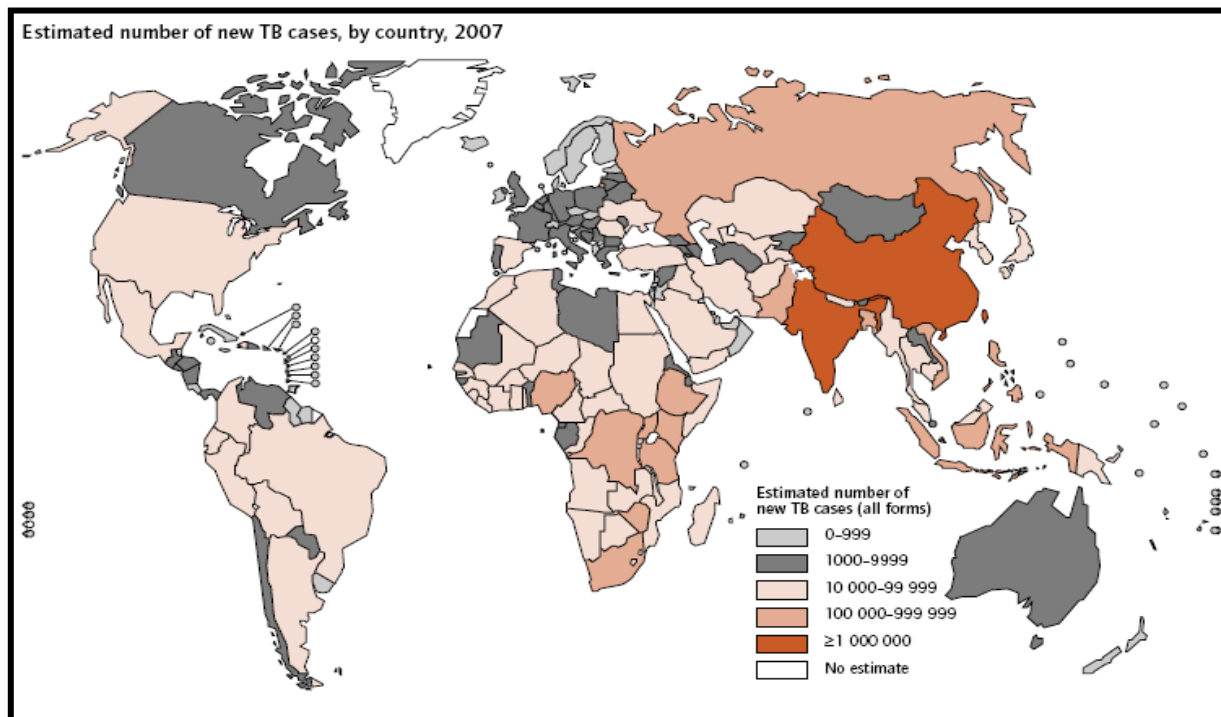


Figura 6. Nuevos casos de Tuberculosis a nivel mundial en el año 2007. Control Global de tuberculosis: Organización mundial de la salud 2009.

Fuente: http://www.phac-aspc.gc.ca/cnic-ccni/2008/pres/pdf/dec1_behr.pdf

Uno de los graves problemas de esta enfermedad ha sido la diseminación de cepas con resistencia a múltiples fármacos (isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomycin y pirazinamida). La emergencia de cepas multidrogorresistentes (MDR) y su selección se asocia a diversos factores relacionados con fallas de los programas de control, disponibilidad de tratamientos adecuados, falta de apego a los mismos, poca cobertura del programa TAES, así como la limitación en el diagnóstico y pruebas de susceptibilidad³⁰. La descripción de cepas extremadamente drogo-resistentes (XDR) y el conocimiento de que determinadas cepas MDR se transmiten de forma epidémica, ha levantado las alertas de los organismos internacionales. Por la dificultad de su tratamiento, las cepas MDR y XDR son las formas más graves de tuberculosis. Su estudio y control son considerados de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico y de Salud Pública.

La CDC considera que la multiresistencia se asocia estrechamente con la disponibilidad y apego al tratamiento antifímico, y por lo tanto se espera un aumento

en el número de casos de tuberculosis resistente y multirresistente, condicionando un aumento potencial del riesgo de transmisión de la TB-MDR en las fronteras

2.7. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.

La metodología más aceptada consiste en la detección de bacilos ácido-alcohol resistente en expectoración, mediante coloraciones especiales y el aislamiento en medios de cultivo e identificación mediante características fenotípicas y bioquímicas.

Los líquidos corporales que se analizan con mayor frecuencia son: jugo gástrico, líquido cefalorraquídeo, orina, líquido pleural y biopsias de diversos tejidos.

La baciloscopía se basa en la capacidad de las micobacterias para formar complejos estables con ciertos colorantes de arylmetano como la fucsina, la cual penetra en la pared celular uniéndose a los complejos micolil arabinogalactano. Este complejo retiene el colorante aún después de su exposición al alcohol ácido o ácidos minerales. Esta condición es requerida para que un microorganismo sea denominado ácido alcohol resistente.

Las coloraciones que demuestran la condición de ácido alcohol resistencia de las micobacterias son el Ziehl-Neelsen y el Kinyoun. La primera es la más usada, y permite observar a los bacilos tuberculosos de color rojo sobre un fondo azul (Figura 7). Otro recurso usado para la detección es la capacidad que tienen las micobacterias de unir en su superficie colorantes fluorescentes como la auramina y rodamina, que al ser observados en microscopio de luz ultravioleta, emiten una fluorescencia amarillo o naranja dependiendo del filtro utilizado.

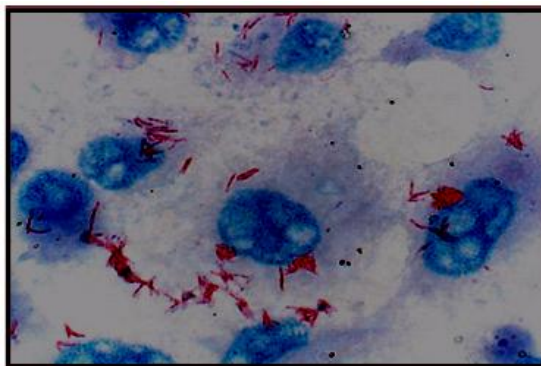


Figura 7. Vista microscópica de bacilos Ácido Alcohol Resistentes en Tinción Ziehl-Neelsen
Fuente: Manual del curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas de Caracas Venezuela

La resistencia a la decoloración por ácido alcohol también la presentan otras especies distintas a las micobacterias, como son las especies de *Nocardia*, *Legionella*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* y algunos parásitos como *Cryptosporidium*, *Isospora belli* y *Cyclospora*. La sensibilidad de la técnica de Ziehl-Neelsen es baja, ya que son necesarios más de 10 000 bacilos por mililitro de expectoración para el diagnóstico de TBP. Para que un cultivo se considere positivo se necesitan de solo 100 bacilos.

Los integrantes del complejo MTB y la mayoría de las micobacterias capaces de infectar al hombre tienen un crecimiento muy lento, dado por una tasa de duplicación de aproximadamente 18 h, por lo tanto se requiere un período de incubación que puede durar entre 6 y 8 semanas a 37°C, antes de reportar un cultivo como negativo.³¹ Aunque son aerobios estrictos, el incremento de la tensión de CO₂ puede favorecer la velocidad de crecimiento. El pH óptimo de crecimiento es 7. El diagnóstico definitivo de la TB se hace al demostrar la presencia del agente causal mediante la observación microscópica de sus colonias, la recuperación del mismo en medios de cultivo (crecimiento lento), el análisis de pruebas bioquímicas niacina (+), reducción de nitratos (+), catalasa (-) o a través de técnicas de biología molecular, a partir de muestras clínicas.³¹

2.8. CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS.

La detección de micobacterias en muestras clínicas puede ser difícil. Entre las principales causas están el crecimiento lento y el alto nivel de contaminación en las muestras de expectoración. Para facilitar la recuperación de micobacterias de muestras clínicas se debe someter a procesos de descontaminación, homogeneización (fluidificación o digestión) y concentración. La descontaminación se realiza en muestras que probablemente contengan flora bacteriana mixta como la expectoración y la orina con la finalidad de reducir el sobrecrecimiento bacteriano no deseado. La homogeneización tiene por finalidad fluidificar la muestra, licuando el mucus o tejidos que rodean los microorganismos para que el agente contaminante pueda destruir a las bacterias no deseadas. Estos procesos se realizan usando ácidos y álcalis fuertes, a los cuales las micobacterias son resistentes debido al contenido lipídico de su pared celular. El método de descontaminación de muestras

clínicas más utilizado es el método de Petroff que emplea hidróxido de sodio como agente descontaminante y homogenizante.³¹ Sin embargo, la utilización inadecuada de estas sustancias, o la exposición prolongada, pueden afectar la viabilidad de las micobacterias presentes en la muestra.

Las muestras recolectadas de sitios estériles y no estériles se pueden cultivar directamente sobre medios adecuados. Existen diferentes medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias que garantizan un buen soporte nutritivo para su crecimiento. Estos pueden ser sólidos o líquidos, selectivos y no selectivos. Los medios sólidos pueden ser elaborados a base de huevo o agar. Los medios basados en huevo se caracterizan por contener verde de malaquita, que inhibe el crecimiento de la flora bacteriana asociada, pueden almacenarse en refrigeración por largos periodos de tiempo, resisten la desecación y garantizan el crecimiento de la mayoría de las micobacterias (Figura 8). Sin embargo, presentan algunas desventajas como dificultad en la recuperación de las colonias aisladas, en caso de contaminación afecta todo el medio; no deben usarse para pruebas de sensibilidad ya que durante su elaboración se requiere de calentamiento a altas temperaturas lo que puede inactivar parte de la droga.

Los medios basados en agar (por su transparencia) permiten la detección temprana del crecimiento mediante la observación microscópica de las colonias, pueden ser usados para pruebas de sensibilidad, ya que en ellos se logra obtener concentraciones exactas de los antibióticos y, se pueden recuperar fácilmente las colonias aisladas en caso de contaminación. Sin embargo, presentan como desventajas su alto costo, corta vida de almacenamiento (1 mes), la formación de formaldehído que inhibe el crecimiento de las micobacterias y que es producido por la exposición del medio a los largos períodos de incubación que predisponen a la desecación.

El medio Löwenstein Jensen (L-J) es el más utilizado en los laboratorios clínicos de diagnóstico y es menos inhibitorio que el de Petragnani, el cual, se emplea sobre todo para la recuperación de micobacterias provenientes de muestras muy contaminadas. El medio de la American Thoracic Society se contamina fácilmente debido a su bajo contenido de verde de malaquita, por lo tanto se recomienda para

muestras estériles como líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y biopsias. El medio de Ogawa-Kudoh, inoculado con muestras procesadas por el método de Kudoh (NaOH al 4% por 2 min) muestra una sensibilidad similar al medio Löwenstein Jensen pero con la ventaja de una menor frecuencia de contaminación.

Los medios a base de agar Middlebrook 7H10 y 7H11 contienen 10 veces menos verde de malaquita que los medios con base de huevo, lo que explica la mayor incidencia de contaminación. El medio 7H11 contiene caseína que mejora la velocidad y el rendimiento en el crecimiento de las micobacterias resistentes a la isoniacida.

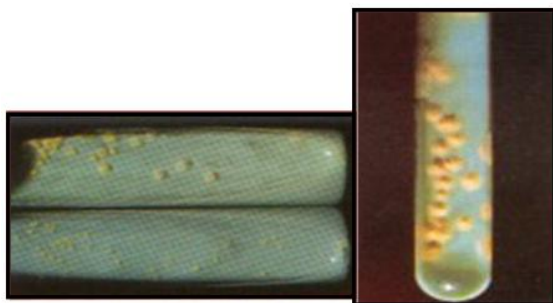


Figura 8. Colonias de *M. tuberculosis* en medio sólido Löwenstein-Jensen

Fuente: Manual del curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas de Caracas Venezuela

2.9. MÉTODOS MOLECULARES DE TIPIFICACIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis*.

La epidemiología molecular de las infecciones por *Mycobacterium* en el hombre se está utilizando como una nueva herramienta para examinar en forma precisa los mecanismos de transmisión de la TB. El proceso de tipificación es importante para el reconocimiento de brotes de infección durante la transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, recaídas, fracasos del tratamiento o en la detección de fuentes de infección. Particularmente, en el reconocimiento de cepas virulentas de un determinado microorganismo.³¹

Avances recientes en técnicas moleculares han permitido el desarrollo de una variedad de métodos de genotipificación para la diferenciación y caracterización de los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.^{32,33} y para comprender mejor las dinámicas de transmisión, así como la patogénesis de la TB en el mundo.³⁴

La metodología RFLP-IS6110 es la técnica de referencia para la genotipificación de *M. tuberculosis* y fue estandarizada por Van Embden y et al.³⁵ Este método está basado en las variaciones encontradas en el número de copias y localización en el genoma de la secuencia de inserción IS6110 que ocurren de una cepa a otra, patrones diferentes de RFLP-IS6110 sugieren cepas epidemiológicamente no relacionadas y patrones idénticos representan la transmisión reciente de la cepa dentro de la población (Figura 9).³⁶

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción o también fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP por sus siglas en inglés) de la secuencia de inserción IS6110 ha sido hasta la fecha el método más aceptado.³⁷ El RFLP es capaz de discriminar entre cepas relacionadas y no relacionadas clonalmente, por esta razón, proporciona perfiles genéticos idénticos en cepas que provienen de pacientes relacionados epidemiológicamente y proporciona perfiles genéticos diferentes en cepas provenientes de pacientes sin esta relación.³⁷ Algunos estudios de epidemiología molecular que han empleado procedimientos moleculares como el RFLP combinado con métodos epidemiológicos convencionales, han logrado identificar fuentes de infección y nuevos focos de transmisión no detectados por los métodos clásicos de estudio de contactos. Con ellos se ha podido determinar también la magnitud de la transmisión reciente e identificar factores de riesgo asociados a la transmisión activa.³⁷ Sin embargo, la tipificación por este método requiere de cultivos con crecimiento de varias semanas para obtener su purificación de DNA, por lo tanto es extenso y laborioso, además presenta algunos problemas en cuanto a la interpretación en los patrones de bandas pertenecientes al complejo de *Mycobacterium*. Así mismo, presenta un bajo poder de discriminación para aislamientos con bajo número de copias (<6) de IS6110.^{38,37}

