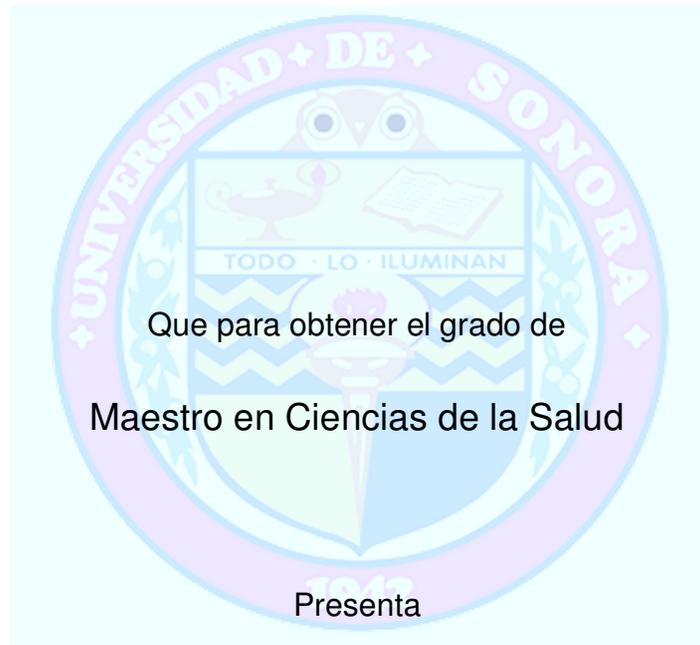


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Estudio comparativo entre dos métodos para la caracterización genotípica, de aislamientos clínicos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*



Ansix Pérez Mendoza

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de Ansix Pérez Mendoza, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



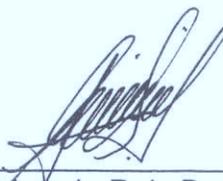
Dr. Enrique Bolado Martínez
Director



Dra. María del Carmen Candia Plata
Secretario



M.C. Magali Avilés Acosta
Vocal



Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a mi Madre, la persona más importante en vida. Mamá aquí estoy terminando otra etapa, subiendo un escalón más, aun cuando cada día ha sido más difícil que el anterior, si he podido lograrlo es gracias a ti, a tu ejemplo, a tu apoyo, a tu paciencia, a tus consejos. Sin tu presencia nada hubiera sido posible, sin tu guía estuviera caminando a la deriva, sin ti, simplemente yo no sería lo que soy, no estaría donde estoy, tu me has impulsado hasta aquí. Este es solo un escalón más, de mucho que me faltan, porque de ti aprendí que siempre podemos seguir subiendo aun cuando sientas que el mundo esta en tu contra, así que esto no termina aquí, quiero llegar tan alto como tú. Mami, no hay palabras que puedan expresar lo agradecida que estoy por llevarme siempre de tu mano, por eso te entregó esta tesis, que lleva años de trabajo, mi esfuerzo, mis ganas de seguir, aquí esta todo lo que soy, y quiero regalártelo, es tuyo... Gracias por todo mami, Te amo!

Quiero agradecerle a mi abuela, por todo su apoyo, por su cariño, por su preocupación... este trabajo también lleva su esfuerzo, porque ella siempre se desvelo junto conmigo, verla sentada en el sillón a las 2 o 3 am, esperando a que terminará el trabajo me daba la fuerza para terminar. Gracias por todas tus atenciones abuela, por todo tu amor, gracias por ser mi motivación.

A mi papá por su cariño, comprensión y por el impulso que me ha brindado durante todo este tiempo.

A mis hermanos, Sixto y Alexis, también son parte importante de estos logros, les doy las gracias por apoyarme en las buenas y aguantarme en las malas, los quiero mucho.

A toda mi familia, porque con sus palabras me han hecho sentir que esto vale la pena, gracias porque siempre me hacen sentir que soy lo máximo. Tías, Tíos, primos, primas muchas gracias por su apoyo. Un agradecimiento muy especial a mi tía Elvira, que siempre se ha preocupado por mí como una madre, gracias tía por todo su apoyo porque sin él todo hubiera sido más difícil.

A Iván Escarrega, por apoyarme para realizar lo que tanto me gusta, gracias por comprenderme, y sobretodo gracias por tenerme paciencia en estos años, te agradezco mucho que aunque han habido días difíciles, tu nunca has dejado de estar a mi lado, gracias por permitirme compartir estos logros contigo, sin ti esta etapa no hubiera sido tan hermosa, tienes y siempre tendrás un lugar muy especial en mi corazón.

Mil gracias a mi querido Profe, Enrique Bolado Martínez, por el apoyo incondicional que me ha brindado, gracias porque a pesar de que siempre tiene algo que hacer, siempre tuvo tiempo para mí. Gracias profe por sus consejos, por sonreír en lugar de regañarme cada vez que cometí un error, por su infinita paciencia, gracias por enseñarme todo lo que ahora sé. Sobretudo gracias por ser más que un director de tesis, gracias por su aprecio, por preocuparse por mi más allá de lo académico, por escucharme y apoyarme en mis momentos de crisis y por sus palabras de aliento. Y especialmente muchas gracias por confiar

en mí, como dije antes: es un honor y un privilegio trabajar bajo su dirección, y aunque ya no sea su alumna oficialmente, usted siempre será mi profe!.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Dra. María del Carmen Candia Plata, por su tiempo, por su apoyo, por preocuparse por mí y por trabajo, le agradezco mucho su atención, sus comentarios y correcciones en todo el proceso de elaboración de esta tesis.

A la M.C. Magali Avilés Acosta por siempre estar pendiente de mi trabajo, y de lo que ocupaba, gracias por su cariño, su tiempo y sus sugerencias para mejorar este trabajo. También quiero agradecer a los chicos del Laboratorio de Biología Molecular del LESP por recibirme siempre con una sonrisa.

Al Dr. Eduardo Ruiz Bustos, gracias por su amabilidad, por su tiempo para revisar esta tesis, por todas sus atenciones, gracias porque cada vez que necesité algo, usted siempre dijo “tu no te preocupes Ansix”, muchas gracias por todo ese apoyo.

También quiero agradecer a las químicas del Laboratorio de Agentes patógenos del LESP, a Mónica, Oli, Maty por todo su apoyo y su generosidad, a Lizbeth por dedicar parte de su tiempo para ayudarme siempre que lo necesité, y especialmente a la Q.B. Rosario Aguayo por estar siempre dispuesta a apoyarme en todo, gracias por permitirme hacer uso de su área de trabajo, durante estos años.

Gracias a todo el personal del área de medios de cultivos, especialmente a Rocío y Angélica (las #1 en preparación de medios de cultivo para micobacterias) por sus consejos y recomendaciones para mejorar la preparación del medio púrpura de bromocresol. A Don José por facilitarme el material, las instalaciones y por estar siempre pendiente en todo el proceso de elaboración de este medio de cultivo. También quiero agradecer a José “Chepe” porque cuando necesitaba esterilizar material siempre me ayudó muy amablemente, a pesar de que significaba más trabajo para él.

Un gran agradecimiento a mis amigos, no voy a mencionar nombres para que no me falte ninguno, gracias a todos por estar presentes durante todo este tiempo, y por acompañarme en tantas aventuras.

DEDICATORIA

**A mi mamá y mi abuela:
que son las personas que impulsan a seguir adelante en mi vida**

INDICE

LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
OBJETIVOS.....	xi
Objetivo General	xi
Objetivos Específicos	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Tuberculosis.....	4
Situación Actual de la Tuberculosis.....	4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
Taxonomía.....	6
Características Generales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
Estructura de la Pared Celular de <i>M. tuberculosis</i>	9
Aislamiento e Identificación de <i>M. tuberculosis</i>	9
Procedimientos Convencionales.....	9
Técnicas Moleculares	12
Epidemiología Molecular	13
Genotipificación.....	14
Técnicas Moleculares Para Genotipificación.....	15
IS6110 RFLP	15
Espoligotipado	16
MIRU-VNTR.....	17
ERIC-PCR	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Aislamientos Utilizados.....	20
Aislamiento de ADN	20

Identificación de Especie.....	21
ERIC-PCR	24
Análisis de Patrones Obtenidos para ERIC-PCR	24
MIRU-VNTR	25
Análisis de Patrones Obtenidos para MIRU-VNTR	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Aislamientos Utilizados.....	30
Aislamiento de ADN	30
ERIC-PCR	31
MIRU-VNTR	38
Comparación entre Procedimientos de Genotipificación.....	52
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS	58

LISTA DE TABLAS

I. Iniciadores utilizados en las mezclas de reacción para MIRU-VNTR 24	26
II. Iniciadores y componentes empleados en las mezclas de reacción para MIRU-VNTR 24	27
III. Información sobre elementos MIRU, obtenidos mediante el análisis <i>in silico</i> de la secuencia genómica de la cepa <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	29
IV. Código numérico, obtenido mediante MIRU-VNTR de 24 <i>loci</i> , de los aislamientos del Estado de Sonora	39
V. Código numérico, obtenido mediante MIRU-VNTR de 24 <i>loci</i> , de los aislamientos del Estado de México	40
VI. Código numérico, obtenido mediante MIRU-VNTR de 24 <i>loci</i> , de los aislamientos del Estado de Veracruz	41
VII. Índice de diversidad alélica correspondiente a los 24 <i>loci</i> , para las tres regiones geográficas incluidas en el presente estudio	49

LISTA DE FIGURAS

1. Tasa de incidencia de tuberculosis en todas sus formas por entidad federativa.....	7
2. Representación de la pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
3. Patrones de bandas utilizados como referencia en la identificación de especies del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
4. Dendrograma generado con los perfiles de bandas, obtenidos mediante ERIC-PCR, para los aislamientos clínicos del Estado de Sonora.....	33
5. Dendrograma generado con los perfiles de bandas, obtenidos mediante ERIC-PCR, para los aislamientos clínicos del Estado de México.....	34
6. Dendrograma generado con los perfiles de bandas, obtenidos mediante ERIC-PCR, para los aislamientos clínicos del Estado de Veracruz.....	35
7. Dendrograma generado con los perfiles de bandas, obtenidos mediante ERIC-PCR, para todos los aislamientos clínicos utilizados en este estudio.....	36
8. Dendrograma, generado con MIRU-VNTR de 12 <i>loci</i> , para todos los aislamientos clínicos utilizados en el presente estudio.....	42
9. Dendrograma, generado con MIRU-VNTR de 15 <i>loci</i> , para todos los aislamientos clínicos utilizados en el presente estudio.....	44
10. Dendrograma, generado con MIRU-VNTR de 24 <i>loci</i> , para todos los aislamientos clínicos utilizados en el presente estudio.....	46

LISTA DE FIGURAS (CONT.)

11. Dendrograma, generado con los 5 *loci* que presentaron los índices de diversidad alélica más elevados, para todos los aislamientos clínicos utilizados en el presente estudio.51
12. Ecuación utilizada para obtener el índice de discriminación de Hunter-Gaston.....54

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar la técnica de amplificación mediante PCR de las regiones inter-ERIC (ERIC-PCR) y el análisis de elementos repetitivos en el genoma de *M. tuberculosis* (MIRU-VNTR), para la diferenciación de aislamientos clínicos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos Específicos

1. Aplicar la técnica de ERIC-PCR para la diferenciación, a nivel de cepa, de aislamientos clínicos humanos, así como de cepas Tipo de micobacterias preservadas en el Laboratorio Estatal de Salud Pública en Hermosillo, Sonora.
2. Estandarizar y aplicar la técnica de MIRU-VNTR para la diferenciación, a nivel de cepa, de aislamientos clínicos humanos, así como de cepas Tipo de micobacterias preservadas en el Laboratorio Estatal de Salud Pública en Hermosillo, Sonora.
3. Identificar los perfiles de MIRU-VNTR más frecuentes, en los aislamientos clínicos obtenidos en el Laboratorio Estatal de Salud Pública en Hermosillo, Sonora, así como en otras regiones del país.
4. Comparar las técnicas de ERIC-PCR y MIRU-VNTR, utilizando el índice de discriminación de Hunter-Gaston, con el fin de establecer la metodología que presente mayor poder de resolución, en la caracterización genotípica de aislamientos clínicos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad causada por un grupo de microorganismos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, que incluye a siete especies, entre las cuales existe una muy estrecha relación genómica. Las regiones consenso intergénicas repetitivas de las enterobacterias (ERIC, por sus siglas en inglés), fueron primeramente descritas en la familia *Enterobacteriaceae* y también están presentes en *M. tuberculosis*. La variabilidad de las regiones inter-ERIC (ERIC-PCR) ha permitido obtener un buen nivel de diferenciación genotípica, sin embargo, este procedimiento no ha sido comparado con las técnicas de genotipificación de referencia. En la actualidad una nueva herramienta de genotipificación: MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats) se perfila como la mejor herramienta para la genotipificación de micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. En el presente trabajo se compararon las técnicas de ERIC-PCR y MIRU-VNTR, para la genotipificación de aislamientos clínicos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. Se realizó la extracción de ADN de 27 aislamientos clínicos humanos, previamente identificados mediante pruebas fenotípicas, en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora. Adicionalmente se incluyeron 20 aislamientos clínicos humanos provenientes del Estado de México y 18 aislamientos provenientes del Estado de Veracruz. Se confirmó la identificación de 63 de los 65 aislamientos mediante técnicas genotípicas. Posteriormente se amplificaron, mediante PCR, 24 elementos MIRU para todos los aislamientos. Una vez formados los códigos numéricos, éstos fueron ingresados al programa BioNumerics, para formar agrupamientos, de acuerdo al grado de similitud, mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). De igual manera, se obtuvieron los patrones de bandas mediante ERIC-PCR y los perfiles de

similitud se calcularon mediante el algoritmo Dice y el método UPGMA. Se evaluaron tres paneles de MIRU-VNTR (con 12, 15 y 24 *loci*). El panel de 12 MIRU-VNTR permitió diferenciar la mayoría de los aislamientos, a excepción de dos. Sin embargo al utilizar MIRU-VNTR de 15 *loci*, se logró diferenciar la totalidad de los aislamientos, de igual forma ocurrió con MIRU 24. Al contrario de lo que se esperaba, no se observó la formación de grupos específicos por región geográfica, en ninguno de los paneles. Se seleccionó un panel con los 5 MIRU-VNTR más discriminatorios, los cuales permitieron la diferenciación de todos los aislamientos y la formación de grupos específicos por región geográfica. Se determinó el poder de diferenciación de cada uno de los pánels de genotipificación utilizando el índice de discriminación de Hunter-Gaston (HGDI). Se encontró que MIRU-VNTR de 12 *loci* obtuvo un HGDI=0.999, mientras que MIRU-VNTR de 15 y 24 *loci*, así como también el panel de 5 *loci* obtuvieron un HGDI=1, es decir, la puntuación más alta para este índice. Mediante la técnica de ERIC-PCR, se logró la diferenciación de algunos aislamientos, a pesar de que obtuvo el poder de diferenciación más bajo comparado con los diferentes pánels MIRU-VNTR aquí analizados, presentó un alto índice de discriminación (HGDI=0.992), por lo que representa una buena elección para la genotipificación preliminar de *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), es una enfermedad crónica, causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (Caminero, 2007). Sin embargo cada especie y subespecie del complejo *M. tuberculosis* tiene la capacidad potencial de infectar al humano (Donoghue, 2009). Actualmente la tuberculosis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La situación ha empeorado aún más, debido a la creciente prevalencia de casos de tuberculosis en personas inmunodeficientes (principalmente personas con VIH) (Vadwai y col., 2012).

Un factor esencial en el control de la expansión de la TB radica en la capacidad de detectar la enfermedad en sus primeras fases (Domínguez y col., 2008). Los métodos tradicionalmente utilizados son el examen microscópico directo de las muestras clínicas y el cultivo. La observación microscópica, mediante técnicas específicas de tinción (baciloscopía), es la técnica menos sensible pero la más rápida, mientras que el cultivo es más sensible pero requiere más tiempo (hasta dos meses). Adicionalmente, los métodos rutinarios requieren suficiente crecimiento bacteriano y no permiten una identificación específica de las especies micobacterianas (Metchok y col., 1999; Domínguez y col., 2008).

Los métodos convencionales utilizados, son muy tardados, laboriosos y no permiten una caracterización adecuada, por lo que es de suma importancia el desarrollo de nuevas técnicas que permitan una identificación rápida y precisa de *M. tuberculosis* (Dorransoro y Torroba, 2007; Dominguez y col., 2008; Herrera-León y col., 2009). Desde su introducción, las técnicas basadas en la biología molecular se han considerado como una alternativa a los métodos convencionales (Dominguez y col., 2008). En las últimas décadas, para los estudios de epidemiología se han utilizado marcadores moleculares para la

diferenciación de aislamientos del complejo *M. tuberculosis* (Donoghue, 2009; Mulenga, 2010).

Adicionalmente, hoy en día se cuenta con técnicas moleculares de genotipificación, que permiten la diferenciación de cepas de una misma especie. La genotipificación es una importante herramienta que contribuye significativamente al entendimiento de la epidemiología y control de la TB, ya que permite realizar el seguimiento de casos, diferenciar recaídas o reinfecciones por distintas cepas del mismo microorganismo, así como la identificación de brotes epidémicos y cadenas de transmisión, y es especialmente importante cuando no se tienen datos epidemiológicos o se tienen datos inadecuados (Christianson y col., 2010; Shamputa y col., 2010).

Por más de una década, el estándar de oro para la genotipificación de *M. tuberculosis* ha sido el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia de inserción 6110 (IS6110-RFLP), sin embargo, este método es muy laborioso, requiere el cultivo de los aislamientos por varias semanas, en ocasiones los resultados son difíciles de interpretar y, además, presenta bajo poder de discriminación en aislamientos con bajo número de copias del IS6110 (Jiang y col., 2012).

Últimamente, para la genotipificación de *M. tuberculosis*, se ha utilizado una nueva técnica basada en el número variable de repeticiones en tándem de diferentes secuencias que se encuentran interdispersas en el genoma micobacteriano, denominada MIRU-VNTR. Esta técnica requiere la amplificación de 12 a 24 *loci*, dependiendo del nivel de discriminación deseado. Se puede realizar en mucho menor tiempo que el estándar de oro, los resultados se expresan en códigos numéricos y son, por tanto, muy fáciles de comparar entre laboratorios (Supply y col., 2006; Cerezo y col., 2011; Vadwai y col., 2012).

Finalmente, los procedimientos utilizados para la genotipificación de micobacterias, son costosos, laboriosos y en algunos casos muestran baja

reproducibilidad, por lo que se considera necesario la búsqueda o diseño de técnicas alternativas para la genotipificación de aislamientos. Entre las técnicas de genotipificación que han sido poco evaluadas en micobacterias, se encuentra la técnica de ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), que presenta varias ventajas, sobre las anteriormente mencionadas, como requerir un sólo par de iniciadores y un sólo proceso de amplificación, por lo que también es menos laboriosa y costosa (Sechi y col., 1998).

ANTECEDENTES

Tuberculosis

La tuberculosis (TB), es la enfermedad de origen infeccioso que más daño ha causado a la especie humana, en número de enfermos y en número de muertes, a lo largo de toda su historia (Bloom y Murray, 1992; Caminero, 2007). La TB es una infección bacteriana crónica, que afecta particularmente los pulmones, pero puede afectar también otros órganos del cuerpo (Donoghue, 2009). Se denomina TB a la enfermedad producida por cada una de las siete especies que integran el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), aunque la especie más representativa es *M. tuberculosis*, debido a que es la principal causante de esta enfermedad (Caminero, 2007).

Las especies pertenecientes al CMTB, se encuentran estrechamente relacionadas genéticamente, ya que presentan más de 95% de similitud en su ADN. Este complejo incluye, además de *M. tuberculosis*, a *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* (subtipos I y II), *M. microti* y *M. canetti*. Recientemente se incluyeron a *M. caprae* y *M. pinnipedii* dentro de este complejo (Niemann y col., 2000; Caminero, 2007).

Situación Actual de la Tuberculosis

En el año de 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la tuberculosis como una emergencia global, y hasta el día de hoy representa un problema de salud pública a nivel mundial. El impacto causado por la tuberculosis puede ser medido en términos de incidencia (se define como el número de casos nuevos y recaídas de tuberculosis procedentes de un determinado período de tiempo, por lo general un año), prevalencia (se define como el número de casos de tuberculosis en un punto dado en el tiempo y con relación a un número poblacional específico, por ejemplo, 100 000 hab.) y

mortalidad (se define como el número de muertes causadas por la tuberculosis en un período de tiempo determinado, por lo general un año y con relación a un número poblacional específico, por ejemplo, 100 000 hab.) (World Health Organization, 2011).

En el 2011, la OMS reportó que un tercio de la población se encuentra infectada por *M. tuberculosis*. Se estima que se presentan alrededor de 8.8 millones de casos nuevos de tuberculosis al año, lo que equivale a 128 casos por cada 100 000 habitantes. Entre los países con las más altas incidencias se encuentran India (2 – 2.5 millones), China (0.9 – 1.2 millones), África del Sur (0.4 – 0.59 millones), Indonesia (0.37 – 0.54 millones) y Pakistán (0.33 – 0.48 millones). Solamente en India se concentra el 26% de todos los casos de tuberculosis a nivel mundial, mientras que, en conjunto con China, representan el 38% (World Health Organization, 2011).

En el año 2010, la tuberculosis fue responsable de 1.4 millones de muertes a nivel mundial, de las cuales, 1.1 millones de muertes ocurrieron en pacientes VIH negativos y 0.35 millones de muertes se presentaron en pacientes seropositivos para el VIH. Estas estimaciones son considerablemente más bajas, comparadas con las publicadas el año anterior (World Health Organization, 2011).

Según cifras de la OMS para el 2011, México se encuentra entre las regiones de más baja incidencia de tuberculosis a nivel mundial (World Health Organization, 2011). Sin embargo, en nuestro país la TB también representa un problema prioritario de salud pública. Según el registro y notificación del sistema de vigilancia epidemiológica de tuberculosis, en el año 2010 se reportaron, en todo el país, un total de 18,848 casos nuevos de tuberculosis en todas sus formas, lo que corresponde a una tasa de incidencia de 16.8 casos por cada 100 000 habitantes (Castellanos, 2010).

La zona norte del país es la zona más desarrollada, sin embargo en ésta se encuentran algunos de los Estados con mayores tasas de incidencia de

tuberculosis, como Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. La tasa más elevada se ubicó en Baja California con 54.1 casos, el resto de la tendencia por entidad federativa se demuestra en la figura 1 (SINAVE, 2012). De acuerdo con los registros nacionales, durante el año 2009, en México se registraron 2,225 defunciones por tuberculosis en todas las formas. Esto representa una importante pérdida de años potenciales de vida saludable y, por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico del país, ya que el promedio de edad de muerte por este padecimiento es de 54 años (SINAVE, 2012).

Mycobacterium tuberculosis

Taxonomía

El orden de los Actinomycetales incluye la familia Mycobacteriaceae, Actinomycetaceae, Streptomyetaceae y Nocardiaceae. La familia Mycobacteriaceae contiene un solo género, el género *Mycobacterium*, del que en sus orígenes sólo se conocían dos especies: el bacilo de la lepra o *Mycobacterium leprae* y el bacilo tuberculoso o *Mycobacterium tuberculosis*. Hoy en día, dentro del género *Mycobacterium* se han descrito más de 120 especies diferentes (Dorronsoro y Torroba, 2007).