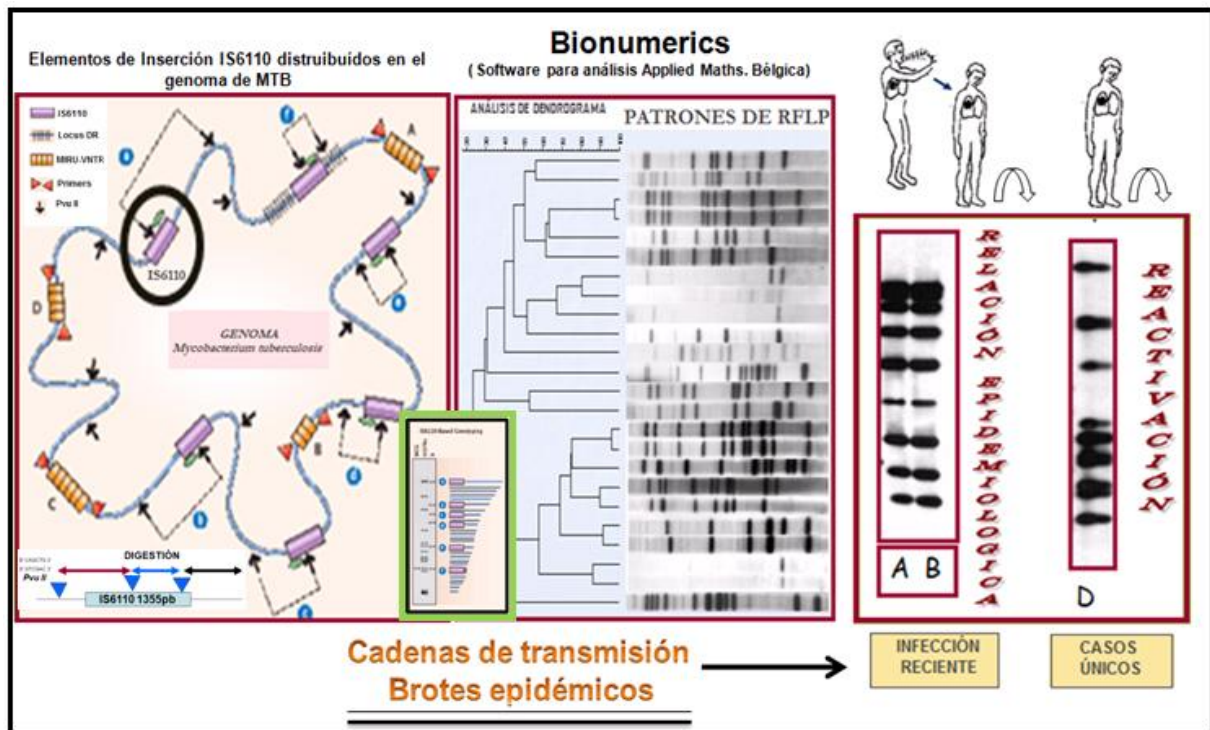


Figura 9. Método de tipificación RFLP-IS6110

Fuente: academics.utep.edu/Portals/370/TIES/TIES-Araujo.pdf; Dr. José Antonio Enciso M. UIMZ, Yvain Salinas D. CIIDIR-IPN

La genotipificación basada en diferentes clases de elementos llamados Unidades Interdispersas de Mycobacterium (MIRUs por sus siglas en inglés) ó Repeticiones en Tándem de Número Variable (VNTR por sus siglas en inglés) fue descrito por Supply et al.⁴⁰ Es actualmente el método más utilizado y se ha integrado en los sistemas de control de la tuberculosis en algunos países como en EUA.⁴⁰ En un estudio piloto con un número limitado de cepas, se encontró que el poder de discriminación de este método se acercó al del RFLP-IS6110 para discriminar casos relacionados epidemiológicamente.⁴⁰ Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de estructuras tipo minisatélite identificadas en 41 secuencias de ADN intercalados en sitios específicos (loci) a lo largo del genoma de *M. tuberculosis* y *H37Rv* que están compuestos de secuencias repetidas de 51-77 pb³⁸. Cuando se usan iniciadores específicos para las regiones flanqueantes en cada locus, la amplificación por PCR permite la determinación de productos amplificados que reflejan el número de copias de MIRU-VNTR por aislado cuando se realiza corrimiento electroforético de ellos.

(Figura 10). Entre los conjuntos descritos de loci MIRU-VNTR se ha utilizado un sistema basado en los 12 loci más polimórficos³⁹ para la tipificación del complejo de MTB.⁴¹ Por lo tanto es ahora el más utilizado en micobacteriología clínica y en la investigación de brotes epidémicos.⁴² Los métodos de tipificación MIRU-VNTR han mostrado buena estabilidad, reproducibilidad y un alto poder de discriminación para el complejo de *M. tuberculosis*⁴¹ además es más rápido en realizar, en comparación a la técnica de RFLP-IS6110, ya que se usa poca cantidad de ADN bacteriano para obtener un resultado adecuado para genotipificación, lo que resulta muy apropiado dadas las dificultades para obtener grandes cantidades de ADN necesarias para el RFLP-IS6110. En conjunto el método expresa la tipificación con un código numérico de 12 dígitos, resultando efectivo para discriminar transmisión, recaídas, reactivaciones y casos de contaminación cruzada. Desde el punto de vista metodológico, esta técnica tiene gran potencial para crear bases de datos a gran escala. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) de EUA lo ha adoptado como un método de tipificación estándar.⁴⁰

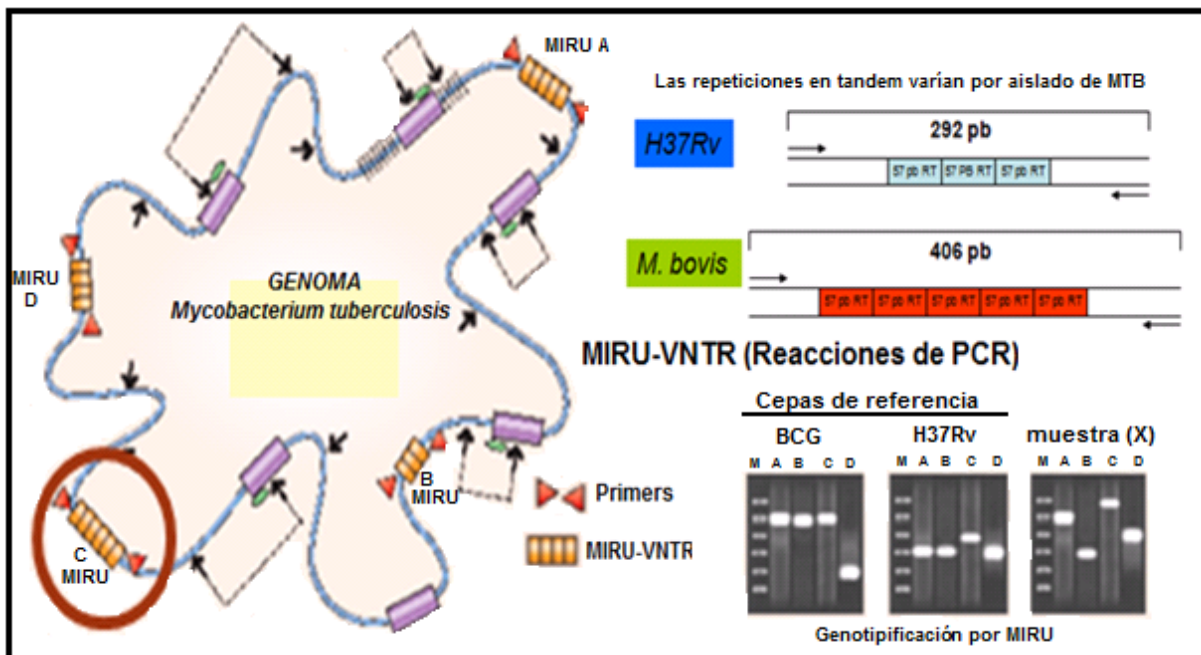


Figura 10. Método de tipificación MIRU-VNTR

Fuente: academics.utep.edu/Portals/370/TIES/TIES-Araujo.pdf, Yvain de los A. Salinas D. CIIDIR-IPN

Una nueva técnica empleada en epidemiología molecular de la tuberculosis es el *spacer oligotyping* o "*Spoligotyping*" que tipifica oligotipos espaciadores. Esta técnica descrita por Kamerbeek, J.L. et al en 1997 y Van Soolingen et al en 1995, se basa en la amplificación *in vitro* de los espaciadores altamente polimórficos, que separan las regiones repetitivas (*DR*), las cuales flanquean la secuencia de inserción *IS6110* del cromosoma de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. La región *DR* de las micobacterias del complejo tuberculosis, descrita por primera vez por Hermans et al. en 1991, tienen una organización característica de secuencias *DR* de 36 pb y secuencia constante separada por espaciadores de 35 a 41 pb de secuencia variable.⁴¹

Esta variación de los espaciadores es utilizada para obtener diferentes patrones de hibridación para la detección y discriminación simultánea de los miembros del complejo *M. tuberculosis* a partir de los especímenes clínicos y facilita mucho la tarea de tipificación cuando es difícil de obtener por los métodos bacteriológicos convencionales. Esta técnica consiste en amplificar por PCR la región *DR* con un juego de iniciadores marcados con biotina y luego hibridar este producto a una membrana de nylon que contiene un set de 43 espaciadores de secuencia conocida unidos de forma covalente. La diferenciación de las cepas se realiza por la presencia (1) o ausencia (0) de alguno de los 43 espaciadores en las cepas estudiadas observándose manchas correspondientes a cada espaciador. Posteriormente los patrones obtenidos se convierten de un código binario (1/0) representando la presencia o ausencia de alguna de las 43 secuencias espaciadas para ser convertidos a un código octal. Esta técnica simplifica la comparación visual y se logra una excelente reproducibilidad. Este método es muy sencillo de realizar y en 8 horas se puede obtener un resultado.

En este proyecto se aplicaron estas metodologías para tener un mayor conocimiento de las cepas circulantes y de su diseminación. Esta información será de gran ayuda para reforzar los programas de control de la tuberculosis.

2.10. TUBERCULOSIS DROGORRESISTENTE EN MÉXICO.

La resistencia en microorganismos previamente susceptibles se produce cuando se emplean antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Con el uso creciente de los antibióticos en décadas pasadas, han emergido resistencias en todas las clases de microorganismos incluyendo *M. tuberculosis*.

En México, igual que en otros países la drogorresistencia ha complicado el control de la tuberculosis y se hace más evidente que la detección oportuna, el tratamiento supervisado, el evitar el abandono y el asegurar la curación, contribuyen a reducir el riesgo de drogorresistencia.⁴⁶

Las cifras de resistencia conocidas en México son preocupantes. En una encuesta promovida por la OMS y la Organización Panamericana de la Salud realizada entre 1986 y 1990 en países de América Latina, se encontró un 19.1% de resistencia primaria.⁴⁷ Entre 1989 y 1993 el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos evaluó la susceptibilidad de 1,811 aislamientos de diversos estados, encontrando una resistencia primaria de 8.3%.⁴⁸ Sifuentes en 1995, reportó la experiencia en el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ) de México, con resultados que mostraron tasas de resistencia primaria a isoniacida (INH) de 9%, rifampicina (RMP) 6% y multidrogorresistencia de 6%, así como elevadas tasas de resistencia secundaria: isoniacida (44%), rifampicina (35%), multidrogorresistencia (35%).⁴⁹ En 1997 en una encuesta realizada con los lineamientos de la OMS en tres estados de la República Mexicana, se encontraron niveles de resistencia en nuevos casos de 12.9% y casos de TB con tratamiento anterior de 50% a uno o más medicamentos de primera línea como isoniacida, rifampicina y pirazinamida y niveles de multidrogorresistencia de 2.4 y 22.4% para los nuevos casos y retratados respectivamente.⁵⁰ En 1998 Peter encontró 17% de multiresistencia en 427 aislamientos hechos en Baja California.⁵¹ En el año 2001, el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias reportó una tendencia ascendente

en la resistencia secundaria entre los periodos 1994–1997 y 1997–2000 de 13.0 y 15.8%, respectivamente.⁵²

Es evidente que en México existen cepas de *M. tuberculosis* con resistencia a uno o más fármacos, lo que limita la curación al 100%. En relación al tratamiento con medicamentos de primera línea, los de segunda línea tienen: a) costo elevado que puede ser 100 veces mayor, b) menor eficacia, curación de 50 a 60%, c) tratamiento dos veces más prolongado, d) efectos adversos severos con mayor riesgo de abandono, e) alto costo y difícil acceso de métodos diagnósticos, f) atención médica especializada por complicaciones. Se estima que cada año los nuevos casos de tuberculosis resistente representan de 2.5 a 2.9% de los casos.⁴⁹

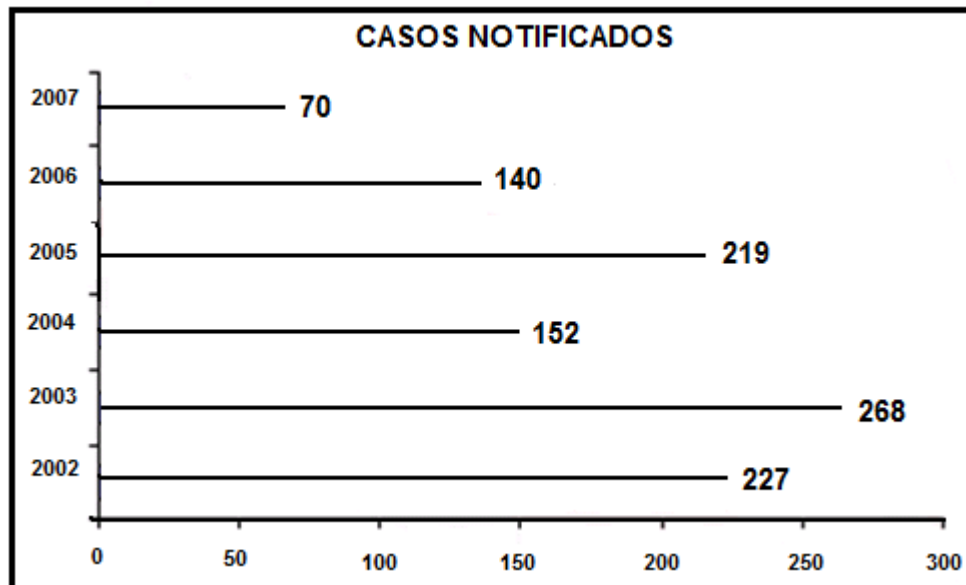


Figura 12. Casos de resistencia a fármacos (TB-MDR Y XDR) en México 2002-2007

Fuente: Base de datos de TB-DR, Programa de Tuberculosis CENAVE 17/01/07

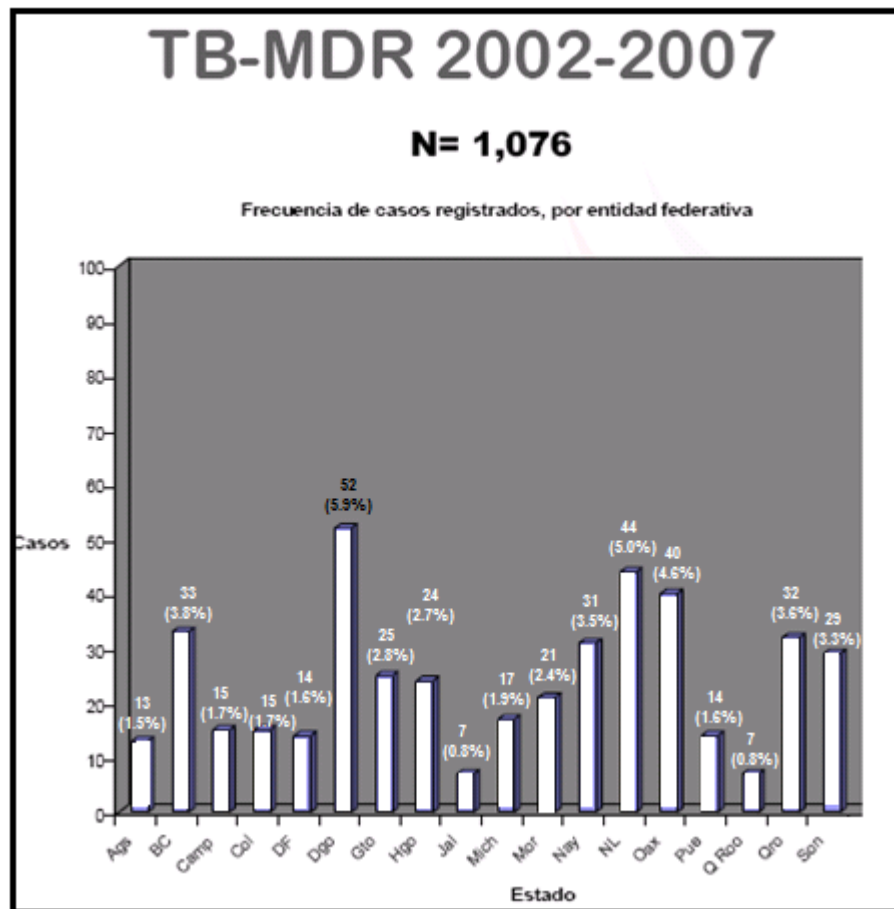


Figura 13. Tuberculosis multidrogorresistente en estados de México durante el período 2002-2007

Fuente: Base de datos de TB-DR, Programa de Tuberculosis CENAVE 17/01/07

Se considera que una cepa de *M. tuberculosis* es multidrogorresistente (TB-MDR) cuando un aislamiento de este complejo es resistente a por lo menos isoniacida y rifampicina.