A pesar de la gran diversidad de especies de micobacterias que existen, solamente un pequeño grupo de especies, estrechamente relacionadas genéticamente, tiene la capacidad de causar tuberculosis, este grupo de bacterias es conocido como el CMTB (Donoghue, 2009). Las especies del CMTB, presentan más de 95% de similitud en su ADN. No obstante, a pesar de presentar importantes similitudes genómicas, los miembros del CMTB difieren en su epidemiología y su importancia clínica como agentes causales de la TB humana. *M. tuberculosis* es la principal causa de tuberculosis en el humano, sin embargo, el espectro de hospederos de *M. bovis* es más amplio y por lo tanto

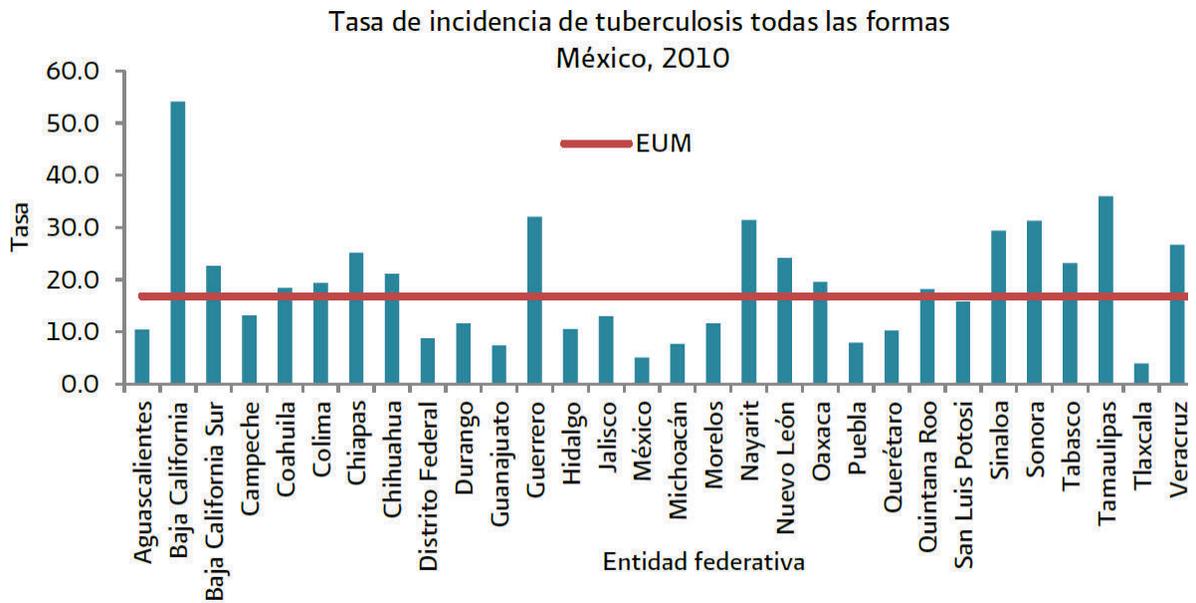


Figura 1. Tasa de incidencia de tuberculosis en todas sus formas por entidad federativa.

EUM: Estados Unidos Mexicanos.

Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Perfil Epidemiológico de Tuberculosis en México.

puede causar TB en distintas especies animales, como bovinos, caprinos y también en el humano. *Mycobacterium africanum* es aislado predominantemente en África y en ciertas regiones representa más del 60% de los aislamientos obtenidos de pacientes con TB pulmonar. Por otro lado, *M. microti* causa tuberculosis principalmente en roedores (Niemann y col., 2000).

Características Generales de *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis es una bacteria aerobia estricta en forma de bacilo, cuyo tamaño puede variar desde 0.3 hasta 0.6 μm de ancho y de 1 a 4 μm de largo (Ducati, 2006). Este microorganismo presenta múltiples características que la diferencian del resto de las bacterias. Por ejemplo, su tasa de replicación extremadamente lenta, que aún bajo las condiciones ideales (pH 7.40 y presión de oxígeno 100 – 140 mm de Hg) requiere entre 14 y 24 horas. Otro aspecto importante de las micobacterias consiste en su compleja pared celular, que presenta características únicas, lo que le otorga una importante resistencia a las agresiones externas, incluida su resistencia natural a la gran mayoría de los antimicrobianos (Caminero, 2007).

Las micobacterias son capaces de sobrevivir durante semanas o meses sobre objetos inanimados, siempre que estén protegidas de la luz solar. Adicionalmente, son más resistentes a los ácidos, álcalis y desinfectantes que el resto de las bacterias no formadoras de esporas. Por otro lado, las micobacterias resisten la desecación y la congelación, pero la luz ultravioleta y el calor (más de 65°C durante 30 minutos) las inactiva (Dorransoro y Torroba, 2007).

Estructura de la Pared Celular de *M. tuberculosis*

La envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* es una estructura compleja, constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática. La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y sirve de protección contra múltiples factores externos (Gorocica y col., 2005).

La pared micobacteriana, que se localiza por debajo de la cápsula separada por un espacio periplásmico, posee un elevado contenido en lípidos (50-60%). Estos lípidos le confieren un carácter hidrofóbico e impiden que los colorantes de anilina penetren, por lo que no se aprecian fácilmente en la tinción de Gram y para poder visualizarlas se requieren colorantes especiales (arilmetanos) (Gorocica y col., 2005; Dorransoro y Torroba, 2007).

La pared celular se compone de una capa externa y una capa interna que rodea a la membrana plasmática. El compartimiento exterior está constituido por fosfolípidos altamente glicosilados, dando lugar a moléculas como el lipoarabinomano (LAM), que tiene un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis (Hett y Rubin, 2008). El compartimiento interior conforma el núcleo esencial de la pared celular y está constituido por el complejo macromolecular formado por arabinogalactano, peptidoglucano y ácidos micólicos; estos últimos le confieren las características de su tinción ácido-alcohol resistente (Figura 2) (Gorocica y col., 2005; Caminero, 2007; Hett y Rubin, 2008).

Aislamiento e Identificación de *M. tuberculosis*

Procedimientos Convencionales

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis exige la detección, aislamiento e identificación de *M. tuberculosis*, así como la determinación de su sensibilidad frente a los fármacos antituberculosos, proceso que puede requerir

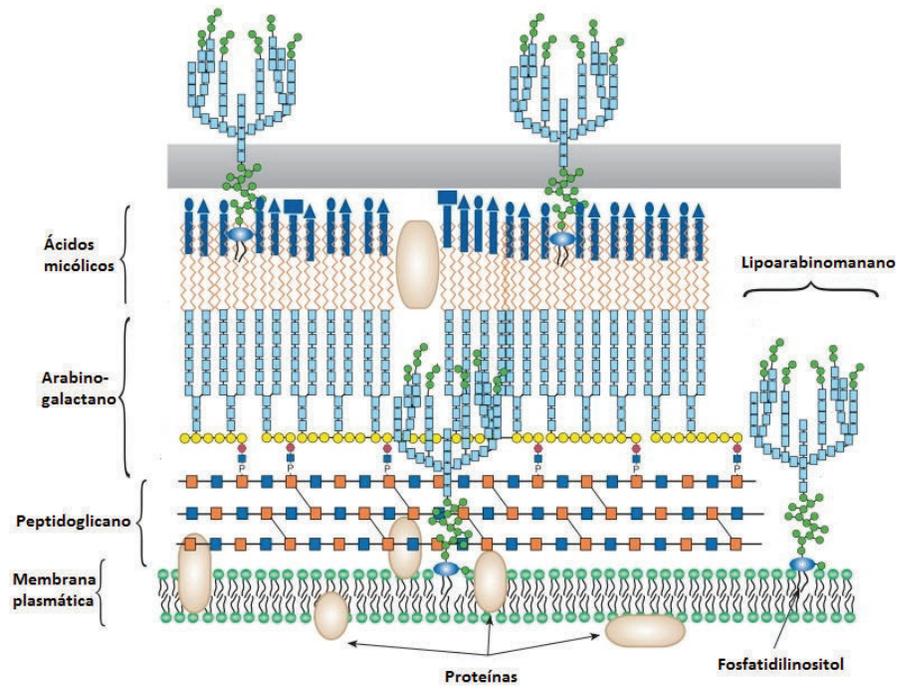


Figura 2. Representación de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

Fuente: Brennan y Crick, 2007.

de dos a tres meses (Dorronsoro y Torroba, 2007; Cho y col., 2009). En general, el examen microscópico directo de las muestras clínicas, mediante técnicas específicas de tinción (baciloscopía), es la técnica menos sensible pero la más rápida (Dorronsoro y Torroba, 2007).

La baciloscopía tiene por objeto, visualizar al microscopio la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en las muestras. Esto se logra mediante protocolos de tinción específicos, diseñados en base a las características, de la capa externa de las micobacterias anteriormente mencionadas. La búsqueda al microscopio sigue considerándose la forma más rápida y económica para diagnosticar la TB. No obstante, dado que su sensibilidad (40-70% en muestras respiratorias) y su especificidad no son absolutas, es necesario realizar el cultivo para un diagnóstico certero (Domínguez y col., 2008).

El aislamiento del microorganismo en medio de cultivo sigue considerándose el estándar de oro para la identificación y para ello existen desde los medios de cultivo tradicionales como el Löwenstein-Jensen o el Middlebrook 7H10 hasta los medios líquidos que incluyen ácidos grasos marcados con radioisótopos (BACTEC) o indicadores fluorescentes de óxido-reducción (MGIT) (Metchock y col., 1999; Alcaide y Coll, 2011).

Tradicionalmente la identificación se realizaba en base a una serie de características fenotípicas, tales como la velocidad de crecimiento en los cultivos, la morfología de la colonia y su pigmentación. Estas características orientan preliminarmente hacia el grupo de micobacterias y posteriormente se realizan pruebas bioquímicas, a partir del desarrollo colonial, para lograr la identificación de especie (Dorronsoro y Torroba, 2007).

Las principales pruebas bioquímicas utilizadas en la identificación de las micobacterias son las pruebas de acumulación de niacina, reducción de nitratos, hidrólisis del Tween, catalasa, captación de hierro, pirazinamidasas, detección de las enzimas ureasa y arilsulfatasa. Estos métodos clásicos,

basados en pruebas bioquímicas, son muy lentos, laboriosos y de gran riesgo para el personal, ya que se requiere trabajar con inóculos densos de micobacterias vivas (Dorronsoro y Torroba, 2007).

Técnicas Moleculares

Debido a las limitaciones que presentan los métodos tradicionales, se han buscado alternativas para la identificación de *M. tuberculosis*. Desde su aparición, las técnicas basadas en la biología molecular se han considerado como una alternativa a los métodos convencionales (Alcaide y Coll, 2011).

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos específicas para *M. tuberculosis*, realizadas sobre muestras broncopulmonares son las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, los resultados pueden obtenerse un día después de la recepción de la muestra. Sin embargo, este tipo de pruebas no están estandarizadas y su precisión diagnóstica es muy variable (Lange y Mori, 2010).

Por otra parte están las sondas comerciales no radiactivas de ADN, complementarias al ácido ribonucleico (ARN) ribosómico micobacteriano, marcadas con quimioluminiscencia, que permiten identificar *M. tuberculosis*, el complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. kansasii* y *M. goodii*, a partir de cultivos en medio sólido o líquido y sin necesidad de amplificación genómica. Esta técnica presenta una buena sensibilidad y especificidad, pero el número de especies que identifica es limitado (Domínguez y col., 2008). Alternativamente, también se han diseñado sondas fluorescentes de ácidos nucleicos peptídicos que permiten diferenciar entre micobacterias del complejo *M. tuberculosis* del resto de micobacterias (Domínguez y col., 2008).

Lo ideal sería diseñar un método que tuviese la capacidad de diagnosticar al paciente con TB el primer día en que apareciesen sus síntomas, pudiendo conseguir, de esta forma, cortar la cadena de transmisión

rápidamente. De esta forma, los tratamientos adecuados presentarían un mayor impacto en el descenso de la endemia. Pero, en la TB existe el gran problema de su presentación clínica; muy lenta instauración y muy inespecífica, lo que conlleva retardo en la asistencia del paciente al médico (Caminero, 2007).