El concepto de resistencia primaria implica identificar la resistencia de las cepas a algún fármaco antituberculoso en los pacientes cuando no han recibido tratamiento (resistencia en casos nuevos). Este tipo de resistencia involucra la transmisión de una cepa con resistencia natural. La resistencia primaria se manifiesta en la mayoría de las veces a un solo fármaco. En raras ocasiones a dos o más.

En cepas aisladas de pacientes en los que hay evidencia de al menos un tratamiento anterior con más de un mes de duración, la resistencia se denomina resistencia

secundaria o adquirida, en su mayoría es ocasionada por el mal uso de los fármacos antituberculosos.

En la drogorresistencia adquirida suele encontrarse resistencia a dos o más medicamentos y es relativamente frecuente la aparición de cepas con multidrogorresistencia adquirida.⁵³

Cada caso de TB-MDR o extremadamente resistente (XDR), no tratado puede contagiar de 10 a 15 personas en un año. Los fármacos necesarios para conformar los esquemas no se encuentran disponibles en el país (están fuera del cuadro básico y catálogo nacional de insumos), deben comprarse en el exterior. Por el momento no se sabe exactamente cuántos casos XDR existen, en la Republica Mexicana pero se calcula que por lo menos el 19% de todos los MDR lo son (OMS, 2010).

TRATAMIENTO PRIMARIO ACORTADO ESTRICTAMENTE SUPERVISADO

Fase Intensiva:	Diario, de lunes a sábado, hasta completar 60 dosis Administración en una toma	
Fármacos	Separados (Dosis)	Combinación fija clave 2414 (Presentación) 4 grageas de:
Rifampicina	600 mg	150 mg
Isoniacida	300 mg	75 mg
Pirazinamida	1,500 mg a 2,000 mg	400 mg
Etambutol (a)	1,200 mg	Clave 2405 (Presentación) 3 tabletas de: 400 mg
Fase de sostén:	Intermitente, 3 veces por semana, lunes, miércoles y viernes, hasta completar 45 dosis Administración en una toma.	
Fármacos	Separados (Dosis)	Combinación fija clave 2415 (Presentación) 4 cápsulas de:
Isoniacida	800 mg	200 mg
Rifampicina	600 mg	150 mg
En personas que pesen menos de 50 kg las dosis serán por kilogramo de peso y con fármacos en presentación separada		
(a) Usar sólo en mayores de 8 años. Puede ser reemplazado por estreptomicina		
NOM-006-SSA2-1993		

Figura 14. Esquema de tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES)

Fuente: Presentación día internacional de la tuberculosis 2008 SSA-Durango

La actual metodología de referencia para la detección de susceptibilidad a los medicamentos es el método de las proporciones múltiples diseñado en 1961.⁵⁴ Este método es costoso, laborioso y requiere de un tiempo prolongado para emitir el resultado. Por ello, es indispensable implementar nuevas técnicas que reduzcan el tiempo y el costo para la detección de la susceptibilidad a los medicamentos. Un ejemplo de ello, es el sistema radiométrico Bactec TB-460, considerado hasta ahora como estándar de oro para determinar sensibilidad a los cinco medicamentos antituberculosos de primera línea (estreptomicina, isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida). Este método fue por muchos años el primero y el único sistema automatizado que mide cuantitativamente $^{14}\text{CO}_2$ producido durante el metabolismo del substrato marcado con C^{14} presente en el medio en una escala de 0 a 999. El tubo indicador de crecimiento (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*, MGIT) que usa un indicador fluorescente sensible a cambios de presión de oxígeno es otra alternativa pero registra altos porcentajes de contaminación dada la riqueza del medio y el uso de tubos con tapa rosca. Este último parámetro ha sido mejorado en el nuevo sistema BACTEC MGIT 960.^{55,56} Además de los mencionados, los indicadores de viabilidad celular como el alamar azul-alar y resazurina, permiten detectar crecimiento, viabilidad y susceptibilidad de *M. tuberculosis* a los medicamentos.^{57,58} Para detectar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a los medicamentos se emplean microplacas con medio líquido, y de acuerdo con el indicador utilizado se conocen estas pruebas como Rema^{59,60} (*resazurin microtiter assay por sus siglas en inglés*) y Maba^{61,62} (*microdilution alamar blue assay*).

III. JUSTIFICACIÓN.

La tuberculosis constituye uno de los principales problemas de Salud Pública, la información sobre perfiles de drogo-resistencia es muy limitada, así mismo, el conocimiento sobre el tipo de clonas de MTB que circulan en México también lo es. Al igual que en muchas regiones del país, en el estado de Durango se presentan factores que favorecen la presentación y diseminación de cepas de MTB resistentes. En este proyecto se analizaron aislados del municipio de Durango incorporando métodos moleculares para la genotipificación de *M. tuberculosis* de pacientes con TBPA con el objeto de identificar los tipos clonales predominantes en esta región. Los resultados obtenidos permiten contar con información epidemiológica útil y de alto nivel para aplicarla en los programas de vigilancia y control de la tuberculosis.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cuáles son los genotipos y perfiles de drogo-resistencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis pulmonar del municipio de Durango?

V. OBJETIVO.

5.1 Objetivo General.

- Determinar los genotipos y perfil de drogo-resistencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis pulmonar del municipio de Durango.

5.1.1 Objetivos Específicos.

- Tipificar las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidas de pacientes con TBPA en el municipio de Durango por “*Spoligotyping*”.
- Genotipificar las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidas de pacientes con TBPA en el municipio de Durango por la técnica de MIRU (Unidades Repetitivas Interespaciadas de Micobacterias).
- Determinar el perfil de drogo-resistencia de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidas de pacientes con TBP en el municipio de Durango.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1. Diseño metodológico.

- Transversal descriptivo, ambispectivo sobre la epidemiología molecular de tuberculosis pulmonar.

6.2. Tamaño de muestra.

- Se analizaron un total de 23 aislados de *Mycobacterium*, seis (D-35,D-85,D-147,D-199,D-236 y D-247) previamente obtenidos en el año 2007, el 8.5% del total de casos de tuberculosis pulmonar reportados en el mismo año. Los 17 aislados restantes fueron recolectados en el período de Agosto del 2008 hasta Agosto del 2009 y corresponden a un 32% del total de casos de TBP en este año. Los aislados fueron recolectados en el Laboratorio de Microbiología del Hospital General de Durango, Laboratorio Estatal de Salud Pública y procesados en la Unidad de Investigación Biomédica del IMSS Durango.

6.3. Criterios de selección.

6.3.1. Criterios de inclusión.

- Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidas de pacientes con tuberculosis pulmonar en el municipio de Durango.

6.3.2. Criterios de exclusión.

- Cultivos contaminados durante el período de incubación y/o proceso.

6.3.3. Criterios de eliminación.

- Muestras insuficientes para el desarrollo de técnicas moleculares.

6.4. Universo de estudio.

- Cepas de MTB aisladas de pacientes con TBP.

6.4.1. Universo muestral.

- Cepas de MTB aisladas de pacientes con TBP del municipio de Durango en el período 2007-2009.

6.5. Variables.

6.5.1. Variables intervinientes.

- Edad.
- Género.
- Diabetes.
- Alcoholismo.
- Tabaquismo.
- Consumo de drogas.
- Consumo de medicamentos inmunosupresores.
- Hacinamiento.
- Migración.
- Ocupación.
- Antecedentes de tuberculosis (COMBE).

6.6. Características clínicas y demográficas.

Los datos demográficos de los pacientes fueron obtenidos de los formatos de registro del laboratorio Estatal de Salud Pública de la Secretaría de Salud, expedientes del laboratorio de microbiología del Hospital General de Durango y del laboratorio de microbiología de la Unidad de Investigación Biomédica del IMSS Durango, incluyendo para cada paciente las variables intervinientes previamente descritas además datos microbiológicos: fecha de aislamiento, tipo de muestra y resultados de baciloscopias seriadas.

6.7. Recolección de Muestras.

Las muestras se obtuvieron de acuerdo a los casos de tuberculosis pulmonar notificados por el programa estatal de tuberculosis de los Servicios de Salud del estado de Durango. Se recolectaron por cada paciente 3 muestras de expectoración espontánea o inducida y se procesaron en el laboratorio Estatal de Salud Pública.

6.7.1. Baciloscopias.

La dosis infectante de MTB para el ser humano es de menos de 10 bacilos, por lo tanto, el personal de laboratorio tiene alto riesgo de infección al realizar baciloscopias. Idealmente se debe trabajar en condiciones de bioseguridad con el uso de campanas de flujo laminar, trajes especiales y cubre-bocas con filtros respiradores XN95 ya que los bacilos tuberculosos pueden sobrevivir en frotis fijados al calor y pueden transportarse en los aerosoles producidos durante la manipulación⁶³.

En este estudio se obtuvieron extendidos de preparaciones directas de muestras de expectoración y de concentrados por centrifugación de la muestra. Para teñir los frotis se utilizó la técnica de Ziehl-Neelsen (Anexo 1) para la búsqueda de bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR), realizando estas actividades en un cuarto de bioseguridad nivel 3 (BSL-3).

6.8. Descontaminación de muestras de expectoración.

La descontaminación y concentración de las muestras de expectoración se realizó de acuerdo al método de Petroff⁶⁴ citrato de sodio-hidróxido de sodio y N-cisteína 0.5% (Anexo 2).

6.8.1 Cultivo.

El concentrado obtenido de las muestras de expectoración procesadas por el método de Petroff se inoculó en medio Löwenstein-Jensen (Anexo 2), todo el proceso se realizó en un cuarto de bioseguridad. Los cultivos se revisaron semanalmente hasta observar crecimiento. Se practicó una segunda baciloscopia (técnica Zeehl-Nielsen)

a los cultivos con crecimiento para descartar contaminaciones. Los cultivos con ausencia de crecimiento a las 8 semanas se reportaron como negativos.

Después de obtener los cultivos de MTB, el proceso de genotipificación se realizó en el laboratorio de la Unidad de Investigación Médica del IMSS Zacatecas el cual, cuenta con nivel de bioseguridad III, usando las cepas de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv, BCG (bacilo Calmette-Guerín) y CDC1551.

6.8.2. Extracción de ADN genómico.

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de cultivos de *M. tuberculosis* con al menos 4 semanas de crecimiento en medio Löwenstein-Jensen por el método estandarizado por Van Soolingen et al 1995⁶⁵, que incluye digestión con lisozima [10 mg/ml] (Boehringer Mannheim, Alemania) / proteinasa K [10 mg/ml] (Boehringer Mannheim, Alemania) / CTAB (Anexo3).

Se verificó la integridad y calidad del ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa ultrapura (invitrogen) al 0.8%, aplicando 70 voltios durante 1 hora y tiñendo los geles con bromuro de etidio 0.5 µg/ml durante 5 min.

6.8.3. Cuantificación de DNA genómico.

Una vez extraído el ADN se determinó la cuantificación y pureza en el espectrofotómetro tipo Nanodrop (ND-100 Nanodrop Thecnologies) con absorbancia de 260/280 nm. Un valor mayor a 1.8 se consideró como material genético libre de proteínas. Se obtuvieron concentraciones de ADN de 25 ng/µL y 2 ng/µL para los métodos de genotipificación “*Spoligotyping*” y MIRU-VNTR respectivamente.

6.9. Métodos de genotipificación.

6.9.1. “*Spoligotyping*”.

Esta técnica descrita por Kamerbeek J.L. et al en 1997 y Van Soolingen et al en 1995 (anexo 4), permite genotipificar cepas del complejo MTB y *M. bovis*, Las secuencias espaciadoras presentes en el locus DR de cada aislado, se amplificaron por PCR (Kit Taq polimerasa de BIOTECSA) utilizando un oligonucléotido marcado con Biotina, DRa (5´-GGTTTTGGGTCTGACGAC), DRb (5´- CCGAGAGGGGACGGAAAC) y 25

ng/ μ L del ADN genómico purificado. Los productos fueron capturados por hibridación reversa sobre una membrana de nylon donde previamente se habían fijado los oligonucleótidos correspondientes a cada secuencia espaciadora presente en el locus DR. La señal de hibridación se detectó por quimioluminiscencia, con estreptavidina-peroxidasa (500 U/mL). La presencia o ausencia (identificados con 1/0 respectivamente) de regiones del locus DR en cada aislado se representó con un código binario posteriormente convertido a un código octal (Dale et al 2001), para finalmente obtener patrones de “*Spoligotyping*” comparables en la base de datos internacional SpolDB4 (The SITVIT database Institut Pasteur Guadeloupe).⁶⁶

6.9.2. MIRU-VNTR.

El método de MIRU-VNTR es considerado por la CDC⁴³ como el estándar para comparar aislados de diferente región geográfica. Es reproducible y con alto poder de discriminación para tipificar aislados con un número menor a 5 copias de IS6110, detecta cadenas de transmisión, recaídas, reactivaciones y casos de contaminación cruzada.⁴¹ La ventaja de estas secuencias MIRU-VNTR deriva de su alta estabilidad en el genoma, con una variabilidad estimada en 6 años.⁶⁷ Esta técnica solo requiere de pequeñas cantidades de ADN que pueden facilitar la identificación del bacilo causante de la infección en un brote epidémico de manera rápida, lo cual, puede ser fundamental para el tratamiento del paciente y la posible contención del brote epidémico. La posibilidad de encontrar dos cepas iguales con este método que no estén epidemiológicamente relacionadas es igual a 2×10^8 reduciendo así la posibilidad de encontrar patrones idénticos por coincidencia.⁶⁸ La facilidad de manejo de los resultados de PCR y su alto grado de reproducibilidad, hace posible el desarrollo de bases de datos para patrones generados por éste método que permita comparar fácilmente aislados de cualquier parte del mundo.

La genotipificación por esta técnica se desarrolló según al método descrito por Supply y et al (Anexo 5). Se realizó la amplificación de 15 regiones polimórficas de MTB por reacción en cadena de la polimerasa (Taq polimerasa de BIOTECSA) (T. Wada 2007). MIRU 4, 10, 16, 26, 31 y 40 (descritos por Supply en 1998), Mtub 04, 21, 30 y 39 (Godreuil, 2007). QUB 11b, 26 y 4156 (Queen’s University Belfast) y ETR

A, C. (Exact Tandem Repeat). Las condiciones de PCR fueron diferentes para cada MIRU. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio 0.5 µg/ml. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen) para estimar el tamaño de los productos de PCR. Para determinar el peso molecular de cada producto amplificado se utilizó el Software de Gene Tools (Synoptics, UK). Para calcular el número de copias de cada MIRU por aislado usando los valores de referencia de la cepa MTB H37Rv (Anexo 5), se utilizó la fórmula que se muestra en la Figura 15.