De todos los avances en el diagnóstico que se han producido en las últimas décadas, los más prometedores siguen siendo las técnicas de amplificación genómica. A pesar de que estos procedimientos son más complejos y costosos, pueden mejorar la sensibilidad nosográfica de la baciloscopia. En cualquier caso, las técnicas que utilizan ARN, que son las más sensibles, no consiguen una sensibilidad superior del 85% en los casos de TB pulmonar con baciloscopia negativa, y del 75% en los casos de TB extrapulmonar (Caminero, 2007).

Epidemiología Molecular

La epidemiología es una rama de la ciencia que se dedica al estudio de las enfermedades y los factores de riesgo que afectan a una población humana, así como su distribución y control. El conocimiento derivado de los estudios epidemiológicos permite determinar la historia natural de las enfermedades, es decir, su etiología, frecuencia de aparición, distribución, vías y patrón de diseminación, reservorios o factores que incrementen el riesgo de contraerla. Adicionalmente, ofrece una alternativa para establecer mecanismos que permitan prevenir o controlar la enfermedad, así como la eficacia de dichas medidas y la magnitud del beneficio al aplicarlas sobre la población (Vilchez y Alonso, 2009).

La epidemiología molecular es un campo que ha surgido, en gran parte, debido a la integración de la biología molecular, la medicina clínica, la estadística y la epidemiología. La epidemiología molecular intenta utilizar un enfoque multidisciplinario para identificar con mayor precisión los factores que determinan la causa de la enfermedad, la propagación, difusión y la distribución

(en tiempo y espacio), además de brindar la posibilidad de diagnosticar la enfermedad con mayor rapidez y ofrecer un mejor tratamiento (Mathema y col., 2006; Vilchez y Alonso, 2009).

Desde 1993, cuando la OMS declara la tuberculosis una emergencia mundial, se han realizado importantes esfuerzos para hacer frente a epidemias de tuberculosis. Anteriormente, la comprensión de la propagación de la tuberculosis era imprecisa y se basaba en datos de observación o correlaciones/comunicaciones verbales (Mathema y col., 2006). Estas medidas no son suficientes, ya que para un control eficiente de esta enfermedad es importante contar con sistemas de vigilancia epidemiológica capaces de monitorear con precisión las tendencias de esta enfermedad a nivel mundial (Supply y col., 2001). Es por ello, que hoy en día se han utilizado ampliamente diversos métodos moleculares de tipificación, lo que ha permitido comparar las huellas genéticas de los distintos aislamientos, es decir, genotipificar a los microorganismos y establecer diferencias entre diversas cepas. Al diferenciar las cepas aisladas, ha sido posible obtener nueva información sobre la epidemiología de la enfermedad (Dorransoro y Torroba, 2007).

La genotipificación de *M. tuberculosis* es una herramienta muy útil en el estudio de la epidemiología molecular de la tuberculosis, permite identificar brotes que permanecieron sin ser detectados mediante la vigilancia epidemiológica tradicional y por lo tanto puede ser utilizada como una base y no sólo como una ayuda para la vigilancia epidemiológica (Supply y col., 2001; Kwara y col., 2003).

Genotipificación

En los estudios epidemiológicos, la identificación y caracterización de los microorganismos es indispensable. La suma de estos procedimientos se denomina tipificación, y permite establecer la identidad de los microorganismos causantes de un brote infeccioso (Vilchez y Alonso, 2009).

Los métodos para tipificación de microorganismos pueden clasificarse en dos grandes grupos: fenotípicos y genotípicos. Los métodos fenotípicos se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas (Vilchez y Alonso, 2009). Durante algún tiempo, para el estudio de brotes epidémicos, se han utilizado marcadores fenotípicos que no presentan suficiente capacidad discriminadora entre cepas, por lo que los métodos de genotipificación son una herramienta adicional que extiende los alcances en las investigaciones epidemiológicas (Caminero, 2007).

La genotipificación permite, además de una identificación precisa de los microorganismos, identificar brotes epidémicos, identificar factores de riesgo asociados a la transmisión de TB, discriminar entre reactivación y reinfecciones por distintas cepas del mismo microorganismo, evaluar la eficiencia de programas de control, observar la dinámica de casos relacionados y detectar o descartar contaminación cruzada en el laboratorio (Allix-Béguec y col., 2008; Alonso-Rodríguez y col., 2009; Cerezo y col., 2011).

Técnicas Moleculares Para Genotipificación

IS6110 RFLP

La IS6110 es una secuencia de inserción de 1,335 pares de bases que, en caso de estar presente, puede encontrarse hasta en 25 ubicaciones diferentes dentro del cromosoma de cada cepa de las especies pertenecientes al CMTB (Mathema y col., 2006). El análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), utilizando como secuencia diana la IS6110, es el método más utilizado y el que se considera de referencia para la genotipificación de los miembros del CMTB (Supply y col., 2006).

El IS6110 RFLP es una técnica reproducible y útil para distinguir entre los aislamientos relacionados epidemiológicamente de los no relacionados. No obstante, este procedimiento presenta algunas limitaciones, ya que no puede

utilizarse si la micobacteria contiene menos de seis copias de este elemento en su cromosoma, en cuyo caso es preciso la utilización de otros procedimientos. Además, requiere grandes cantidades de ADN (lo que implica la realización de subcultivos que requieren varias semanas), por lo que actualmente se considera técnicamente compleja y costosa (Dorrnsoro y Torroba, 2007).

Respecto al poder de discriminación del IS6110 RFLP, se ha detectado que los aislamientos de *M. tuberculosis*, obtenidos de un brote epidémico, frecuentemente muestran patrones de IS6110-RFLP idénticos y se agrupan por factores de riesgo de transmisión bien identificados (Oelemann y col., 2007).

Espoligotipado

M. tuberculosis contiene de 10 a 50 copias de un segmento de 36 pb denominado DR (direct repeat), los cuales están separados por espaciadores, que presentan diferentes secuencias; no obstante estas secuencias son conservadas entre cepas (Dorrnsoro y Torroba, 2007). Debido a que las cepas se diferencian en términos de la presencia o ausencia de estos espaciadores, los patrones obtenidos pueden utilizarse para genotipificación. A este procedimiento se le conoce como espoligotipado y permite estudiar la presencia o ausencia de 43 espaciadores (Barnes y Cave, 2003).

El espoligotipado presenta dos ventajas sobre el IS6110-RFLP: primero se requiere menor cantidad de ADN, además se puede realizar a partir de muestras clínicas o a partir de cepas con poco desarrollo, después de la inoculación en medio de cultivo líquido; segundo, los resultados se expresan como negativo o positivo para cada espaciador, lo que permite su conversión a un formato digital. No obstante, esta técnica presenta menor poder de diferenciación que el IS6110-RFLP (Barnes y Cave, 2003).

MIRU-VNTR

El descubrimiento de elementos repetitivos y de variabilidad interespecie dentro del genoma de *M. tuberculosis*, ha permitido el desarrollo de una nueva herramienta para la genotipificación de micobacterias, misma que ha sido denominada: Análisis de elementos repetitivos interdispersos en el genoma micobacteriano basado en un número variable de repeticiones en tándem (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number of Tandem Repeats: MIRU-VNTR) (Supply y col., 2000). Esta técnica tiene un poder de discriminación similar al observado para la técnica de IS6110-RFLP y permite la obtención de resultados reproducibles en cepas con menos de seis copias del elemento de inserción IS6110 (Supply y col., 2006).

La genotipificación con MIRU-VNTR se basa en la amplificación por PCR de múltiples *loci* con iniciadores específicos para las regiones que flanquean el *locus* de cada repetición. Al determinar el tamaño de los amplicones resultantes, mediante PCR, es posible determinar el número de copias de cada elemento repetitivo. Este procedimiento es considerablemente más rápido que el análisis de IS6110-RFLP y se puede aplicar a los extractos crudos de ADN hasta cultivos de micobacterias con poco crecimiento. Por otra parte, los resultados se expresan en códigos numéricos y por lo tanto los resultados se pueden comparar fácilmente, incluso con aislamientos de otras regiones geográficas (Supply y col., 2000).

Recientemente, se ha propuesto un panel de tipificación para MIRU-VNTR que incluye 24 *loci*, lo que permite mejorar significativamente la resolución entre grupos de diferenciación y genera mayor información para los estudios de epidemiología molecular, cuando se compara con el conjunto original de 12 *loci* MIRU-VNTR (Supply y col., 2000; Allix-Béguec y col., 2008).

Actualmente existe una base de datos, disponible en la red, que permite correlacionar genotipos y establecer agrupamientos filogenéticos de aislamientos obtenidos en distintas partes del planeta (Allix-Béguec y col.,

2008). En la opinión de distintos autores la técnica de MIRU-VNTR se perfila como la mejor herramienta para la genotipificación de micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (Allix-Béguec y col., 2008; Shamputa y col., 2010; Vadwai y col., 2012).

ERIC-PCR

Las regiones consenso intergénicas repetitivas de las enterobacterias (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus: ERIC), que fueron primeramente descritas en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, también están presentes en *M. tuberculosis* (Sechi y col., 1998). Las ERIC poseen una longitud de 126 pb y parecen estar tanto en regiones del genoma que son transcritas (regiones intergénicas de operones policistrónicos) como en regiones que no son transcritas (regiones arriba o debajo de los marcos de lectura abierta) (Sechi y col., 1998).

Las secuencias ERIC son altamente conservadas a nivel de secuencia de nucleótidos pero sus localizaciones cromosómicas difieren entre especies (Hulton y col., 1991). Además, con la amplificación mediante PCR de las regiones inter-ERIC (ERIC-PCR), se han obtenido bandas de diferente tamaño, que representan polimorfismos en las distancias entre los elementos repetitivos (Shuhaimi y col., 2001), lo que ha permitido la diferenciación a nivel de especie en bifidobacterias (Ventura y col., 2003) y a nivel de cepa en lactobacilos (Bolado-Martínez y Acedo-Félix, 2009).

En aislamientos de *M. tuberculosis* se encontró que los niveles de diferenciación obtenidos mediante ERIC-PCR son mayores a los obtenidos mediante el análisis de la región IS6110 (Sechi y col., 1998). Otra de las ventajas de la técnica ERIC-PCR es que requiere sólo un par de iniciadores universales y puede realizarse en un sólo día de trabajo, permitiendo así la diferenciación de cepas a partir de muestras clínicas en un periodo muy corto

de tiempo y a un bajo costo, en comparación con otras técnicas moleculares anteriormente mencionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos Utilizados

Se utilizaron un total de 65 aislamientos obtenidos de muestras clínicas humanas, provenientes de tres regiones geográficas del país; 27 aislamientos pertenecen al Estado de Sonora, 20 al Estado de México y los 18 restantes pertenecen al Estado de Veracruz. Todos los aislamientos fueron identificados como *M. tuberculosis*, de acuerdo a sus características fenotípicas y genotípicas. Adicionalmente se utilizó la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Los aislamientos obtenidos en el Estado de Sonora y la cepa H37Rv se mantienen en congelación a -70°C en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Hermosillo, Sonora (LESP). Todos los procedimientos que involucraron la manipulación de la cepa, desde el cultivo hasta la obtención del ADN bacteriano, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Agentes Patógenos del LESP del Estado de Sonora, el cual cuenta con un laboratorio independiente, con categoría de bioseguridad nivel 3 (BSL3).

Aislamiento de ADN

Para los aislamientos obtenidos de pacientes del Estado de Sonora, primeramente se cultivaron los microorganismos en el medio púrpura de bromocresol, a partir de aislamientos preservados en leche descremada (skim milk, Sigma, USA), los cuales se incubaron a 37°C hasta observar un desarrollo adecuado de los microorganismos (3-4 semanas).