Fórmula

$$\text{Número de Copias} = \frac{\text{TAMAÑO DEL AMPLIFICADO} - \text{LONGITUD DE LAS UNIDADES FLANQUEANTES}}{\text{LONGITUD DEL MIRU}}$$

MIRU-VNTR_{plus} | www.miru-vntrplus.org

BASE DE DATOS INTERNACIONAL PARA CÓDIGO MIRU

Figura 15. Fórmula para determinar el número de copias de cada MIRU por aislado de MTB y dirección electrónica donde es posible comparar aislados a nivel mundial.

6.10. Determinación de Drogoresistencia.

6.10.1. Método BACTEC TB-460 (Becton Dickinson)

Este método se realizó con la colaboración del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INER) para determinar la drogorresistencia de los aislados de MTB. El proceso consiste en sedimentar los bacilos mediante centrifugación y se siembran en medio de Löwenstein-Jensen y en medio Bactec 7H12.⁶⁹ Una vez que han crecido las micobacterias éstas se tipifican siguiendo métodos bacteriológicos convencionales o por la prueba del NAP [(p-nitro-alfa acetil-amino-beta-hidroxi-propiofenona) adicionado al medio BATEC 12B y se lee cuantificando el CO₂

radiactivo.⁶⁹ Del cultivo de Löwenstein-Jensen se obtiene una suspensión de micobacterias que se utiliza para realizar los estudios de sensibilidad a medicamentos antituberculosos de primera línea. Este proceso, requiere de 5 a 12 días pero sus mayores inconvenientes son el uso de material radioactivo y su elevado costo.

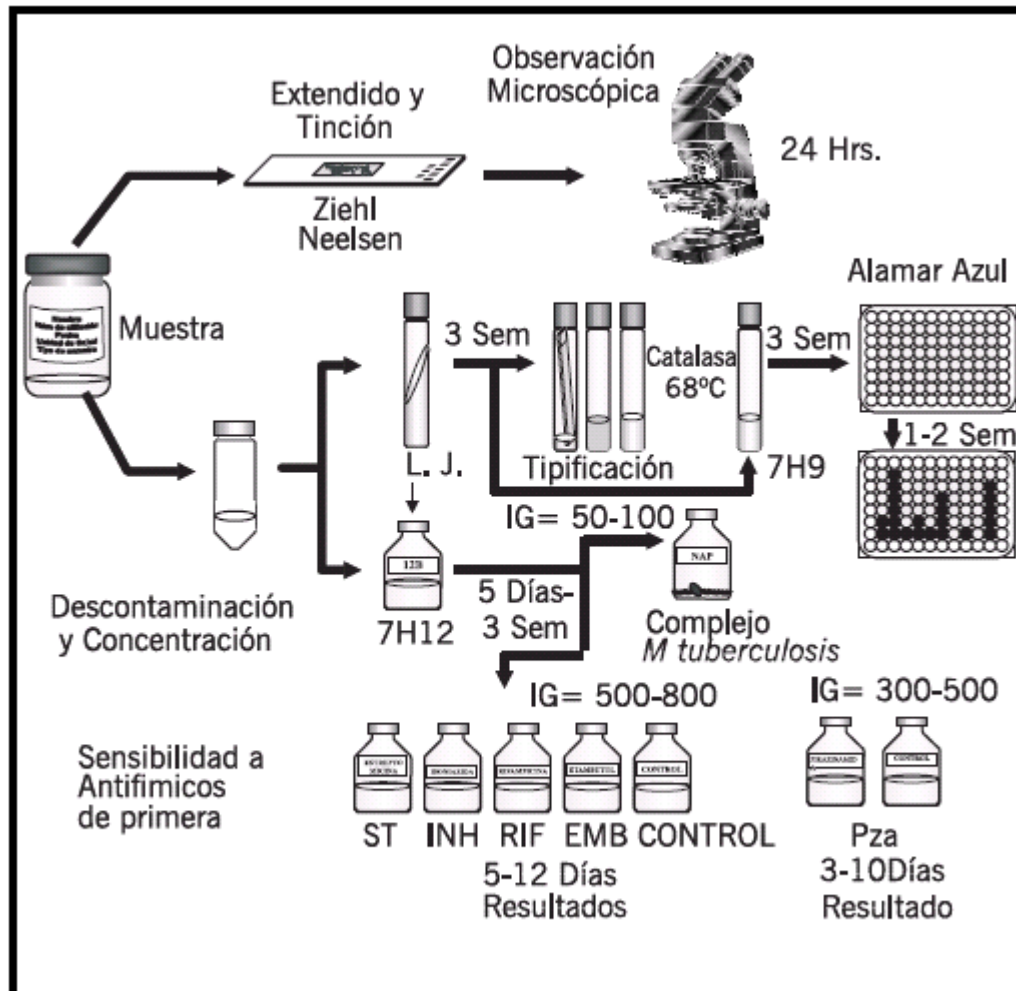


Figura 16. Proceso de muestras de expectoración en el laboratorio

Fuente: Artículo Enf Emerg 2005; 7(1):13-19

VII. RESULTADOS.

Se obtuvieron y analizaron un total de 23 aislados de *Mycobacterium* a partir de muestras de expectoración provenientes de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Las muestras fueron obtenidas en los siguientes sitios: 9 aislados (40%) del Laboratorio Estatal de Salud Pública (LES), 7 (30%) aislados del Hospital General (HG) y 7 (30%) de la Unidad de Investigación Biomédica del IMSS Durango. Los aislados del LES y HG fueron obtenidos en periodo de agosto 2008 a agosto 2009 y los de la UIB de agosto 2007 a agosto 2008.

Las características clínicas, demográficas y factores de riesgo presentes en los pacientes se muestran en la Cuadro 1.

Cuadro 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes con tuberculosis de los cuales fueron obtenidos los aislados de este estudio

Variables	n = 23
Edad (mediana; Rango)	53; (19-81 años)
Género	F = 6 (36%) M = 17 (73%)
Diabetes	9 (39%)
Alcoholismo	5 (22%)
Tabaquismo	6 (26%)
Consumo de Drogas	2 (8.7%)
Medicamento inmunosupresor	2 (8.7%)
Hacimiento	9 (39%)
Migración	2 (8.7%)
COMBE	7 (30.5%)
Ocupación (Ama de casa, Jornalero, Agricultor, Desempleado)	7 (30.5%), 7 (30.5%) 6 (26%), 3 (13%)

Femenino (F); Masculino (M)

Con respecto a los factores de riesgo para desarrollo de TBPA, un 40% de los pacientes tenían diagnóstico de DT2. Cuatro de los pacientes incluidos en este estudio ya se habían diagnosticado previamente con TBP (17.4%). Tres de estos pacientes recibieron tratamiento con 4 medicamentos durante 6 meses y uno abandonó el tratamiento.

Los patrones obtenidos por el método de “*Spoligotyping*” se analizaron por medio de la base de datos internacional SpolDB4 SITVIT2 data base (Institut Pasteur de Guadeloupe) y MIRU-VNTRplus (Figura 17). Cada experimento fue procesado a la par con cepas de referencia H37Rv, BCG y CDC1551.

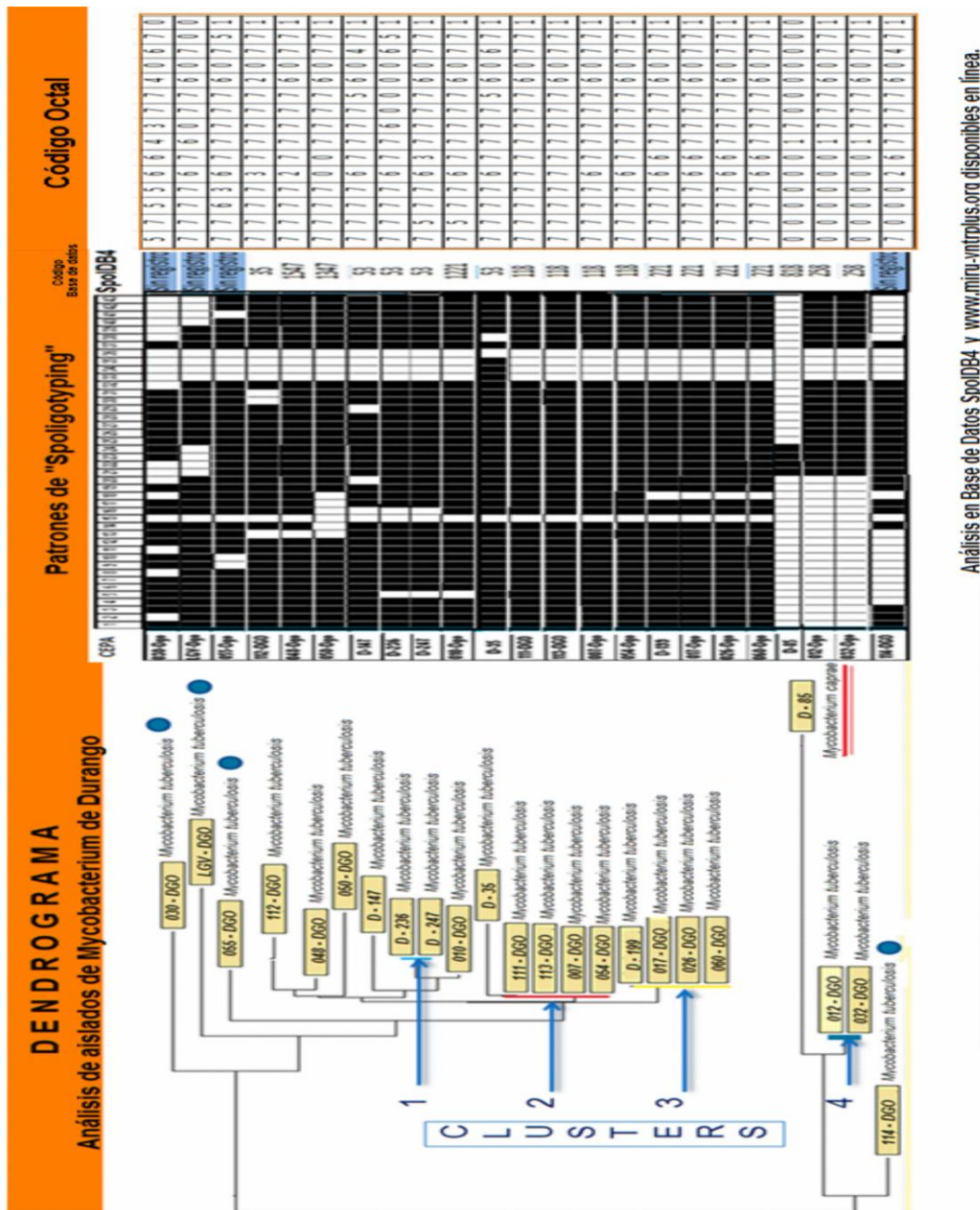
De los patrones de “*Spoligotyping*” obtenidos se obtuvo un código binario (1/0) el cual se convirtió a un código octal para su interpretación en la base de datos. Veintidós cepas pertenecieron a la especie *M. tuberculosis* y uno de *M. caprae*.

El dendrograma de las 23 cepas mostró que el patrón de 12 de ellas revela relación genética y se integraron en cuatro grupos o “*clusters*”, dos grupos tuvieron 4 cepas relacionadas y los otros incluyeron dos cepas cada uno. Las otras 11 cepas mostraron patrones únicos de “*Spoligotyping*” y por lo tanto no tienen relación genética entre ellas, 10 fueron clasificadas como MTB y una como *M. caprae*, señalando ésta última la presencia de zoonosis.

La inclusión de los resultados obtenidos con el método de “*Spoligotyping*” en la base de datos SpolDB4 y miru-vnrplus permitió comparar nuestros aislados con los obtenidos en otras regiones del mundo ya que estos sistemas asignan un número de registro o código SpolDB4, a cada aislado, proporcionando además información del sitio donde el aislado fue identificado. De esta forma fue posible determinar que 19 de los 23 aislados eran similares a los ya identificados en otro lugar del mundo (ver Cuadro 2), mientras que los otros 4 no mostraron similitud con los aislados incluidos en las bases (señalados con círculo azul en la Figura 17).

Los códigos SpolDB4 encontrados fueron SIT 53 en 4 aislados (17.3%) de MTB de los cuales 2 correspondieron a un “*cluster*”. Con SIT 118 y SIT 221 se identificaron 4 (17.3%) aislados cada uno, agrupados en dos “*clusters*” y SIT 258 encontrado en 2 (8.7%) aislados de otro “*cluster*”. Los registros SIT 35, 1547, 1347 y 1221 son patrones únicos representando cada uno un 4.3% de total de aislados de MTB (

Cuadr). El registro SIT 818 encontrado en uno (4.3%) de los aislados corresponde a *M. caprae*.



Análisis en Base de Datos SpolDB4 y www.miru-mitriplus.org disponibles en línea.

Cuadro 2. Código SpoIDB4 ó SIT de aislados de MTB.

Código SpoIDB4 (ST)	PATRONES DE "Spoligotyping"	LUGARES DE AISLAMIENTO
118		ARG, BRA, TURQ, IND, VEN, USA.
1221		MEX, ZAF.
258		MEX, USA
221		USA, ZAF.
1547		BRA, EGI, POL, DNK, IND.
1347		ITA
818		ITA, AUS, BER, ESP.
35		USA, TURQ, RUS, VEN, ZAF
53		ARG, BRA.
?		SIN REPORTE
?		SIN REPORTE
?		SIN REPORTE
?		SIN REPORTE

ARGENTINA (ARG), BRASIL (BRA), TURQUIA (TURQ), INDONESIA (IND), VENEZUELA (VEN), ESTADOS UNIDOS (USA), MÉXICO (MEX), SUDAFRICA (ZAF), EGIPTO (EGI), POLONIA (POL), SOMALIA (DNK), ITALIA (ITA, RUSIA (RUS) AUSTRALIA (AUS) BERLIN (BER), ESPAÑA (ESP).

Con respecto a la técnica de MIRU-VNTR los resultados del número de copias por MIRU obtenidos por amplificación por PCR de 15 loci de los 23 aislados se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Número de copias de MIRU-VNTR por aislado.

CÓDIGO MIRU-VNTR DE 23 AISLADOS DE Mycobacterium DE DURANGO

AISLADO	MIRU 4	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 26	MIRU 31	MIRU 40	Mtub 04	Mtub 21	Mtub30	Mtub39	QUB11B	QUB26	ETRA	ETRC	QUB4156
D-35	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-85	2	3	4	5	3	2	2	2	2	3	4	5	3	4	2
D-147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-199	3	4	3	4	3	4	4	0	4	2	5	6	3	3	0
D-236	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-247	3	3	1	5	3	2	2	2	2	3	4	5	2	4	2
111-DGO	3	3	4	5	3	2	2	2	2	3	4	5	2	4	0
112-DGO	3	6	3	5	3	3	2	2	4	2	5	7	3	3	2
113-DGO	3	3	4	5	3	2	2	2	2	3	4	5	2	4	0
114-DGO	3	2	2	5	3	3	5	4	4	2	3	6	3	3	1
007-DGO	3	3	5	5	3	2	2	2	2	3	4	5	2	4	1
010-DGO	3	3	4	4	3	2	2	2	2	2	5	4	2	4	0
012-DGO	3	3	4	5	4	2	2	2	2	3	5	5	2	4	0
017-DGO	3	4	3	5	2	5	2	2	2	2	4	8	3	3	2
026-DGO	3	3	3	4	2	3	4	4	5	3	6	8	0	3	2
030-DGO	0	0	0	0	0	0	3	1	0	3	0	0	0	0	3
032-DGO	3	3	3	5	3	2	2	2	2	3	5	5	2	4	1
LGV-DGO	3	4	1	4	3	1	2	3	1	2	4	4	2	4	1
048-DGO	3	3	5	5	3	2	3	2	2	3	4	5	2	4	1
050-DGO	3	4	4	5	3	4	4	2	2	3	3	8	1	2	2
054-DGO	3	3	5	4	3	2	2	2	2	3	3	5	2	4	1
055-DGO	4	3	4	4	2	2	3	1	2	2	5	5	4,3	5	1
060-DGO	3	4	3	5	2	4	2	4	4	3	5	9	3,2	3	2

Cada código obtenido fue analizado en la base de datos miru-vnrplus que permite comparar los aislamientos con cepas encontradas en otras partes del mundo.