Una vez que se observó el desarrollo confluyente del cultivo, una muestra de 3 a 4 asadas del cultivo fue suspendida en TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), posteriormente la alícuota se centrifugó a 4,000 g por 5 minutos, y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido agregando 100 µL de resina Chelex 100 (Sigma, USA) 10% P/V, e incubando a 56°C por 30 minutos; pasado este

tiempo se volvió a incubar a 95 °C por 30 minutos. Por último, la suspensión se centrifugó a 10,000 g por 5 minutos para luego transferir el sobrenadante a otro tubo y guardarlo en congelación hasta su uso (Iralu y col., 1993; Sampaio y col., 2006; Yang y col., 2008). Adicionalmente, se preservaron alícuotas en el medio skim milk, de los aislamientos desarrollados en el medio púrpura de bromocresol. Estas se conservan a temperatura de ultracongelación (-70 °C) para estudios posteriores.

Por otra parte, la extracción de ADN de los aislamientos clínicos provenientes del Estado de México y Veracruz, se llevó a cabo en la Universidad Veracruzana, mediante un procedimiento con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Van Soolingen y col., 1994).

Identificación de Especie

La identificación de especie se determinó de acuerdo a una taxonomía polifásica que incluyó la caracterización fenotípica y genotípica. La caracterización fenotípica se realizó por personal del Laboratorio de Agentes Patógenos del Laboratorio Estatal de Salud Pública. Por otra parte la caracterización genotípica se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora.

Para la caracterización genotípica, primeramente se llevó a cabo el análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción del producto amplificado por PCR del gen *gyrB* (*gyrB*-RFLP). La amplificación de un segmento del gen *gyrB* se realizó utilizando los iniciadores sentido MTUB-F (5'-TCGGACGCGTATGCGATATC-3') y antisentido MTUB-R (5'-ACATACAGTTCGGACTTGCG-3'), en una mezcla de reacción con un volumen final de 25 µL, la cual contenía 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) (Promega, USA), 1.5 mM de MgCl₂, GoTaq Flexi Buffer 5X (Promega, USA), 800 nM de cada iniciador, 1 U de Taq ADN polimerasa (Promega, USA) y 2.5 µL de ADN (Niemann y col., 2000; Chimara y col., 2004).

Para la amplificación se utilizó un termociclador i-Cycler (BioRad, USA), en el cual se programaron las siguientes condiciones: una incubación inicial para desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación a 94°C por 60 segundos, 65°C por 60 segundos, y 72°C por 90 segundos, finalizando con una extensión a 72°C por 10 minutos (Niemann y col., 2000; Chimara y col., 2004). Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa (Sigma, USA) al 2% P/V con Sybr safe (Invitrogen, USA). Se utilizó un marcador de 100 bp DNA ladder (Promega, USA) para evaluar los tamaños de bandas y posteriormente el gel fue fotodocumentado en un equipo WGD-30S (DAIHAN Scientific Co. Ltd., Korea) para su posterior análisis.

El producto amplificado fue sometido a digestión con las enzimas de restricción *RsaI*, *SacII* y *TaqI* (NE Biolabs, USA), en reacciones individuales para cada enzima, en un volumen final de 10 µL que contenía 4 µL del producto amplificado, amortiguador NEbuffer 4 y la enzima correspondiente (25 U de *RsaI*, 15 U *SacI* o 60 U *TaqI*). La digestión enzimática se llevó a cabo por 60 minutos a 37°C para *RsaI* y *SacII*, y 60 minutos a 65°C para *TaqI* (Chimara y col., 2004). Una vez transcurrido el tiempo de digestión, los fragmentos obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 2% P/V con Sybr safe. Se utilizó el marcador de tamaño 100 bp DNA Ladder, posteriormente los patrones obtenidos fueron fotodocumentados. La identificación se realizó al comparar los patrones obtenidos en cada caso con patrones descritos por Chimara y colaboradores (Figura 3).

Por otra lado, como parte de la identificación, se realizó la amplificación del *locus* Rv3120 (RD12). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL que contenía 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 3 mM de MgCl₂, DMSO al 5% (v/v), Green GoTaq Flexi Buffer 1X, 2 µM de cada uno de los iniciadores Rv3120F (5'-GTCGGCGATAGACCATGAGTCCGTCTCCAT-3') y Rv3120R (5'-GCGAAAAGTGGGCGGATGCCAGAATAGT-3'), 1 U de Taq ADN polimerasa y 5 µL de ADN (Huard y col., 2003).

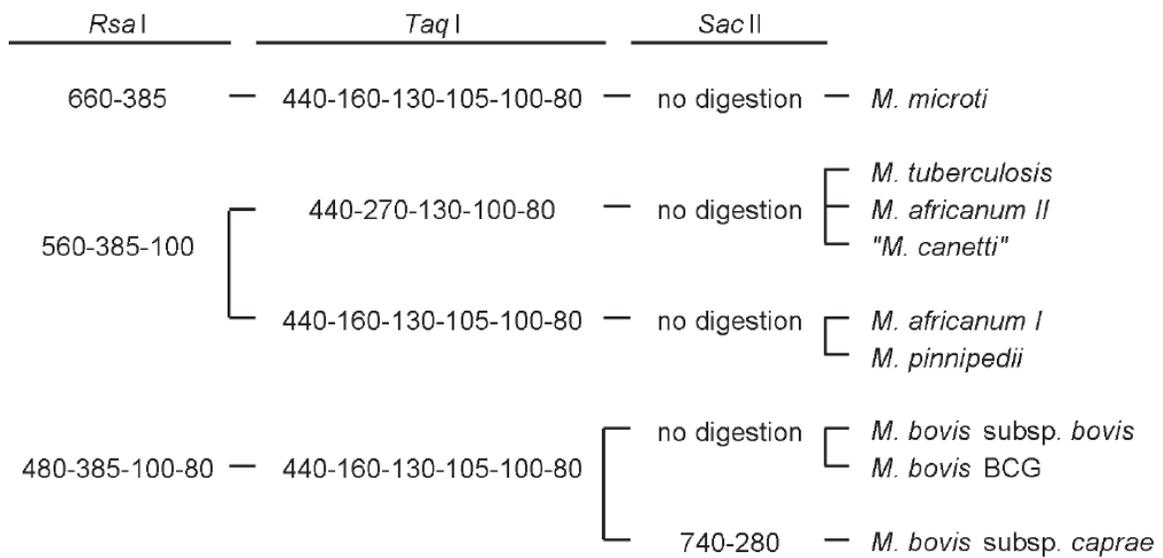


Figura 3. Patrones de bandas utilizados como referencia en la identificación de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Fuente: Chimara y col., 2004.

Para la amplificación se utilizó una incubación inicial para desnaturalización a 94°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos de 94°C por 60 segundos, 60°C por 60 segundos, y 72°C por 60 segundos, para finalizar con una extensión a 72°C por 10 minutos (Huard y col., 2003). El amplicón fue visualizado y posteriormente documentado, a partir de geles de agarosa al 2% P/V con Sybr safe; se utilizó el marcador 100 bp DNA ladder.

ERIC-PCR

A partir del ADN purificado se procedió a la amplificación mediante PCR de las regiones inter-ERIC (ERIC-PCR), utilizando la siguiente mezcla de reacción: 1 µM de los iniciadores ERIC1 (5´-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3´) y ERIC2 (5´-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3´), 200 µM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, Buffer de reacción 1X y 2.5 U de Taq ADN polimerasa, en un volumen final de 25 µL. Para la amplificación se utilizó una incubación inicial para desnaturalización a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 52°C por 60 segundos, y una extensión final a 70°C por 10 minutos, para finalizar con una extensión a 70°C por 20 minutos (Sechi y col., 1998).

Posteriormente los patrones de bandas se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% P/V con SYBR Green, los carriles de los extremos fueron reservados para los marcadores 100 bp DNA ladder y Lambda DNA/HindIII (Promega, USA). Los patrones de bandas obtenidos fueron fotodocumentados para su posterior análisis.

Análisis de Patrones Obtenidos para ERIC-PCR

Una vez obtenidos los perfiles de Bandas de las regiones inter-ERIC, las imágenes fueron capturadas en el programa TotalLab TL100 (Nonlinear Dynamics, Ltd., United Kingdom) y se procedió al análisis de imágenes para la

identificación tanto del número de bandas presentes, así como de los tamaños de cada una de ellas, para lo cual se utilizó como referencia el marcador 100 pb Ladder. Posteriormente las imágenes fueron analizadas nuevamente con el programa BioNumerics versión 6.5 (Applied Maths, Belgium), la formación de agrupamientos se realizó por el método de apareamiento sin ponderación utilizando medias aritméticas (UPGMA) y un análisis de agrupamientos de bandas utilizando el algoritmo DICE (Carriço y col., 2005).

MIRU-VNTR

A partir del ADN purificado se procedió a la amplificación mediante PCR de 24 *loci* MIRU-VNTR, utilizando los iniciadores cuyas secuencias se muestran en la tabla I (Supply y col., 2006; SLAMTB, 2010). Para todas las mezclas de reacción se utilizó la misma concentración de los siguientes componentes: 0.4 μ M de cada iniciador (F y R), 200 μ M de cada dNTP, Buffer de reacción 1X y 0.5 U de Taq ADN polimerasa, en un volumen final de 25 μ L. En la tabla II se muestran las concentraciones de $MgCl_2$ así como la utilización de dimetilsulfóxido en algunas mezclas de reacción (Supply y col., 2006).

Para la amplificación de MIRU 4 y MIRU 26 se utilizó una incubación inicial para la desnaturalización a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 65°C por 60 segundos, y 72°C por 90 segundos, para finalizar con un tiempo de extensión de 10 minutos a 72°C. Para la amplificación de ETR A y QUB 26 se utilizó una temperatura inicial de 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 62°C por 60 segundos, y 72°C por 90 segundos, así como una extensión final a 72°C por 10 minutos (modificado de Supply y col., 2006; Oelemann y col., 2007).

Para los MIRU's restantes, se utilizó una temperatura inicial de 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 60 segundos, 59°C por 60 segundos, y 72°C por 90 segundos, así como una extensión final a 72°C por 10 minutos (modificado de Supply y col., 2006; Oelemann y col., 2007).

Tabla I. Iniciadores utilizados en las mezclas de reacción para MIRU-VNTR 24.

MIRU	Secuencia del iniciador
MIRU 2F	5'-TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT-3'
MIRU 2R	5'TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT-3'
MIRU 4 F	5'-GTCAAACAGGTCACAACGAGAGGAA -3'
MIRU 4 R	5'- CCTCCACCATCAACACACTGGTCAT -3'
MIRU 10 F	5'-ACCGTCTTATCGGACTGCACTATCAA -3'
MIRU 10 R	5'-CCTCCACAATCAACACACTGGTCAT -3'
MIRU 16 F	5'-GGTCCAGTCCAAGTACCTCAATGCT-3'
MIRU 16 R	5'-TGATTGCCCTGAACCTACACCCGGTT -3'
MIRU 20 F	5'-TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG -3'
MIRU 20 R	5'-GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA -3'
MIRU 23 F	5'-CTGTGATGGCCGCAACAAAACG -3'
MIRU 23 R	5'-AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTC -3'
MIRU 24 F	5'-CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT -3'
MIRU 24 R	5'-GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA -3'
MIRU 26 F	5'-GGCGGATAGGTCTACCGTCGA -3'
MIRU 26 R	5'-GCCGTCCGGGTCATACAGCA -3'
MIRU 27	5'-TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA -3'
MIRU 27	5'-GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA -3'
MIRU 31 F	5'- CGTCGAAGAGAGCCTCATCAATCAT-3'
MIRU 31 R	5'- AACCTGCTGACCGATGGCAATATC-3'
MIRU 39F	5'-CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC-3'
MIRU 39R	5'-CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT-3'
MIRU 40 F	5'- GATTCCAACAAGACGCAGATCAAGA-3'
MIRU 40 R	5'-TCAGGTCTTTCTCTCACGCTCTCG-3'
ETR- AF	5'-AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT-3'
ETR-AR	5'-CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT-3'
ETR-BF	5'-ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT-3'
ERT-BR	5'-CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC-3'
ETR-CF	5'-CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT-3'
ETR-CR	5'-AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA-3'
MTUB-04 F	5'-CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT-3'
MTUB-04 R	5'-GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC-3'
MTUB-21R	5'-CAACATCGCCTGGTTCTGTA-3'
MTUB-21F	5'-AGATCCCAGTTGTGTCGTC-3'
MTUB 29F	5'-GCCAGCCGCGTGCATAAACCT-3'
MTUB 29 R	5'-AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC-3'
MTUB-30F	5'-CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT-3'
MTUB-30R	5'-CCTCCACAATCAACACACTGGTCAT-3'
MTUB 34 F	5'-GGTGCACACCTGCTCCAGATAA-3'
MTUB 34 R	5'-GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC-3'
MTUB-39F	5'-CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC-3'
MTUB-39R	5'-TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG-3'
QUB-11BF	5'-CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG-3'
QUB-11BR	5'-CGAAGTGAATGGTGGCAT-3'
QUB 26 F	5'-AACGCTCAGCTGTGGAT-3'
QUB 26 R	5'- CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCCTCCCGAT-3'
QUB4156 F	5'-TGACCACGGATTGCTCTAGT-3'
QUB4156 R	5'-GCCGGCGTCCATGTT-3'

Fuente: Supply y col., 2006; SLAMTB, 2010.