El dendrograma (Figura 18) confirma que 22 cepas pertenecen a *M. tuberculosis* y una de *M. caprae* (marcado en línea roja aislado D-85), además identifica claramente la presencia de dos “clusters” cada uno de ellos con dos cepas (*cluster 1* aislados 111-DGO y 113-DGO, *cluster 2* aislados D-147 y D-236) genéticamente relacionadas señalando la presencia de cadenas de transmisión. Las dos cepas del cluster 2 mostraron cero copias con los 15 loci amplificados por PCR. No se encontraron en la base de datos cepas que posean este código MIRU.

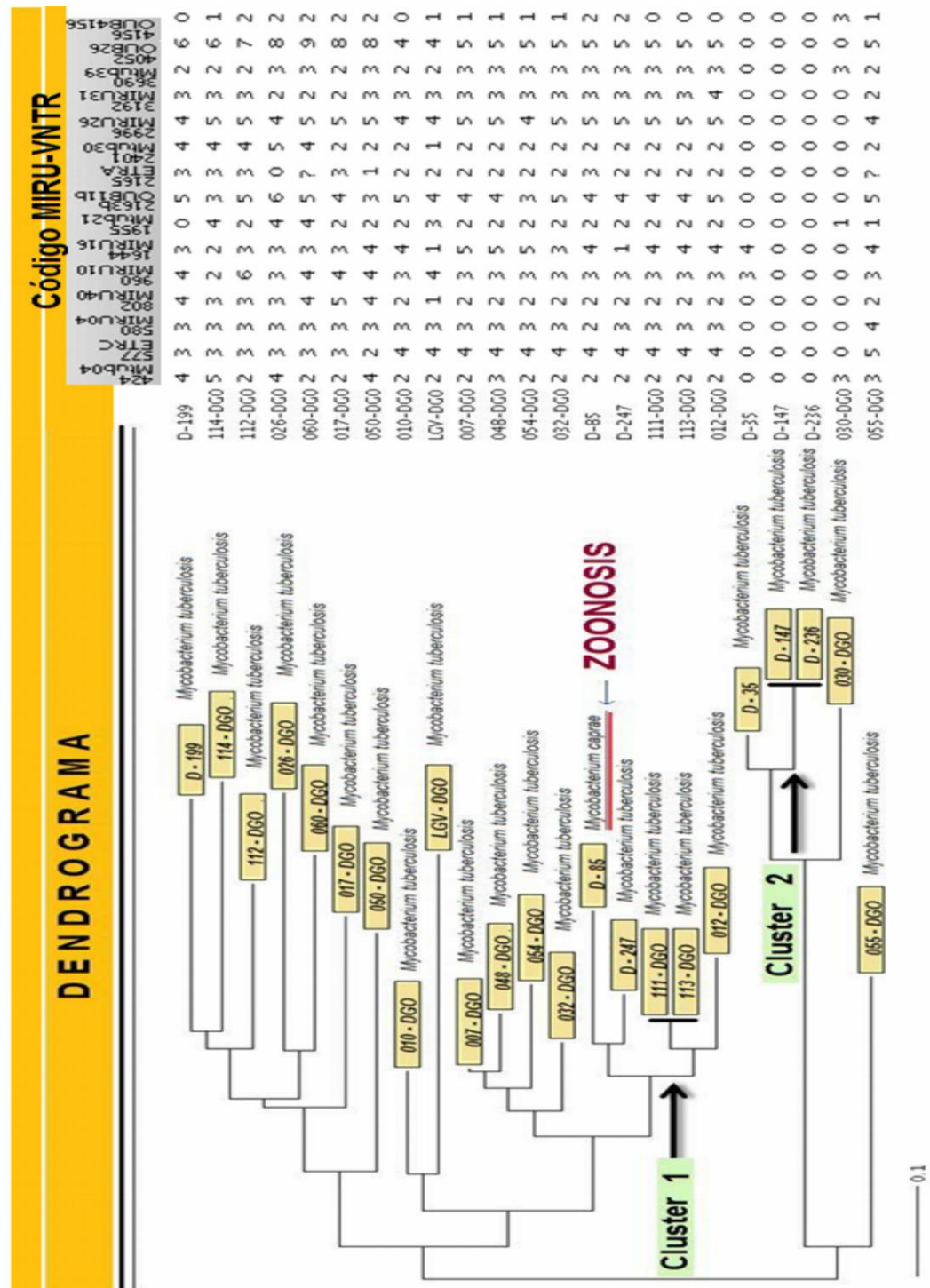


Figura 18. Análisis de Dendrograma por el método MIRU-VNTR.

El cuadro 4 muestra los perfiles de drogorresistencia a diferentes antimicrobianos de 19 (82.6%) de los 23 aislados por el método automatizado BACTEC TB-460. De los cuatro (17.4%) aislados restantes no fue posible la realización de pruebas de susceptibilidad por su contaminación durante el proceso. Las dosis mínimas inhibitorias usadas en éste método fueron: Isoniacida (0.02 a 0.06 µg/ml), Rifampicina (0.1 a 0.2 µg/ml), Estreptomina (0.31 µg/ml), Etambutol (32 µg/ml) y Pirazinamida (8 a 60 µg/ml).⁷⁰ Doce (52.17%) aislados resultaron sensibles a los 5 antimicrobianos evaluados; un aislado (5%) presentó resistencia a isoniacida sin antecedente de uso previo de antifímicos; la cepa con resistencia aislada a pirazinamida corresponde a un aislado de *M. caprae*. Tres aislados (15%) mostraron resistencia al menos a isoniacida y rifampicina por lo que se consideraron MDR. Dos de estos pacientes tenían el antecedente de haber recibido tratamiento antifímico previamente y en el otro solo se pudo documentar que había vivido anteriormente en los Estados Unidos de América. Dos de las cepas que se clasificaron como pertenecientes a un “cluster” por el método de MIRU-VNTR mostraron un patrón de drogorresistencia distinto. Solo se determinó la drogorresistencia de un aislado perteneciente al segundo “cluster” determinado por MIRU-VNTR ya que la otra cepa se excluyó por su contaminación durante el proceso.

Cuadro 4. Perfiles de drogo-resistencia por el método BACTEC TB-460 en aislados de MTB.

Aislado	Especie	Estreptomicina 0.31 µg/ml	Isoniacida 0.02-0.06 µg/ml	Rifampicina 0.1-0.2 µg/ml	Etambutol 32 µg/ml	Pirazinamida 8-60 µg/ml
D-85	<i>M. caprae</i>	S	S	S	S	R
D-199	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
D-236	<i>M. tuberculosis</i>	R	R	R	S	S
111-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
112-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
113-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	R	R	R	S	S
114-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
007-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
010-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	R	S	R	S
012-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
017-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
026-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
032-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
LGV-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	R	S
048-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
050-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	R	R	R	S
054-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
055-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	S	S
060-DGO	<i>M. tuberculosis</i>	S	R	S	S	S

La Figura 19 muestra la ubicación de los casos de tuberculosis tanto en la capital como en el resto del estado de Durango que fueron identificados para el desarrollo del proyecto. Los aislados 111-DGO y 113-DGO identificados por el método de MIRU-VNTR en una cadena de transmisión por *Mycobacterium tuberculosis* uno pertenece al municipio de Santiago Papasquiaro y el otro al poblado de Santiago de Bayacora, a las afueras de la capital (círculos rojos). La siguiente cadena corresponde a los aislados D-147 y D-236 identificados con un código MIRU cero con multidrogorresistencia éstos ubicados en el municipio de Durango (círculos blancos) así como también se muestra el caso de zoonosis por *M. caprae* dentro de la mancha urbana (rectángulo amarillo).

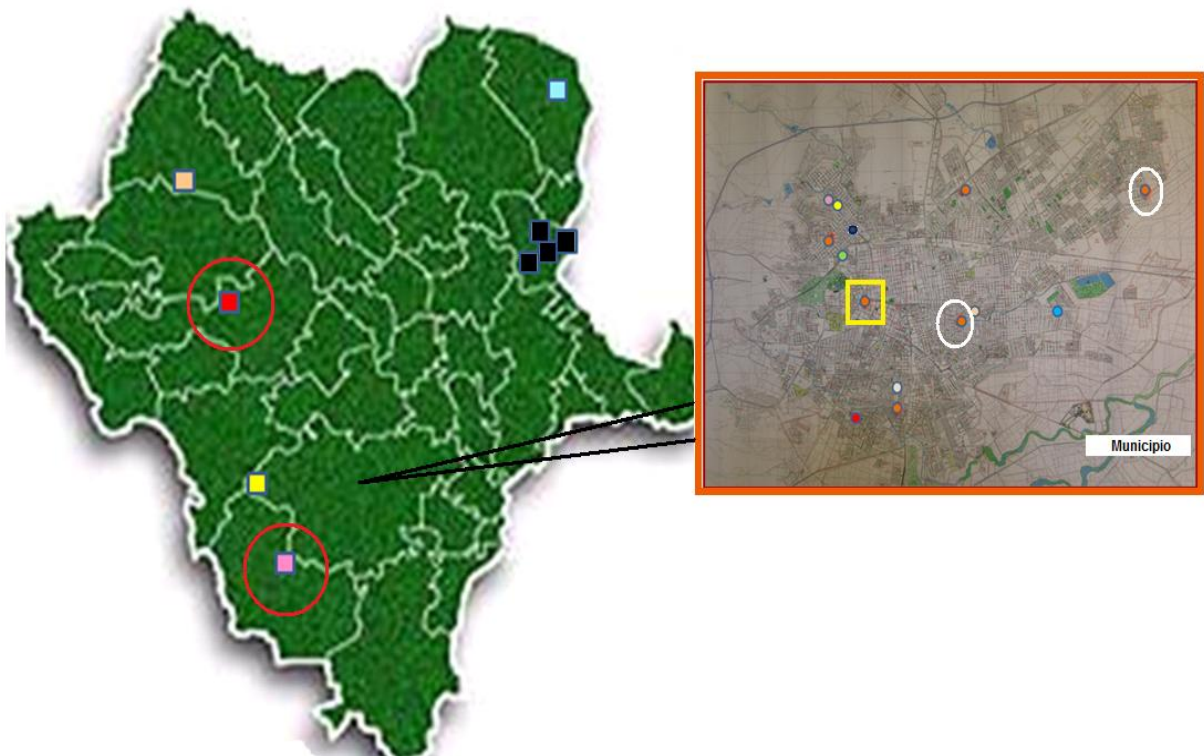


Figura 19. Ubicación de casos de tuberculosis en la capital y en el estado de Durango

VIII. DISCUSIÓN.

Debido a la naturaleza compleja de la historia natural de la tuberculosis los estudios epidemiológicos sobre la transmisión de la enfermedad han sido incompletos y de difícil ejecución. Sin embargo, la implementación de técnicas moleculares para la tipificación de *M. tuberculosis*, ha contribuido de forma importante a la comprensión de las dinámicas de transmisión de este microorganismo.

En este estudio, por primera vez en el estado de Durango, se utilizaron las técnicas de “*Spoligotyping*” y MIRU-VNTR para caracterizar molecularmente cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con tuberculosis pulmonar que reciben atención médica en hospitales de la ciudad de Durango. De esta forma se pudo documentar la presencia de dos cadenas de transmisión en nuestra entidad e identificar la presencia de cepas con características moleculares diferentes a las reportadas en las bases de datos mundiales.

La técnica de “*Spoligotyping*” ha sido utilizada en el ámbito internacional para apoyar programas sobre la epidemiología de la tuberculosis humana.⁶⁸ Brevemente, esta técnica analiza la presencia o ausencia de 43 secuencias espaciadas dentro del locus DR. Se le considera un método de agrupamiento de familias, pero no permite establecer con certeza rutas de transmisión o brotes epidémicos.⁶⁹ Una ventaja importante en esta metodología es que permite analizar, de manera simultánea, un número importante de cepas. Una segunda ventaja es la disponibilidad de la base de datos internacional SpolDB4.⁷¹ la cual contiene la colección más completa y actualizada de los *espiligotipos* de MTB encontrados en distintos países ya que SpolDB4 incluye 39,295 perfiles representativos de 141 países de los cuales 1,939 son compartidos.⁷²

En éste estudio los *espiligotipos* obtenidos de los 23 aislados de *Mycobacterium* mostraron patrones similares a los encontrados en países como Argentina, Brasil, Sudáfrica, Australia, Estados Unidos, Italia, Egipto y en otras zonas de México. Con esta técnica fue posible determinar que uno de los aislados era *M. caprae* sugiriendo la presencia de un caso de zoonosis.

En el estudio epidemiológico realizado se confirmó que este paciente durante su niñez y juventud había trabajado en establos, en contacto directo y constante con

ganado vacuno y caprino sugiriendo que la micobacteria se transmitió por vía aérea de los animales al paciente. De acuerdo con la búsqueda bibliográfica realizada, hasta el momento de la redacción de este escrito, en nuestro país, no existen reportes confirmados de tuberculosis pulmonar por *M. caprae*.

En un estudio realizado en España sobre epidemiología molecular de la tuberculosis se analizaron 110 cepas provenientes de diferentes tejidos, en 15 de 79 muestras pulmonares se identificó *M. caprae*. Una pequeña parte de los casos de tuberculosis humana por *M. bovis* y *M. caprae* provenían de países endémicos con tuberculosis bovina. Un alto porcentaje de estos casos tenía antecedentes de exposición laboral directa a ganado.⁷³

A pesar de que solo se identificó un solo caso de zoonosis, posiblemente como resultado de la población muestreada y el enfoque a tuberculosis humana, su presencia señala la importancia de los estudios moleculares que permitan definir con mayor precisión los mecanismos de transmisión y de esta manera establecer las medidas de control adecuadas para la población humana con exposición laboral y para la realización de estudios en ganado vacuno y caprino de la entidad.

Con respecto a los cuatro patrones no reportados en la base de datos SpolDB4 para otras partes del mundo es necesario ampliar el estudio con mayor cantidad de aislados para comprobar la existencia de aislados similares en otros Estados o regiones de otros países para determinar si en verdad es o no un aislados autóctono o de amplia dispersión. La naturaleza descriptiva y transversal de este estudio no nos permite obtener más conclusiones a este respecto.

El análisis de MIRU-VNTR de 23 aislados estudiados mostró 19 cepas (83%) con patrones únicos, es decir que no están epidemiológicamente relacionados mientras que 4 de las cepas (17%) estaban integradas en 2 clusters. Este análisis permitió diferenciar cepas que aparentemente tienen el mismo patrón de “Spoligotyping” y confirmar aquellos aislados con patrones compartidos y que fueron agrupadas en clusters. Este hallazgo es semejante a lo reportado por un grupo de investigadores en el 2007⁷⁴ donde demuestra que MIRU-VNTR es capaz de discriminar y diferenciar aislados con el mismo patrón de “Spoligotyping”.

Nuestros resultados sugieren que la tuberculosis pulmonar en Durango se debe principalmente a reactivación endógena de infecciones adquiridas en el pasado⁷⁵ y que es favorecida por las alteraciones del estado inmunológico secundarias a la presencia de enfermedades crónicas tales como la DT2 (39%) y factores que favorecen su diseminación como el vivir en hacinamiento (39%) o el estar en contacto directo con personas enfermas con tuberculosis activa, condiciones que se encontraron en el 39% de los casos para las dos primeras y en el 30.5% para la última. Así mismo se confirman dos cadenas de transmisión por *Mycobacterium tuberculosis* evidenciando dispersión regional.