Tabla II. Iniciadores y componentes empleados en las mezclas de reacción para MIRU-VNTR 24.

MIRU	MgCl₂	DMSO
ETR A	1.5 mM	0.007 mM
ETR B	2 mM	0.007 mM
ETR C	1.5 mM	NA
MIRU 2	2.5 mM	NA
MIRU 4	3 mM	NA
MIRU 10	2 mM	NA
MIRU 16	2 mM	NA
MIRU 20	1.5mM	NA
MIRU 23	2.5 mM	NA
MIRU 24	3 mM	NA
MIRU 26	2mM	NA
MIRU 27	1.5 mM	NA
MIRU 31	2 mM	NA
MIRU 39	2.5 mM	NA
MIRU 40	3mM	NA
Mtub 04	1.5 mM	0.007 mM
Mtub 21	1.5 mM	0.007 mM
Mtub 29	2 mM	0.007 mM
Mtub 30	3 mM	0.007 mM
Mtub 34	2 mM	0.007 mM
Mtub 39	3 mM	0.007 mM
QUB 11b	1.5 mM	0.007 mM
QUB 26	1.5 mM	0.007 mM
QUB 4156	3 mM	0.007 mM

NA: no aplica; DMSO: dimetilsulfóxido

Fuente: Modificado de Supply y col., 2006; Oelemann y col., 2007.

Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2% P/V con SYBR safe, se utilizaron los carriles de los extremos para colocar el marcador de tamaño 100 bp DNA Ladder, las bandas obtenidas fueron fotodocumentadas para su posterior análisis.

Análisis de Patrones Obtenidos para MIRU-VNTR

En este estudio se utilizó el panel completo de 24 *loci* MIRU-VNTR. Para ello, primeramente se llevó a cabo un análisis *in silico* de la secuencia de la cepa H37Rv para los 24 *loci*, esto con el fin de identificar el tamaño del segmento por amplificar con cada par de iniciadores, el tamaño de las regiones flanqueantes y el número de repeticiones de cada elemento MIRU. Los datos obtenidos de este análisis (Tabla III), fueron utilizados como referencia durante todo el estudio.

El número de repeticiones se estimó, utilizando los datos obtenidos para generar la tabla III, de la siguiente manera: al tamaño de banda (obtenido con el programa TotalLab) se le restó el tamaño de las regiones flanqueantes (obtenidas con el análisis *in silico*), y el resultado fue dividido entre la longitud en nucleótidos del elemento MIRU correspondiente (Supply y col. 2006).

Posteriormente se obtuvieron los códigos numéricos de 24 dígitos para cada uno de los aislamientos. Una vez obtenidos los códigos, éstos fueron ingresados al programa Bionumerics para la generación de agrupamientos mediante el método UPGMA y el coeficiente de correlación de Pearson (Kremer y col., 2005; Oelemann y col., 2007; Allix-Béguec y col., 2008).

Con el fin de identificar los *loci* MIRU-VNTR más variables entre los aislamientos utilizados en este estudio, se calculó el índice de diversidad alélica (h) para cada locus como: $1 - \sum X_i^2$, donde X_i es la frecuencia del alelo i en cada *locus* (Sun y col., 2004).

Tabla III. Información sobre elementos MIRU, obtenidos mediante el análisis *in silico* de la secuencia genómica de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv.

MIRU	No. Copias H37Rv	Tamaño del segmento (pb)	Tamaño del MIRU (pb)	Suma ambos extremos
MIRU 2	2	508	53	402
MIRU 4	3	292	77	61
MIRU 10	3	381	53	222
MIRU 16	2	465	53	359
MIRU 20	2	591	77	437
MIRU 23	6	465	53	147
MIRU 24	1	447	54	393
MIRU 26	3	404	51	249
MIRU 27	3	657	53	498
MIRU 31	3	268	53	109
MIRU 39	2	646	53	540
MIRU 40	1	284	54	230
Mtub 04	2	639	51	489
ETRC	4	384	58	152
Mtub21	2	206	57	92
QUB11b	5	412	69	67
ETRA	3	420	75	195
Mtub29	3	563	57	392
Mtub30	2	363	58	247
ETRB	3	518	57	347
Mtub34	2	488	54	380
Mtub39	2	388	58	272
QUB26	5	718	111	163
QUB4156	2	681	59	563

pb: pares de bases

Fuente: Supply y col., 2006; Datos originales del presente trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamientos Utilizados

Como se mencionó anteriormente se utilizaron un total de 65 aislamientos clínicos, provenientes de tres regiones geográficas de México, así como la cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Sonora, ubicada en la región noroeste del país, presenta una de las tasas de incidencia de tuberculosis más altas a nivel nacional, colinda con los Estados Unidos de América al norte y al noroeste con el Estado de Baja California (Estado con la tasa de incidencia más alta a nivel nacional). Veracruz se encuentra ubicado en el sureste del país y ocupa el séptimo lugar en incidencia de tuberculosis, sólo dos lugares por debajo de Sonora. Finalmente el Estado de México se localiza en el centro del país y se ubica en el penúltimo lugar de incidencia de TB (Castellanos, 2010).

Aislamiento de ADN

Actualmente, para la extracción de ADN, existen un gran número de procedimientos, no obstante, el método más comúnmente utilizado en los laboratorios de referencia para la extracción de ADN de micobacterias es el método con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (De Armas y col., 2006), el cual utiliza solventes orgánicos tóxicos (fenol, cloroformo, etanol), y requiere de largas jornadas de trabajo. Otros métodos utilizados para la extracción de ADN, son equipos comerciales, tales como DNAzol, basado en el uso de una solución de lisis a base de un detergente derivado de la guanidina que hidroliza el ARN y permite la precipitación del ADN (Chomczynski y col., 1997).

Por otra parte, también se ha utilizado la extracción con Chelex-100. Esta resina quelante permite la obtención rápida de ADN y reduce las manipulaciones de reactivos tóxicos, así como la generación de residuos contaminantes. Adicionalmente, la extracción con Chelex-100 es menos costosa que otros

métodos tradicionalmente empleados y todavía menos costosa que los equipos comerciales (De Armas y col., 2006; Yang y col., 2008). El Chelex-100 es una resina que captura iones metálicos polivalentes en solución. El mecanismo de acción de esta resina consiste en prevenir, a través de su acción quelante, la digestión enzimática del ADN a altas temperaturas. Este efecto se logra ya que dichas digestiones son catalizadas por los iones presentes en las muestras de trabajo y al ser retirados se pierde la actividad de las nucleasas, lo que permite proteger el ADN (Buttler 2001; Zhang y col., 2005).

Cabe mencionar que en un estudio, llevado a cabo simultáneamente en conjunto con el LESP, se evaluaron parámetros como rendimiento, pureza, integridad del ADN al utilizar tres procedimientos de extracción. Los resultados de este trabajo permitieron demostrar que la extracción de ADN utilizando el método Chelex-100 permitió obtener mayor concentración de ADN con niveles de pureza adecuados, pero con bajos niveles de integridad, en un tiempo reducido y permitió evitar la utilización de compuestos tóxicos. Por otro lado, a pesar de que la integridad observada no fue adecuada, los ensayos de PCR mostraron que este factor no influyó en los resultados esperados (Hernández, 2011).

ERIC-PCR

Se utilizó la técnica de ERIC-PCR en un total de 59 aislamientos, de los cuales 23 corresponden a aislamientos de Sonora, 20 al Estado de México y los 16 restantes pertenecen al Estado de Veracruz. Para cada aislamiento se realizaron de dos a tres repeticiones en días diferentes.

Todos los datos obtenidos con el programa TotalLab, fueron depositados en una base de datos en el programa Excel, la cual contenía el número de bandas obtenido y el tamaño de cada una de ellas para cada repetición. Una vez que se confirmaron los patrones de banda, las imágenes fueron importadas

al programa BioNumerics, donde se analizaron de nuevo, para posteriormente asignar los perfiles de banda a las cepas correspondientes y finalmente crear los dendrogramas.

En la figura 4, se observan los patrones de bandas obtenidos para los aislamientos del Estado de Sonora. En esta se puede observar que se obtuvieron 19 perfiles diferentes para los 23 aislamientos; esto es, se pudieron diferenciar 15 aislamientos que presentaron perfiles únicos, sin embargo se identificaron cuatro perfiles que eran compartidos por dos aislamientos cada uno.

Para el Estado de México, el nivel de diferenciación fue similar al obtenido para Sonora, ya que se obtuvieron 15 perfiles para los 20 aislamientos de este Estado, en esta ocasión se pudieron diferenciar 11 aislamientos mediante este procedimiento, mientras que los nueve aislamientos restantes se integraron en cuatro grupos, tres con dos aislamientos cada uno y el último con 3 aislamientos (Figura 5). Por último, para los aislamientos provenientes de Veracruz, solamente dos aislamientos presentaron un mismo patrón de bandas, los 14 aislamientos restantes presentaron perfiles únicos (Figura 6).

Un dendrograma generado utilizando los perfiles de bandas de los 59 aislamientos pertenecientes a los tres Estados, permitió dilucidar que un aislamiento proveniente de Veracruz presentó el mismo patrón de bandas que dos aislamientos provenientes de Sonora (Figura 7). Estos resultados muestran la utilidad de la técnica de ERIC-PCR para la caracterización de aislamientos de *M. tuberculosis*, si bien, no fue posible obtener perfiles únicos para todos los aislamientos, si se obtuvo la diferenciación de la mayoría de ellos.

Sechi y colaboradores, evaluaron esta técnica para la caracterización de cepas del CMTB y sus resultados demostraron la utilidad de ERIC-PCR, ya que

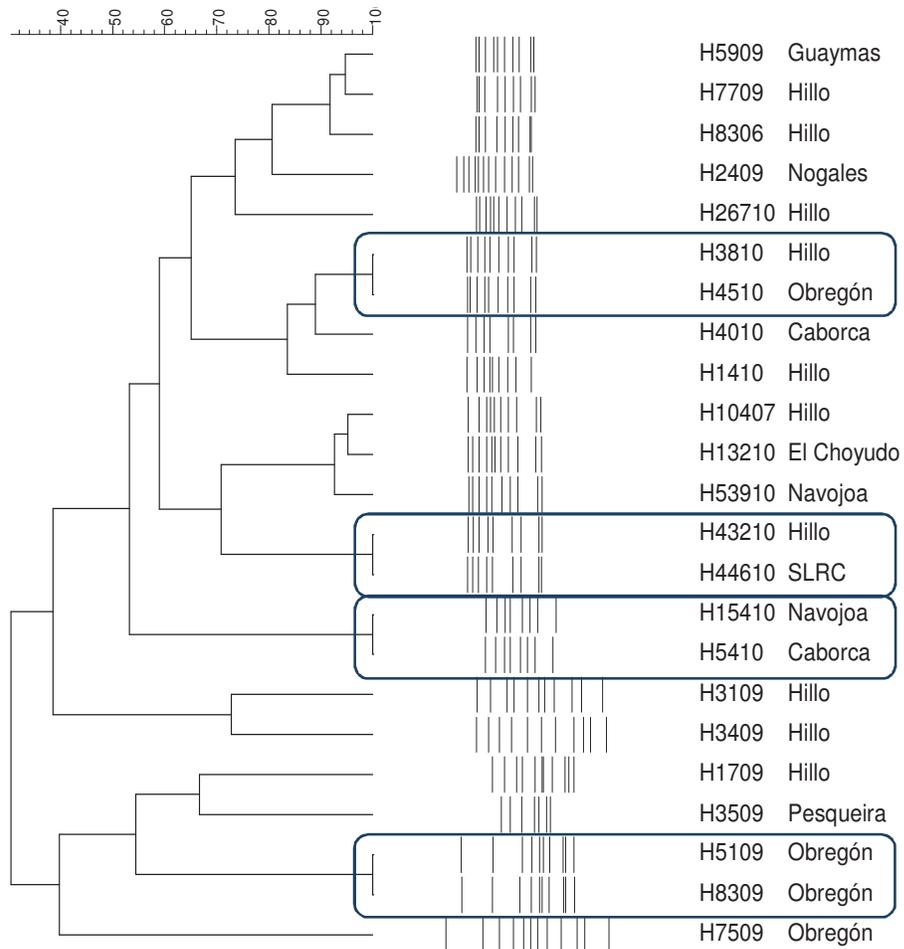


Figura 4. Dendrograma generado con los perfiles de bandas, obtenidos mediante ERIC-PCR, para los aislamientos clínicos del Estado de Sonora.

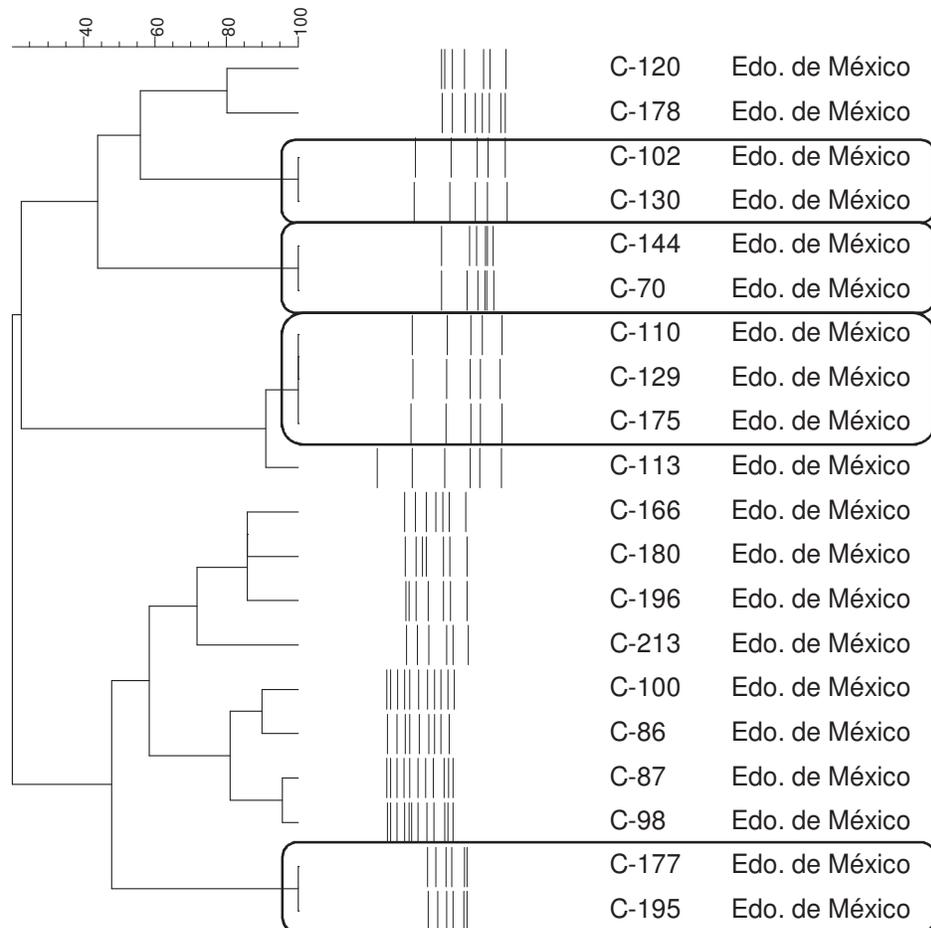


Figura 5. Dendrograma generado con los perfiles de bandas, obtenidos mediante ERIC-PCR, para los aislamientos clínicos del Estado de México.

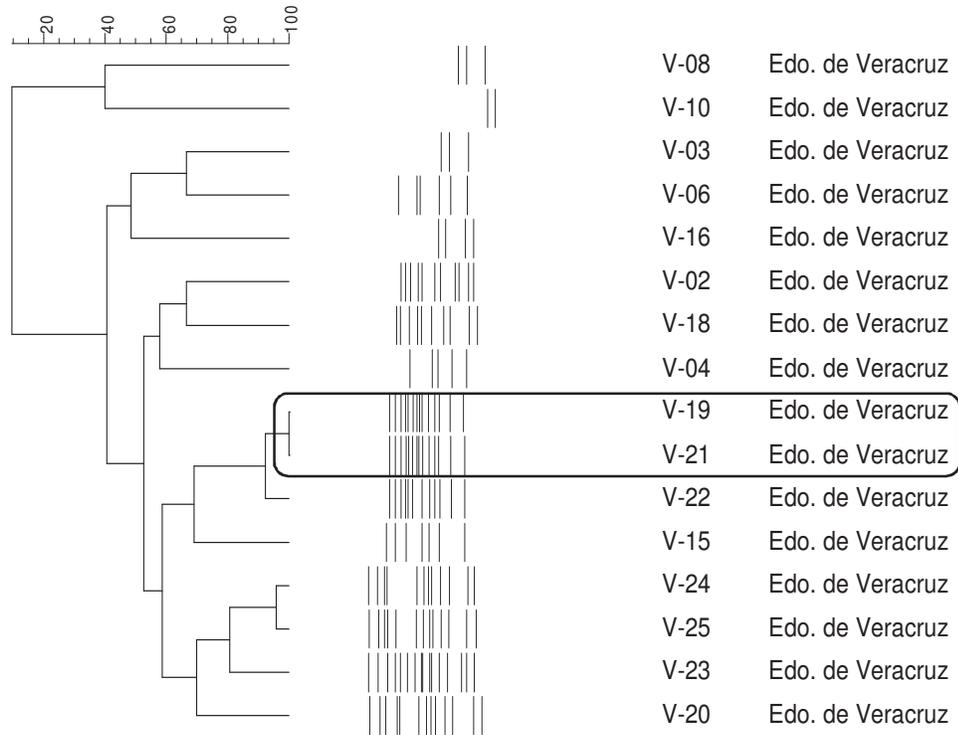


Figura 6. Dendrograma generado con los perfiles de bandas, obtenidos mediante ERIC-PCR, para los aislamientos clínicos del Estado de Veracruz.

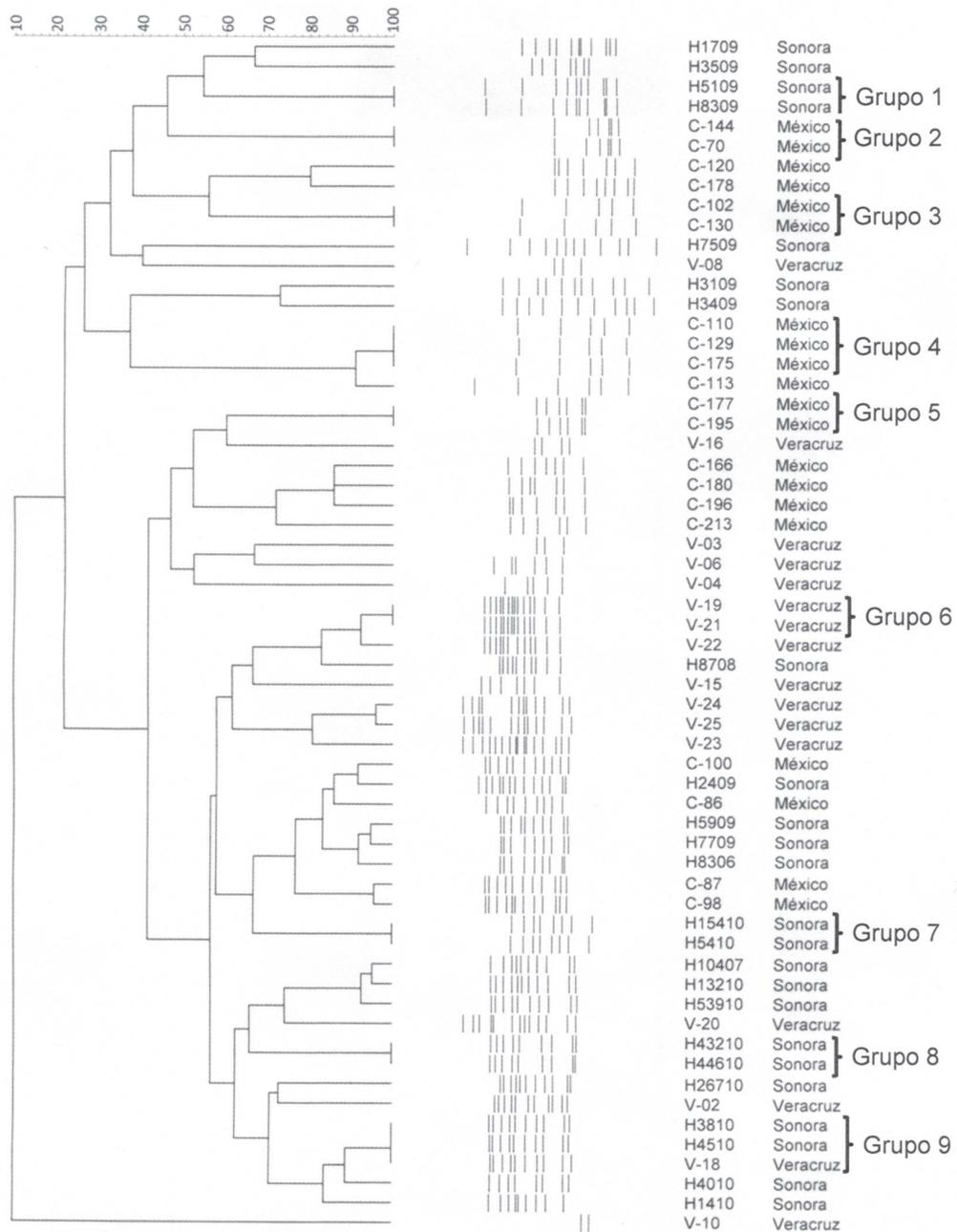


Figura 7. Dendrograma generado con los perfiles de bandas, obtenidos mediante ERIC-PCR, para todos los aislamientos clínicos utilizados en este estudio.

con esta técnica pudieron diferenciar 3 aislamientos que fueron indistinguibles mediante la técnica de IS6110-RFLP (Sechi y col., 1998). En algunos estudios se ha enfatizado la utilidad de ERIC-PCR en la caracterización genotípica de otras especies del género *Mycobacterium*, tal es el caso de un estudio donde se utilizó este procedimiento para el seguimiento de un brote de infección por *M. abscessus*, en Venezuela (Da Mata-Jardín y col., 2010).

Recientemente la técnica de ERIC-PCR ha sido utilizada en la genotipificación de varios microorganismos. Ferreira y colaboradores utilizaron esta técnica para genotipificar aislados de *Acinetobacter* y sus resultados sugieren que ERIC-PCR es una técnica rápida que ofrece buenos resultados para la caracterización genotípica de este microorganismo (Ferreira y col., 2011).