En el análisis se identificaron dos aislados de MTB con un código MIRU-VNTR cero. Se realizó una amplificación por PCR de estos aislados para confirmar con el uso de secuencias específicas de IS6110 y 16s RNA, que efectivamente dichos aislados pertenecían a *M. tuberculosis*. Este tipo de variantes genéticas no son comunes para aislados de *Mycobacterium*, utilizando estos métodos específicos para el complejo por lo tanto es necesario realizar secuenciación completa de dichos aislados para confirmar si se trata de clonas de MTB no reportadas en otros países, así mismo señala la necesidad de continuar con estudios moleculares prospectivo que permitan dar seguimiento a la capacidad de diseminación de estas clonas. La naturaleza transversal de este trabajo solo nos permite plantear la hipótesis de nuevas clonas. Sin embargo, sus características epidemiológicas e implicaciones clínicas futuras no pueden ser determinadas.

Con respecto a la drogorresistencia encontramos que un 37% de los aislamientos presentaban resistencia al menos a un fármaco mientras que un 63% de los aislados analizados presentan sensibilidad a todos los antimicrobianos considerados como de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis. Este resultado es semejante al reportado en el 2009 por Zazueta et al⁷⁶ que encontraron en todos los casos analizados (casos nuevos y casos tratados) una mediana de drogorresistencia en México de 33% con un mínimo de 21.5 y un máximo de 72.2 %. No disponemos de información previa de nuestro estado sobre perfil de drogorresistencia de aislados de tuberculosis para poder determinar la evolución de la misma. En este estudio se documentaron tres aislados, que constituyen el 15 % del total analizado, con MDR,

dos de ellos fueron resistentes además de isoniacida y rifampicina a estreptomina y uno a etambutol. En dos de estos pacientes se documentó el antecedente de exposición previa a fármacos antituberculosos y en uno el antecedente de residencia en los Estados Unidos de Norteamérica. La mediana de MDR documentada en México es de 17 % (mínimo 6.2 y máximo 64%) por lo que en nuestra entidad se presenta una situación similar a la del resto del país. Además de los 3 pacientes con MDR se encontró resistencia a isoniacida en dos pacientes; en uno (5%) resistencia solo a este fármaco y sin antecedentes de exposición previa a medicamentos antituberculosos por lo que se considera resistencia primaria, en el otro paciente se encontró además de isoniacida resistencia a etambutol, sin embargo, este paciente tenía antecedentes de exposición previa a estos fármacos. En este estudio se documentó un caso de zoonosis por *M. caprae* el cual presentó resistencia solo a pirazinamida, resultado esperado ya que este grupo presenta resistencia intrínseca a este fármaco.

Debido al carácter ambispectivo de este estudio y a su enfoque en la epidemiología molecular de la tuberculosis en el municipio de Durango, los resultados de las pruebas de susceptibilidad no se tuvieron de forma inmediata posterior al aislamiento por lo que se tomaron decisiones para dar el tratamiento a los a pacientes sin embargo estos resultados nos permiten tener un panorama de la drogorresistencia en nuestro estado y serán de utilidad para la elaboración o actualización de guías para el tratamiento de la tuberculosis en nuestra entidad.

IX. CONCLUSIONES.

- Se identificaron 4 aislados de *Mycobacterium tuberculosis* con patrones relacionados confirmando 2 cadenas de transmisión por MIRU-VNTR evidenciando la dispersión regional de MTB.
- Se identificaron 4 aislados de *Mycobacterium tuberculosis* aun no reportados en la base de datos internacional SpolDB4 y MIRU-VNTR.
- Se obtuvieron dos aislados con código MIRU cero que sugiere la existencia de clonas autóctonas de MTB en Durango.
- Se identificó el primer caso de zoonosis por *Mycobacterium caprae* en muestras pulmonares en el estado de Durango.
- Se identificaron tres aislados de MTB con multidrogorresistencia por el método de Bactec TB-460.

X. SUGERENCIAS PARA ESTUDIOS POSTERIORES.

Es importante realizar estudios de genotipificación incluyendo barridos epidemiológicos a partir del caso índice así como sus contactos intrafamiliares para identificar personas con sospecha de tuberculosis esto con la finalidad de reforzar los programas de control y prevención de la enfermedad para evitar su diseminación en el estado de Durango y Ciudades aledañas.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

- ¹ Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, and S. T. Cole. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:3684–3689.
- ² Daniel TM, Bates JH, Downer's KA. History of tuberculosis. Bloom BR, editors, *Tuberculosis: pathogenesis, Protection and Control*. Washington D.C. American Society for Microbiology; 1994 pp. 13-19.
- ³ M. Kato-Maeda, 1 P.J. Bifanj, 2 B.N. Kreiswirth, 2 and P.M. Small1; March 2001; The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*; *The Journal of Clinical Investigation*; Vol. 107; pp. 533-37.
- ⁴ Stead, W. W. 1997. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin. Chest Med.* 18:65–77.
- ⁵ Koneman W. *Mycobacterias. Diagnóstico Microbiológico*. 1992 3A. EDICIÓN. Ed. Médica Panamericana . Buenos aires.
- ⁶Manual de Curso Latinoamericano Sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto de Biomedicina,UCV, Caracas, Venuezuela.
- ⁷ William N, Rom; *Tuberculosis: patogénesis, Protection and control*.Washington D.C. American Society for Microbiology; 1994 1RA Ed; USA Cap 8.
- ⁸ Cole ST, Telenti A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J* 1995; 8:701-13.
- ⁹ Balasubramanian V, Wiegshaus EH, Taylor BT, Smith DW Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tuber Lung Dis.* 1994; 75(3): 168-178.
- ¹⁰ American Thoracic Society, 2000: Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. American Thoracic Society. *MMWR Recomm Rep.* 2000; 49 (RR-6): 1-51.
- ¹¹ Eisenach K, Sifford M. et al Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction, *Am Rev Respir Dis.* 1991. Pp. 144: 1160-3.

-
- ¹² Geo F, Brooks, Janet S. Batel, Stephen A. More, *Microbiología Médica de Jawetz, Menlick y Adelberg*, Editorial Manual Moderno 18^a Edición 2005, pp. 313-21.
- ¹³ Dye C., Scheele S., Dolin P., Pathania V., Raviglione M.C., (1999) Global burden of Tuberculosis estimated incidence, prevalence and mortality by Country. *JAMA* 282:677-686.
- ¹⁴ World Health Organization, (WHO) Tuberculosis Facts Sheet, Nr 104, 2001.
- ¹⁵ Secretaría de Salubridad y Asistencia. 2003. Boletín Dirección General de Epidemiología. S.S.A.
- ¹⁶ Plataforma única de información. Módulo Tuberculosis. 02/03/08. Información Preliminar Cubos de Mortalidad 1990-2006. SINAIS, DGIS, SSA. Población a mitad del año. Indicadores demográficos 1990-2030. CONAPO
- ¹⁷ ESTADÍSTICAS DE LA SSA DEL ESTADO DE DURANGO 2006, EPIDEMIOLOGIA Y MEDICINA PREVENTIVA.
- ¹⁸ Farga, op. cit. Completar cita
- ¹⁹ Ponce-De-León A., Garcia-Garcia M de L., Garcia-Sancho M.C., (2004) Tuberculosis and diabetes in southern Mexico. *Diabetes Care* 27(7):1584-90.
- ²⁰ McCray E, Weinbaum CM, Braden CR, Onorato IM. The epidemiology of tuberculosis in the United States. *Clin Chest Med* 1997;18:99-113.
- ²¹ Raviglioni MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995;273(3):220-6.
- ²² Martin G, Lazarus A. Epidemiology and diagnosis of tuberculosis: recognition of at-risk patients is key to prompt detection. *Postgrad Med* 2000; 108(2):42-54.
- ²³ Bates JH, Stead WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin North Am* 1993; 77(6):1205-17.
- ²⁴ Griffith D, Kerr C(1996). "Tuberculosis: disease of the past, disease of the present", *J Perianesth Nurs*. Vol. 11. n.º 4. pp. 240–5. DOI 10.1016/S1089-9472(96)80023-2. PMID 8964016.
- ²⁵ Cf. Organización Panamericana de la Salud, *Las condiciones de salud en las Américas*, vol. II, Publicación Científica 52 A, 1990; y *World Health Statistics Annual*, 1989.

-
- ²⁶ Elizabeth I. 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV Epidemic., Arch Intern Med. 163:1009-1021.
- ²⁷ Bentwich Z, Maartens G, Torten D, Lal AA, Lal RB. Concurrent infections and HIV pathogenesis. AIDS 2000; 14:2071-81.
- ²⁸ Casal M; Microbiología Clínica de las enfermedades por micobacterias. Universidad de Cordoba España.
- ²⁹ Jacobs RF; Multiple-drug resistant tuberculosis Clin Infect Dis; 19 1-10.
- ³⁰ Virtanene S. A study of nitrate reduction by mycobacteria; Acta tuberc. Scand. Suppl 48: 1-119.
- ³¹ Fleischmann R D, Alland D, Eisen JA, Carpenter L., White O, Peterson J., et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J Bacteriol 2002; 184: 5479-90.
- ³² Lok K H, Benjamin W H Jr, Kimering M E., Pruitt V, Lathan M, Razeq J, et al. Molecular differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains without IS6110 insertions. Emerg Infect Dis 2002; 8: 1310-3..
- ³³ Christian Baldeviano V1, Neyda Quispe T1, César Bonilla A2, Dauma Gastiaburu3, José Pro C3, Luis F. Llanos-Zavalaga1. Perfiles Genéticos (RFLP-*IS6110*) y Resistencia a Drogas en Aislamientos de *M. tuberculosis* de Pacientes Internados en un Hospital Referencial del Callao Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública 2003; 20 (2).
- ³⁴ Van Embden J, Cave M, Crawford J, Dale J, Eisenach K, Gicquel B, et al. Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology. J. Clin Microb. 1993; 31: 406-409.
- ³⁵ Johana E. Hernández, Martha I. Murcia y Fernando de la Hoz. Molecular epidemiology of tuberculosis in Bogotá in clinical isolates obtained over an 11-year period. Rev. Salud Pública. 10 (1): 126-136, 2008.
- ³⁶ Philip Supply, Caroline Allix, Sarah Lesjean. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin Microb. 2006, p. 4498-4510.

³⁷Bo-Young Jeon, Sungmo Je, Jinhee Park, Variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Gyeonggi-do, Korea, J O Journal Veterinary Science. *J. Vet. Sci.* (2008), 9(2), 145-153.

³⁸Mara Cardoso Oelemann, Roland Diel, Vincent Vatin, Assessment of an Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit–Variable-Number Tandem-Repeat Typing System Combined with Spoligotyping for Population-Based Molecular Epidemiology Studies of Tuberculosis. *JF CLIN MICROBIOLOGY*, Vol. 45, No. 3 Mar. 2007, p. 691–697.

³⁹Takayuki Wada, Shinji Maeda, Atsushi Hase and Kazuo Kobayashi. Evaluation of variable numbers of tandem repeat as molecular epidemiological markers of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *Journal of Medical Microbiology* (2007), 56, 1052–1057.

⁴⁰J. W. Dale, D. Brittain, A. A. Cataldi, D. Cousins. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *THE LANGUAGE OF OUR SCIENCE. 2001 INT J TUBERC LUNG DIS* 5(3):216–219.

⁴¹Henk van Deutekom, Philip Supply, Petra E. W. de Haas, Eve Willery, Susan P. Hoijing, Camile Locht, Roel A. Coutinho, and Dick van Soolingen; Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat Analysis, a More Accurate Method for Identifying Epidemiological Links between Patients with Tuberculosis. *J Clin Microbiology*; 2005, p. 4473-4479.

⁴²Skuce, R. A., T.P. McCorry, J.F. McCarroll, S. M. Roring, A. N. Scott, D. Brittain, S. L. Hughes, R. G. Hewinson, and S. D. Neill. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 148: 159-528.

⁴³Evgueni Savine, Robin M. Warren, Gian D. van der Spuy, Nulda Beyers, Paul D. van Helden, Camille Locht, and Phillip Supply; Stability of Variable-Number Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units from 12 Loci in Serial Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin Microbiology* 2004; pp. 4561-4566.

⁴⁴Richard Frothingham, and Winifred A. Meeker-O'Connell; Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable number of tandem DNA repeats.

⁴⁵TUBERCULOSIS FARMACORRESISTENTE Y ESTRATEGIA TAES-PLUS EN MÉXICO. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2001/sem34/edit34.pdf>.

⁴⁶Laszlo A, de Kantor IN. A random sample survey of initial drug resistance among tuberculosis cases in Latin America. *Bull World Health Organ* 1994;72: 603–610.

⁴⁷García–García ML, Valdespino–Gómez JL, Palacios–Martínez M, Mayar–Maya, García–Sancho C, Sepúlveda–Amor J. Tuberculosis y SIDA en México. *Salud Pública Méx* 1995;37:539–548.

⁴⁸Sifuentes OJ, Ponce de León A, Camacho MFE, et al. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos: características clínicas y factores de riesgo. *Rev Invest Clin* 1995;47:273–281.

⁴⁹Granich RM, Balandrano S, Santaella AJ, et al. Survey of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican States, 1997. *Arch Intern Med* 2000;160:639–644.

⁵⁰Peter CR, Schultz E, Moser K, et al. Drug–resistant pulmonary tuberculosis in the Baja California–San Diego County border population. *West J Med* 1998;169: 208–213.

⁵¹Olvera CR. Farmacorresistencia secundaria en tuberculosis. Tendencia en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001;14:151–159.

⁵²CENAVE <http://www.cenave.gob.mx/>

⁵³Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mathler HT, Menon NK, Mitchison DA *et al.* Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs. *Bull Wld Hlth Org* 1969;41:21-43.

⁵⁴Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti M. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. *J Clin Microbiol* 2002;40:607-10.

- ⁵⁵Scarparo C, Ricordi P, Ruggiero G, Piccoli P. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. *J Clin Microbiol* 2004;42:1109-14.
- ⁵⁶Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Gee B et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2324-7.
- ⁵⁷Luna-Herrera J, Martínez-Cabrera G, Parra- Maldonado R, Enciso-Moreno JA, Torres-López J, Quesada-Pascual F *et al.* Use of received operating characteristics curves to assess the performance of a microdilution assay for determination of drug susceptibility of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:21-7.
- ⁵⁸Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2720-2.
- ⁵⁹Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin micotiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to secondline drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3616-9.
- ⁶⁰Collins LA, Franzblau SG. Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1004-9.
- ⁶¹Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernández A *et al.* Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar blue assay. *J Clin Microbiol* 1998;36:362-6.
- ⁶²Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health U.S.A. 2006.

-
- ⁶³Van Soolingen D, De Hass P, Hermans P, Groenen P, van Embden. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strains differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1993;31:1987-1995.
- ⁶⁴Petroff SA. 1915. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces J Exp Med 21:38-42.
- ⁶⁵Marcos Mancilla E., Alexis Martínez H., Christian Palavecino B., Germán Rehren S., Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la Xª Región de Chile. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. Microbiología Clínica. 23 abril 2006.
- ⁶⁶Van Soolingen D, Hermans P, de Hass P, Sool D, Van Embden J. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1991;29:2578-2586.
- ⁶⁷Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Domínguez L, Vidal D, Domingo M, et al. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 2734-40.
- ⁶⁸Sola C, Horgen L, Maisetti J, Devallois A, Goh K S, Rastogi N. Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 1122-4.
- ⁶⁹Siddiqi SH, 1996. BACTEC 460TB System. Product and Procedure Manual. Rev E. Becton Dickinson Diagnostic instrument Systems. Marylandf USA Sección III. Pag III-1- III-9.
- ⁷⁰Tania Bibiana Porras, Clara Inés León, Martha Inírida Guerrero, Anandi Martin Evaluación de métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia. Biomédica 2005;25:22-33
- ⁷¹Drobniewski F, Gibson A, Ruddy M. Evaluation and Utilization as a Public Health Tool of a National Molecular Epidemiological Tuberculosis Outbreak Database within the United Kingdom from 1997 to 2001. J Clin Microbiol. 2003; 41:1861-1868.

⁷²Johana E. Hernández,, Martha I. Murcia y Fernando de la Hoz. Epidemiología Molecular de la Tuberculosis en Bogotá en Aislados Clínicos obtenidos durante 11 Años. Rev. Salud pública. 10 (1); 126-136;2008.

⁷³Savine E, Robin M. Warren R, van der Spuy G, Reyers N, van Helden P, Lochter C, et al. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis* J Clin Microbiol 2002; 40: 4561-6.

⁷⁴Wendy A. Cronin, Jonathan E. Golub, Laurence S, Magder, Nancy G. Baruch, Monica J. Lathan. Epidemiologic Usefulness of Spoligotyping for Secondary Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Low Copy Numbers of IS6110; Journal of Clinical Microbiology, Oct. 2001, p. 3708-3711.

⁷⁵Philip Supply, Sarah Lesjean, Evgueni Savine, Kristin Kremer, Dick Van Soolingen, and Camille Lochter; Automated High-Throughput Genotyping For Study Of Global Epidemiology Of *Mycobacterium tuberculosis* Based On Mycobacterial Interspersed Repetitive Units; Journal of Clinical Microbiology; 2001; p. 3563-357.

⁷⁶Jorge Zazueta-Beltran, Claudia León-Sicairos, Adrián Canizalez-Roman. Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. The Sinaloa State Public Health Laboratory, Secretary of Health, 80020 Culiacan Sinaloa, Mexico. Regional Review Article.

XII. AGRADECIMIENTOS.

Agradezco el apoyo y la colaboración a las siguientes instituciones que hicieron posible el término de éste proyecto:

- **Laboratorio Estatal de Salud Pública**

Q.F.B. Nelly Patricia Montes Ceceñas, Dra. Luz Leticia Ontiveros Martínez,
Dr. Joaquín Fernando Guerrero, Dr. Edgar Rodríguez Hernández.

- **Laboratorio de Microbiología del Hospital General de Durango**

Dr. Juan Carlos Tinoco Favila, T.L.C. Lorena Salcido Gutiérrez, Enf. María Cruz
Pérez Prado, Enf. Teresa Olivas Soto.

- **Unidad de Investigación Biomédica del IMSS Durango**

Dr. Gerardo Martínez Aguilar, Dr. Jesús Fernando Guerrero y Dra. Martha Rodríguez

- **Unidad de Investigación Médica IMSS Zacatecas**

Dr. José Antonio Enciso Moreno, Biol. Leonor Enciso Moreno, TL.C. Yolanda García

- **Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica**

A todo el equipo de trabajo

- **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral
Regional del Instituto Politécnico Nacional CIIDIR-IPN**

Dra. en C. Martha Guadalupe Sosa Macías, Dr. en C. Carlos Galaviz Hernández, Dr.
en C. Ismael Lares Asseff, MVZ-PhD. Francisco Daniel Hernández Velázquez, M. en
C. Néstor Naranjo Jiménez

- **Al instituto Politécnico Nacional por otorgarme la beca PIFI y el apoyo de
MOVILIDAD ACADÉMICA.**

- **AI INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL por el apoyo de becas.**

A todos Muchas Gracias!

XII. ANEXOS

ANEXO 1

Tinción de Ziehl-Neelsen (ZN).

Preparación de laminillas para tinciones

- 1.- Trazar un círculo con lápiz de diamante en el centro de un portaobjeto previamente identificado.
- 2.- Colocar una gota del sedimento de la muestra.
- 3.- Colocarla en centro del círculo trazado en el portaobjetos.
- 4.- Dejar secar, fijar con metanol y al calor (80°C/15 min).
- 5.- Realizar la tinción.

Colocar las laminillas en un bastidor en la tarja y agregar colorante Fucsina cubriendo todo el portaobjetos

Calentar a emisión de vapores durante 8 min y lavar con agua

Decolorar con alcohol ácido durante 2 min y lavar con agua

Agregar azul de metileno cubriendo todo el portaobjetos por 2 min, lavar con agua y dejar secar.

Observar al microscopio con objetivo de inmersión 100 X.

ANEXO 2

Proceso de digestión y descontaminación de muestras de expectoración por el método de Petroff.

- 1.- Transferir las muestras a tubos Falcón de 50 ml, previamente etiquetados.
- 2.- Las muestras con volumen mayor a 5 ml se centrifugan (3000 rpm/15 min), y se decantan hasta un volumen aproximado de 5 ml. A partir de este momento el proceso debe de ser continuo, para no dañar las micobacterias.
- 3.- Agregar con respecto al volumen de la muestra, un volumen igual de solución (Citrato de Sodio-Hidróxido de sodio y N-cisteína, ver apéndice preparación de reactivos).
- 4.- Agitar vigorosamente en vortex durante 20 seg., repetir agitación en forma similar después de 5 min y repetir cada 5 min. Dos veces más todo a temperatura ambiente.

- 5.- Agregar Buffer de fosfatos hasta completar un volumen aproximado de 45 ml.
- 6.- Agitar hasta formar un remolino en toda la muestra.
- 7.- Centrifugar 3000 rpm/20 min.
- 8.- Decantar con cuidado hasta un volumen mínimo, evitando la pérdida del sedimento.
- 9.- Resuspender la pastilla, tomar una gota y depositarla en un portaobjetos (previamente identificado con los datos correspondientes) y dejar secar.
- 11.- Ajustar pH a neutralidad, añadiendo buffer fosfatos hasta completar máximo 3 ml, si no se ajusta el pH con este volumen, realizar un lavado más, repetir el procedimiento hasta obtener pH neutro.
- 12.- Etiquetar tubos con medio Löwestein Jensen (LJ).
- 13.- Añadir antibiótico (PANTA: LJ 0.1) a cada tubo para cada una de las muestras a sembrar.
- 15.- Inocular 0.5 ml de muestra digerida a cada tubo LJ.
- 17.- Incubar LJ y con la tapa semi abierta en estufa CO₂ a 37° C por ocho semanas, revisar cada semana para visualizar crecimiento y detectar positivos, las muestras cuyos cultivos presenten crecimiento antes de 7 días, se volverán a descontaminar y resembrar.

ANEXO 3

Extracción de DNA por el método estandarizado por Van Soolingen

Utilizar los cultivos de 8 semanas de crecimiento para la extracción de DNA genómico por el método descrito por Van Soolingen.

Se recomienda realizar tinción de Zielh-Neelsen a todas las muestras para extracción DNA genómico, esto para descartar contaminaciones en las muestras.

La extracción de DNA a partir de cepas obtenidas en cultivos de Löwenstein-Jensen.

- 1.- Dentro de una campana de flujo laminar clase II A2 (NUARE, Francia), transferir 2 asadas de cada aislado a un tubo eppendorf de 2ml (tapón rosca) que contiene 400 µL de TE 1X (Tris-HCl 50 mM pH= 2 EDTA 50 mM, pH= 8.0). Realizar un duplicado por aislado.

- 2.- Inactivar por calentamiento en baño María a 80°C por 20 min.
 - 3.- Dejar enfriar a temperatura ambiente. NOTA: Colocar la solución de CTAB-NaCl a precalentar a 65°C.
 - 4.- Adicionar 50 µL de Lisozima (10 mg/ml) (Boehringer Mannheim, Alemania) y vortexear en la máxima posición.
 - 5.- Incubar en el termo mixer a 37°C con agitación (en la posición 7) por 1h. Para lisar la pared celular.
 - 6.- Agregar una mezcla de 70 µL de SDS 10% (Sigma, St Louis, USA) y 5µL de Proteinas K a una concentración 10 mg/ml (Bioehringer Mannheim, Alemania), por separado.
 - 7.- Agitar en vortex por 30 seg e incubar a 65°C por 10 min, para precipitar los complejos de glicoproteínas, lipoproteínas y carbohidratos.
 - 8.- Adicionar 100 µL de NaCl 5M y agitar 5 seg en vortex, enseguida agregar 100 µL de CTAB-NaCl (4.1% NaCl/ 10% CTAB) previamente calentado a 65°C. Agitar vigorosamente en vortex hasta formar una solución lechosa e incubar a 65°C por 10 min para deshacer los complejos de lípidos y proteínas.
 - 9.- Agregar 750 µL de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1(Sigma, St Louis, USA). Agitar manualmente.
 - 10.- Centrifugar a 14 000 rpm por 10 min (para la separación de fases) en una centrifuga eppendorf 5415C (Brinkmann, Instruments, Wetsbury NY, USA), para separar la fase acuosa, donde se encuentran los ácidos nucleicos disueltos de la fase orgánica.
 - 11.- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y estéril de 1.5 ml. Hacer esto con puntas de 200 µL para recuperar poco a poco la fase acuosa y evitar acarrear fase orgánica.
- NOTA: Colocar los tubos en hielo y salir del cuarto de contención para continuar el protocolo.
- 12.- Adicionar a cada tubo 0.6 a 0.7 volúmenes (450 µL aprox) de isopropanol frío (Sigma, St. Louis, USA). Agitamos despacio por inmersión para precipitar el DNA. Es importante detener la agitación cuando se observa el precipitado.

13.- Mezclar bien e incubar por un mínimo de 2 h a -20°C .

15.- Centrifugar a 14 000 rpm durante 20 min a una temperatura de 4°C .

16.- Retirar completamente el isopropanol, con cuidado de no llevarse la pastilla de DNA.

17.- Adicionar 500 μL de etanol al 70% frío. Para retirar el exceso de sales.

18.- Centrifugar a 14 000 rpm durante 15 min a 4°C .

19.- Retirar el etanol, dejando aproximadamente 15 μL , centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones.

20.- Con una punta de 20 μL se retira el resto de etanol.

21.- Finalmente el DNA se resuspende en agua estéril tipo MilliQ. La cantidad en la que se resuspende la pastilla depende de la cantidad de precipitado que se haya observado en el paso 15, si no se observó se utilizarán 20 μL , si se observó más se resuspenderá en 35 μL

Para confirmar la integridad del DNA correr una alícuota en un gel de agarosa al 0.8%, guardar a -20°C hasta su uso.

ANEXO 4

“Spoligotyping”.

Amplificación del locus DR a partir del DNA obtenido de los cultivos.

1.- Realizar PCR.

Iniciadores:

DRa biotina*5' GGTTTTGGGTCTGACGAC 3'

DRb 5' CCGAGAGGGGACGGAAAC 3'

Mezcla de reacción:

Reactivo	Conc. Inicial	Vol (uL) / 1 reacción	Conc. Final
Amortiguador	10X	5	1X
MgCl ₂	30 Mm	5	3 mM
dNTP's	5 Mm	10	1 mM
DRa	10 pmol/μL	2	0.4 pmol/μL
DRb	10 pmol/μL	2	0.4 pmol/μL
Taq polimerasa	5 U/μL	0.5	0.05 U/μL
DNA	10 ug/MI	10	100 pg/μL
H2O		15.5	
Volumen final		50	

Condiciones de reacción:

a.- Desnaturalización inicial a 96°C por 3 min.

b.- 20 ciclos:

Desnaturalización 1 min a 96°C.

Alineación 1min a 57°C.

Espacio	Secuencia del oligonucleótido	Espacio	Secuencia del oligonucleótido
1	ATAGAGGGTCGCCGGTTCTGGATCA	23	AGCATCGC TGAT GCGGTCCAGCTCG
2	CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG	24	CCGCCTGC TGGGTG AGACGTGC TCG
3	CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA	25	GATCAGCGACCACCGCACCTGTCA
4	ACGTCATACGCCGACCAATCATCAG	26	CTT CAGCACC AC CATCATCCGGCGC
5	TTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA	27	GGATTC GTGATCTCTCCCGCGGAT
6	CGTCGTCATTTCCGGCTTCAATTC	28	TGCCCCGGCGTTAGCGAT CACAAC
7	GAGGAGAGCGAGTACTCGGGCTGC	29	AAAT AC AGGC TCCACGACACGACCA
8	CGTGAAACCGCCCCAGCCTCGCCG	30	GTTGCCCCGCGCCTT TTCCA GCC
9	ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC	31	TC AGACAGG TTC GCGT CGAT CAAGT
10	TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC	32	GACCAAATAG GTAT CGGCGTGTTC A
11	GTGAGCAACGCGCGCGCAACCTGG	33	GACATGACGCGGT GCCGC ACTTGA
12	ATATCTGCTGCCCGCCGGGAGAT	34	AAGTCACCTCGCCCACCCGTCGAA
13	GACCATC ATTGC CATTCCCT CTCCC	35	TCCGTACGCTCGAAACGCT TCCAAC
14	GGTGTGATGC GGATGGTCGGCTCGG	36	CGAAATCCAG CACCACATCCGCAGC
15	CTTGAATAACGC GCAGT GAAT TTCG	37	CGCGAACTC GTCCAC AGTCCCCTT
16	CGAGRRC CCGRCAG CGRCGRAAATC	38	CGTGGATGGCGGATGCGTT GTGCGC
17	GCGCC GGCCC GCGC GGAT GACTC CG	39	GACGATGCCAGTAAAT CGGCGTGG
18	CATGGACCCGGGCGAGCTGCAGATG	40	CGCCATCTGTGC CTCATACAGTCC
19	TAAGTGGCTTGGCGTGATCCTGGT	41	GGAGC TTTCCGGCT TCTATC AGGTA
20	TTGAC CTCGCCA GGAGAGAAGATCA	42	ATGGT GGGACATGGACGAGCGGAC
21	TCGATGTCGATGTCCAATCGTCGA	43	CGCAGAATC GCACCGGGTGCGGGAG
22	ACC GCAGAVGGCACGATTGAGAC AA		

Extensión: 30 seg a 72°C.

c.- 15min a 72°C.

Nota: Los productos se guardan a -20°C hasta su uso.

Hibridación de los productos de PCR y detección.

Los productos amplificados se hibridan con un conjunto de 43 oligonucleótidos inmovilizados en una membrana por enlace covalente (Isogen, Bioscience BV, Holanda). Cada uno de estos oligonucleótidos corresponde a una de las secuencias espaciadoras polimórficas de DNA dentro del locus DR.

- 1.- En un eppendorf agregar 20 µL del producto de amplificación.
- 2.- Adicionar 150 µL de buffer 2X SSPE/1% SDS.
- 3.- Desnaturalizar durante 10 min a 100°C.
- 4.- Lavar la membrana en 250 ml de buffer 2X SSPE/0.1% SDS durante 5 min a 60°C.
- 5.- Preparar miniblotter (Isogen, Bioscience BV, Holanda) para colocar la membrana sobre una almohadilla húmeda de tal manera que los oligonucleotidos queden perpendiculares a los canales del miniblotter.
- 5.- Se aplican aproximadamente 150 µL del producto de PCR diluido.
- 6.- Colocar el miniblotter en horno de hibridación por una hora a 60°C sin agitación.
- 7.- Aspirar las muestras con vacío y se retiran con pinzas la membrana del blotter.
- 8.- Lavar la membrana dos veces a 60°C/15 min con 250 ml del buffer 2X SSPE/0.1% SDS.
- 9.- Se deja enfriar y se coloca en una bolsa de hibridación.
- 10.- Incubar durante 40 a 60 min a 42°C con 5 µL del conjugado estreptavidina-peroxidasa (Southern Biotechnology, USA) diluida en 10 ml de una solución 2X SSPE/0.5% SDS.
- 11.- Lavar dos veces con 250 ml de 2X SSPE/0.5% SDS a 42°C/10 min.
- 12.- Lavar dos veces más con 250 ml de 2X SSPE por 10 min a temperatura ambiente.
- 13.- Colocar la membrana en otra bolsa de hibridación.

14.- Adicionar 5 ml de CSPD-Star (Roche, USA), sellar la bolsa y evitar su exposición a la luz.

15.- Dejar 5 min a temperatura ambiente.

16.- La bolsa se corta en un extremo para eliminar el exceso de líquido.

17.- Exponer a placa de rayos X (Kodak, México) por 5 min.

Lavado de la membrana.

1.- Lavar dos veces a 80°C por 30 min con SDS 1%.

2.- Lavar con EDTA 20 mM (pH= 8) a temperatura ambiente durante 15 min.

3.- Guardar la membrana en una bolsa de hibridación con 7 ml de EDTA 20 mM (pH= 8) para evitar su desecación.

ANEXO 5

MIRU-VNTR (Mycobacterium Interspersed Repeats Unit - Variable Number in Tandem Repeats)

H37Rv						
MIRU	PRIMER	Secuencia del Primer	# COPIAS	PM del VNTR + las regiones flanqueantes	Longitud de unidades de repetición	Longitud de secuencias flaqueantes (Suma de ambos extremos)
4*	A	5'_GTCAAACAGGTCACAACGAGAGGAA	3	292	77	61
	B	5'_CCTC CACAATCAACACACTGGTCAT				
10*	A	5'_ACCGTCTTATCGGACTGCACTATCAA	3	378	53	219
	B	5'_CACCTTGGTGATCAGCTACCTC GAT				
16²	A	5'_GGTCCAGTCCAAGTACCTCAATGCT	2	463	53	357
	B	5'_TGATTGCCCTGACCTACACCCGGTT				
26*	A	5'_GGCGGATAGGTCTACCGTCGA	3	403	51	249
	B	5'_GCCGTCGGGTCATACAGCA				
31*	A	5'_CGTCGAAGAGAGCCTCATCAATCAT	3	267	53	108
	B	5'_AACCTGCTGACCGATGGCAATATC				
40*	A	5'_GATTCCAACAAGACGAGATCAAGA	1	291	52	239
	B	5'_TCAGGTCTTCTCTCAGCTCTCG				
Mtubo4^a	A	5'_CTTGGCCGGC ATC AAGC GCATTATT	2	639	51	537
	B	5'_GGCAGCAGAGCCCGGGATCTTTC				
ETRC^a	A	5'_CGAGAGTGGCAGTGCGGTTATCT	4	382	58	150
	B	5'_AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA				
ETRA^a	B	5'_AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	3	420	75	195
	A	5'_CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATT				
QUB11^{b^a}	A	5'_CGTAAGGGGATGCGGAAATAGG	5	422	69	77
	B	5'_CGAAGTGAATGGTGCCAT				
Mtub21^a	A	5'_AGATCCAGTTGTCGTCGTC	2	206	57	92
	B	5'_CAACATCGCTGGTTCTGTA				
QUB26^a	B	5'_AACGCTCAGCTGTCGGAT	5	742	111	187
	A	5'_CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCGAT				
Mtub30^a	A	5'_CTTGAAGCCCGTCTCATCTGT	2	363	58	247
	B	5'_ACTTGAACCCACGC CCATTAGTA				
Mtub39^a	A	5'_CGGTGGAGGC GATGAACGTC TTC	5	562	58	272
	B	5'_TAGAGCGGCACGGGGAAAGCTTAG				
QUB41^{56^a}	A	5'_TGACCACGATTGCTC TAGT	2	681	59	563
	B	5'_GCCGGGTCATGTT				

* Primers idénticos a los usados por Steinlein Cowan et. al. 2002.

^a Primers idénticos a los descritos por Philip Supply 2006.

² Primers diseñados (UIMZ) de acuerdo a la herramienta GeneFisher2 –Interactive PCR Primer Design del servidor de internet del departamento de Bioinformática de la Universidad de Bielefeld, Alemania.

Mezclas de reacción por cada MIRU-VNTR

MIRU 16, 26 y MTUB 21

Reactivo	[Inicial]	Vol. μl/Rx	[Final]
Amortiguador	10X	2.5	1X
MgCl ₂	30mM	1.25	1.5mM
DNTP's	10mM	0.5	2mM
Primer A	20μM	0.5	0.4μM
Primer B	20μM	0.5	0.4μM
Taq. Pol.	5U/μ	0.25	0.05U/μl
DMSO	100%	1	4%
H ₂ O		17.5	
DNA	2ng/μl	1	80pg/μl
Vol Final		25	

QUB 11b, ETRA, ETRC y MTUB 04

Reactivo	[Inicial]	Vol. μl/Rx	[Final]
Amortiguador	10X	2.5	1X
MgCl ₂	30mM	0.8	1mM
DNTP's	10mM	0.5	2mM
Primer A	20μM	0.5	0.4μM
Primer B	20μM	0.5	0.4μM
Taq. Pol.	5U/μ	0.25	0.05U/μl
DMSO	100%	1	4%
H ₂ O		17.95	
DNA	2ng/μl	1	80pg/μl
Vol Final		25	

MTUB 39, MTUB 30 y QUB 4156

Reactivo	[Inicial]	Vol. μl/Rx	[Final]
Amortiguador	10X	2.5	1X
MgCl ₂	30mM	2.5	3mM
DNTP's	10mM	0.5	2mM
Primer A	20μM	0.5	0.4μM
Primer B	20 μM	0.5	0.4μM
Taq. Pol.	5U/μ	0.25	0.05U/μl
DMSO	100%	1	4%
H ₂ O		16.25	
DNA	2ng/μl	1	80pg/μl
Vol Final		25	

MIRU 4, 31 y QUB 26

Reactivo	[Inicial]	Vol. μl/Rx	[Final]
Amortiguador	10X	2.5	1X
MgCl ₂	30mM	0.8	1mM
DNTP's	10mM	0.5	2mM
Primer A	20μM	0.5	80nM
Primer B	20 μM	0.5	80nM
Taq. Pol.	5U/μ	0.25	0.05U/μl
DMSO	100%	1	4%
H ₂ O		17.95	
DNA	2ng/μl	1	80pg/μl
Vol Final		25	

MIRU 10 y MIRU 40

Reactivo	[Inicial]	Vol. μl/Rx	[Final]
Amortiguador	10X	2.5	1X
MgCl ₂	30mM	1.25	1.5mM
DNTP's	10mM	0.5	2mM
Primer A	4μM	0.5	0.08μM
Primer B	4Mm	0.5	0.08μM
Taq. Pol.	5U/μ	0.25	0.05U/μl
DMSO	100%	1	4%
H ₂ O		17.5	
DNA	2ng/μl	1	80pg/μl
Vol Final		25	

Condiciones de Amplificación

QUB 4152, ETRC y MTUB 21			MIRU 4, 31, 10 y 40			
	TEMP. (°C)	TIEMPO		TEMP. (°C)	TIEMPO	
DESNT.	95	15MIN.		DESNT.	94	5MIN.
DESNT.	94	1MIN.		DESNT.	94	1MIN.
ALINEAM.	68.6	1MIN.	35 CICLOS	ALINEAM.	55	1MIN.
ELONG.	72	90SEG.		ELONG.	72	30SEG.
EXTENSIÓN	72	10MIN.		EXTENSIÓN	72	5MIN.
	4	INDEFINIDO		4	INDEFINIDO	

MIRU MTUB 04			MIRU 16			
	TEMP. (°C)	TIEMPO		TEMP. (°C)	TIEMPO	
DESNT.	95	15MIN.		DESNT.	94	5MIN.
DESNT.	94	1MIN.		DESNT.	94	1MIN.
ALINEAM.	73	1MIN.	35 CICLOS	ALINEAM.	57	1MIN.
ELONG.	72	90SEG.		ELONG.	72	30SEG.
EXTENSIÓN	72	10MIN.		EXTENSIÓN	72	5MIN.
	4	INDEFINIDO		4	INDEFINIDO	

MIRU 26			MTUB 30			
	TEMP. (°C)	TIEMPO		TEMP. (°C)	TIEMPO	
DESNT.	94	5MIN.		DESNT.	95	15MIN.
DESNT.	94	1MIN.		DESNT.	94	1MIN.
ALINEAM.	68	1MIN.	35 CICLOS	ALINEAM.	74.5	1MIN.
ELONG.	72	30SEG.		ELONG.	72	90SEG.
EXTENSIÓN	72	10MIN.		EXTENSIÓN	72	10MIN.
	4	INDEFINIDO		4	INDEFINIDO	

MTUB 39			ETRA			
	TEMP. (°C)	TIEMPO		TEMP. (°C)	TIEMPO	
DESNT.	95	15MIN.		DESNT.	95	15MIN.
DESNT.	94	1MIN.		DESNT.	94	1MIN.
ALINEAM.	66	1MIN.	35 CICLOS	ALINEAM.	67	1MIN.
ELONG.	72	90SEG.		ELONG.	72	90SEG.
EXTENSIÓN	72	10MIN.		EXTENSIÓN	72	10MIN.
	4	INDEFINIDO		4	INDEFINIDO	

QUB 11			QUB 26			
	TEMP. (°C)	TIEMPO		TEMP. (°C)	TIEMPO	
DESNT.	95	15MIN.		DESNT.	95	15MIN.
DESNT.	94	1MIN.		DESNT.	94	1MIN.
ALINEAM.	63.2	1MIN.	35 CICLOS	ALINEAM.	55.6	1MIN.
ELONG.	72	90SEG.		ELONG.	72	90SEG.
EXTENSIÓN	72	10MIN.		EXTENSIÓN	72	10MIN.
	4	INDEFINIDO		4	INDEFINIDO	

ELECTROFORESIS

- 1.- Preparar un gel de agarosa al 2% con medidas de 20 x 20 cm.
- 2.- Cargar los productos de amplificación en carriles correspondientes y un marcador de peso molecular de 50 pb (Fisher, USA).
- 3.- Correr por 2.5 h a 70 Volts.
- 4.- Teñir con Bromuro de Etidio (5 µg/ml).
- 5.- Observarlo en un transiluminador.
- 6.- Determinar el peso molecular del amplificado en el Software Gene Tools.
- 7.- Calcular el número de copias de cada MIRU con la fórmula.
- 8.- Usar como base la tabla para H37Rv.

ANEXO 6

Identificación de perfiles de drogorresistencia en *Mycobacterium tuberculosis* por el método de azul alamar en microplaca

Preparación de suspensión bacteriana:

Las cepas de los diferentes aislados se subcultivan en medio líquido Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.).

Cultivo Loweistein Jensen:

- 1.- En una botella de cultivo de 25 ml adicionar 2 ml del medio 7H9, se depositan cuidadosamente tres o cuatro asadas abundantes de crecimiento bacteriano. El cultivo debe ser joven (no más de 8 semanas).
- 2.- Agitar suavemente para disgregar los grumos de bacterias.
- 3.- Dejar que sedimenten los grumos grandes y recoger el sobrenadante homogéneo.
- 4.- Tomar una alícuota, aproximadamente 1 ml y ajustar al 1 de McFarland, rotular como suspensión A.
- 5.- Hacer una dilución 1:25 con medio 7H9 [4.7 g de Middlebrook (Disco Detroit, Mich.), 20 ml de 10% (vol./vol.) glicerol, 1 g Bacto Casitone (Difco), 880 ml de agua destilada, 100 ml de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Remel, Lenexa, Kans.)].

b) Medio líquido:

1.- De un cultivo bacteriano joven (2 a 5 semanas) crecido en medio 7H9, tomar una alícuota de 1 ml y transferirlo a un tubo falcón de 15 ml.

2.- Ajustar al 1 de McFarland.

3.- Hacer una dilución 1:25 con medio 7H9GC [4.7g de Middlebrook (Disco Detroit, Mich.), 20 ml de 10% (vol./vol.) glicerol, 1 g Bacto Casitone (Difco), 880 ml de agua destilada, 100 ml de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Remel, Lenexa, Kans.)].

Para probar las drogas estreptomycin, isoniacida, rifampicina y etambutol (SIRE) preparar un volumen de 4 ml.

Preparación de drogas

1.- Realizar diluciones de cada droga a probar en microtubos estériles. Marcar cada tubo con el nombre de la droga. Adicionar 1 ml de medio 7H9 por tubo.

2.- La dilución será la adecuada para tener cuatro veces, la concentración máxima a probar en el ensayo. Ejemplo: La concentración máxima de rifampicina en un ensayo será 2 µg/ml, por lo que se deberá preparar la solución a una concentración de 8 µg/ml. Si el stock tiene una concentración de 1 mg/ml, debemos de adicionar 8 µL del stock por mililitro de medio.

Preparación de Microplaca

1.- Tomar una placa para cultivo de 96 pozos nueva, orientarla de acuerdo al esquema 1.

2.- Llenar los pozos de la periferia con 200 µL de agua desionizada estéril (Fila A1 hasta A12, Fila H1 hasta H12, columna 1 y 12) ver esquema 1.

3.- A los 60 pozos restantes adicionarles 100 µL de medio 7H9 con una pipeta multicanal.

4.- En la fila B de la columna 2 a la 10 adicionar 100 µL de la solución de trabajo de cada droga (concentración 4X), con la misma punta mezclar adecuadamente cada droga.

5.- Poner puntas nuevas a la pipeta multicanal y tomar de los pozos B 100 µL y transferirlos a la siguiente fila de pozos (C), mezclarlos perfectamente.

- 6.- Poner puntas nuevas al multicanal y tomar de los pozos C 100 μ L y transferirlos a la siguiente línea de pozos (D) y mezclarlos perfectamente, sin hacer burbujas.
- 7.- Repetir los pasos hasta la fila G.
- 8.- Del material depositado en la fila G tomar 100 μ L y eliminarlos.
- 9.- Depositar la solución bacteriana en una caja petri estéril y con la pipeta multicanal depositar 100 μ L de la droga a cada pozo.
- 10.- Preparar los controles en los pocillos marcados con letra C en color rojo en la figura. Los controles marcados con m adicionar 100 μ L de medio 7H9.
- 11.- A los controles marcados con b adicionar 100 μ L de la suspensión bacteriana, a los controles d adicionar 100 μ L medio 7H9 y 2 μ L de la suspensión bacteriana.
- 12.- Cerrar la placa con su tapa y sellar con cinta adherible, introducir la placa en una bolsa y sellarla.
- 13.- Transportar la placa con cuidado e incubarla a 37°C.
- 14.- A los cinco días de incubación adicionar a un control b: 12 μ L de solución de Tween 80 y 20 μ L de azul alamar, reincubar 24 h.
- 15.- Revisar la placa, si se produjo un cambio de color a rosa intenso, adicionar a todos los pozos de la placa 20 μ L de azul alamar y 12 μ L de solución de Tween 80 (incluyendo los controles m, b, d).
- 16.- Reincubar a 37°C por 24 h.
- 17.- Realizar la lectura colocando la placa en un transiluminador de luz blanca. La concentración mínima inhibitoria (CMI) será la correspondiente al último pozo que permaneció azul y cuya intensidad sea igual o menor a la obtenida en el control d.
- 18.- El viraje de color azul a rosa indica resistencia a la droga. El color azul indica sensibilidad.