Shuan Ju Teh y colaboradores (2011), realizaron una comparación entre varios métodos para la caracterización de *Vibrio*, entre los métodos utilizados incluían RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic), VCR-PCR (*Vibrio cholerae* Repeats) y ERIC-PCR. En este estudio ERIC-PCR presentó el mayor poder de discriminación.

En el 2008, se realizó un estudio similar, para evaluar la eficacia de varios métodos en la caracterización de *Proteus mirabilis*. Los resultados mostraron que utilizando la técnica de ERIC-PCR en conjunto con otra técnica similar, resulta en una buena alternativa para la diferenciación de aislados clínicos de *P. mirabilis* (Michelim y col., 2008).

A pesar de que diversos estudios han demostrado que el análisis por ERIC-PCR es adecuado para la tipificación de diferentes géneros bacterianos, este procedimiento ha sido escasamente evaluado en aislamientos de *M. tuberculosis*. En el presente trabajo se observó que ERIC-PCR presenta un alto poder de discriminación, sin embargo, como se mencionó anteriormente, se encontraron aislamientos con perfiles de bandas idénticos, incluso entre aislamientos provenientes de diferentes Estados. Es común encontrar

aislamientos que presentan un mismo patrón para un método de genotipificación, no obstante, al emplear métodos alternativos pueden diferenciarse. Por ello se ha recomendado el uso de diferentes marcadores genéticos que permitan diferenciar los aislamientos o confirmar que efectivamente se trata de una misma cepa (Sechi y col., 1998).

MIRU-VNTR

Se analizaron un total de 65 aislamientos clínicos y la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, mediante un panel MIRU-VNTR de 24 loci. En la tabla IV se muestran los códigos numéricos para los 28 aislamientos provenientes de muestras clínicas de pacientes de Sonora. Los códigos numéricos obtenidos por MIRU 24 para los 20 aislamientos pertenecientes a pacientes del Estado de México se muestran en la tabla V y los correspondientes a los 18 aislamientos provenientes de Veracruz se muestran en la tabla VI.

En la base de datos generada, se pudo observar que algunos aislamientos coinciden en el número de repeticiones en uno o varios MIRU-VNTR, sin embargo existen diferencias en otros. Un ejemplo de lo descrito anteriormente se muestra en la tabla IV. La variabilidad en el número de repeticiones, en conjunto con el número de loci utilizados, permite la formación de un gran número de combinaciones, lo que brinda la posibilidad de obtener códigos numéricos diferentes para aislamientos diferentes, y por ende, un gran nivel de diferenciación, como ha sido observado previamente (Supply y col., 2001).

El primer dendrograma generado con el programa Bionumerics, para los perfiles MIRU-VNTR, incluyó el análisis de los 65 aislamientos clínicos y la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, con un panel de 12 loci (Supply y col., 2000). En este análisis se pudo apreciar, contrario a lo que se esperaba, que no se formaron grupos específicos por región geográfica (Figura 8). En los tres Estados se

Tabla IV. Código numérico, obtenido mediante MIRU-VNTR de 24 *loci*, de los aislamientos del Estado de Sonora. Se muestran en color rosa las diferencias entre los aislamientos H3810 y H4010.

ID	Species	MIRU02	MIRU04	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40	ETRA	ETRB	ETRC	Mub04	Mub21	Mub29	Mub30	Mub34	Mub39	OUB11b	OUB26	OUB4156
H3810	M.tuberculosis(u)	3	3	5	2	1	5	1	5	3	4	2	4	3	2	3	3	3	3	5	2	4	3	7	5
H4010	M.tuberculosis(u)	3	3	5	2	1	5	1	5	3	4	2	4	3	2	3	4	2	2	5	2	3	5	7	2
H10407	M.tuberculosis(u)	1	3	6	4	1	5	2	3	2	3	2	4	2	1	2	1	3	3	2	2	2	3	5	2
H7709	M.tuberculosis(u)	1	2	6	4	3	6	2	4	3	3	1	4	2	1	2	1	3	3	2	2	2	3	5	3
H2409	M.tuberculosis(u)	1	3	6	4	3	6	2	3	3	3	2	4	2	1	2	2	2	3	3	2	2	5	8	3
H8306	M.tuberculosis(u)	2	3	3	4	2	5	2	6	5	3	2	2	2	2	3	1	2	3	1	2	2	3	6	2
H3109	M.tuberculosis(u)	1	3	2	3	1	6	2	6	4	3	2	4	2	1	3	2	2	3	1	2	2	2	8	3
H14308	M.tuberculosis(u)	1	2	4	1	2	5	2	3	1	3	1	2	2	1	2	3	3	3	1	3	1	4	5	2
H53910	M.tuberculosis(u)	2	3	4	2	1	6	1	5	4	3	2	4	2	1	4	7	3	3	1	2	2	2	6	5
H8309	M.tuberculosis(u)	1	4	5	4	3	6	1	3	3	3	2	6	2	1	3	2	1	3	1	2	2	5	7	2
H7509	M.tuberculosis(u)	1	2	5	4	2	6	1	3	3	3	1	3	2	1	1	1	1	3	3	2	2	4	4	3
H8708	M.tuberculosis(u)	1	2	1	1	2	5	2	3	1	3	1	1	2	1	1	3	3	3	1	3	1	4	4	2
H13006	M.tuberculosis(u)	1	3	2	1	2	6	2	1	1	3	3	1	2	1	4	3	1	3	1	3	2	4	4	2
H44610	M.tuberculosis(u)	3	3	4	2	1	8	1	5	4	4	2	1	2	1	4	7	3	3	1	4	2	4	8	3
H43210	M.tuberculosis(u)	3	3	4	1	1	8	1	4	2	4	2	1	1	1	4	7	3	3	1	4	2	4	8	4
H3409	M.tuberculosis(u)	1	3	4	2	2	4	1	6	2	2	1	3	3	1	3	1	3	3	4	3	3	8	2	2
H1709	M.tuberculosis(u)	1	3	4	3	1	4	2	5	3	3	1	3	3	1	3	2	4	1	5	2	3	3	7	3
H5109	M.tuberculosis(u)	1	3	5	3	2	6	1	4	2	3	1	2	1	1	3	3	2	1	1	2	1	4	7	2
H10507	M.tuberculosis(u)	1	2	2	1	1	6	4	2	1	3	2	3	3	2	3	2	2	3	3	2	2	4	4	3
H15410	M.tuberculosis(u)	3	4	4	2	2	5	1	4	3	3	3	5	2	3	4	4	4	4	2	1	2	1	8	2
H5410	M.tuberculosis(u)	3	3	4	2	1	6	1	5	3	4	3	1	2	1	4	6	3	3	1	4	1	4	8	3
H4510	M.tuberculosis(u)	3	4	3	3	1	5	1	6	2	3	1	5	4	2	4	3	1	3	2	1	3	6	9	1
H5909	M.tuberculosis(u)	3	4	2	3	2	5	2	6	3	2	2	2	4	2	4	2	1	3	1	2	1	4	8	2
H26710	M.tuberculosis(u)	3	4	3	2	1	7	1	5	3	4	3	5	3	1	4	6	1	3	2	2	3	5	11	4
H13210	M.tuberculosis(u)	3	3	3	3	3	7	1	5	3	4	2	3	2	2	3	4	3	3	4	1	3	6	8	4
H1410	M.tuberculosis(u)	4	4	5	3	3	5	1	4	3	4	3	3	2	2	3	4	4	3	6	1	2	4	5	3
H3509	M.tuberculosis(u)	1	3	2	2	2	4	1	5	3	2	1	3	3	1	3	5	4	4	5	1	4	6	10	2

Tabla V. Código numérico, obtenido mediante MIRU-VNTR de 24 *loci*, de los aislamientos del Estado de México.

<u>ID</u>	<u>Species</u>	<u>Lineage</u>	MIRU02	MIRU04	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40	ETRA	ETRB	ETRC	Mtub04	Mtub21	Mtub29	Mtub30	Mtub34	Mtub39	OUB11b	OUB26	OUB4156
C-100	M.tuberculosis(u)		2	4	4	4	3	6	1	6	5	3	2	4	2	1	2	3	3	5	2	1	1	4	6	3
C-102	M.tuberculosis(u)		2	4	4	3	2	5	1	5	3	3	2	2	2	2	4	6	3	2	5	2	5	4	9	2
C-110	M.tuberculosis(u)		2	3	3	4	2	5	1	5	4	3	2	3	2	2	4	2	1	2	2	3	3	4	5	3
C-113	M.tuberculosis(u)		2	4	4	3	2	5	1	6	3	3	1	6	3	1	3	5	2	2	2	3	3	3	8	4
C-120	M.tuberculosis(u)		2	3	3	3	2	5	1	6	3	3	2	5	3	1	4	1	2	5	2	3	3	5	5	3
C-129	M.tuberculosis(u)		2	4	4	3	2	9	1	5	3	2	1	6	2	1	3	7	2	2	2	3	3	3	8	4
C-130	M.tuberculosis(u)		1	9	3	4	3	6	2	2	3	4	2	4	3	6	3	4	9	2	2	2	3	8	4	2
C-144	M.tuberculosis(u)		2	4	4	4	3	6	2	3	3	3	1	5	4	2	3	3	2	5	3	2	1	2	4	3
C-166	M.tuberculosis(u)		2	5	5	4	1	6	2	4	3	3	1	3	2	2	3	4	2	2	4	2	1	6	2	4
C-175	M.tuberculosis(u)		2	4	3	5	3	7	2	4	4	3	2	2	2	2	3	3	2	3	2	1	3	4	5	2
C-177	M.tuberculosis(u)		3	4	4	5	2	7	3	5	3	3	2	3	3	2	3	3	2	2	5	3	3	4	3	4
C-178	M.tuberculosis(u)		3	4	3	5	3	8	3	5	3	4	2	4	3	1	4	2	1	3	2	2	3	5	6	3
C-180	M.tuberculosis(u)		3	4	3	6	3	5	3	5	4	3	3	3	3	1	4	2	3	3	5	1	4	3	9	4
C-195	M.tuberculosis(u)		3	4	3	2	2	5	1	5	3	4	2	5	3	1	3	5	4	2	5	1	3	6	8	4
C-196	M.tuberculosis(u)		3	4	5	2	2	5	1	4	4	3	3	3	3	3	2	3	3	3	4	1	3	5	7	3
C-213	M.tuberculosis(u)		4	4	3	3	3	5	1	6	4	4	3	2	1	2	3	3	2	2	2	2	4	4	5	3
C-70	M.tuberculosis(u)		1	4	3	5	2	6	2	5	4	3	2	2	2	1	4	2	1	2	2	3	3	4	4	3
C-86	M.tuberculosis(u)		1	4	5	4	3	5	2	5	5	3	2	2	3	1	3	1	2	4	3	3	1	4	6	4
C-87	M.tuberculosis(u)		1	4	4	5	1	6	2	4	4	3	1	3	3	2	4	3	3	5	2	1	2	2	7	3
C-98	M.tuberculosis(u)		1	3	5	4	2	5	2	6	5	3	2	3	3	2	3	1	3	5	3	2	3	6	8	1

Tabla VI. Código numérico, obtenido mediante MIRU-VNTR de 24 *loci*, de los aislamientos del Estado de Veracruz.

<u>ID</u>	<u>Species</u>	<u>Lineage</u>	MIRU02	MIRU04	MIRU10	MIRU16	MIRU20	MIRU23	MIRU24	MIRU26	MIRU27	MIRU31	MIRU39	MIRU40	ETRA	ETRB	ETRC	Mtub04	Mtub21	Mtub29	Mtub30	Mtub34	Mtub39	OUB11b	OUB26	OUB4156
V-02	<i>M.tuberculosis</i> (u)		1	4	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	4	1	3	3	3	3	4	2	3	8	8	7
V-03	<i>M.tuberculosis</i> (u)		2	4	2	4	2	5	1	6	4	3	1	2	5	1	4	3	3	4	2	1	3	4	6	6
V-04	<i>M.tuberculosis</i> (u)		2	4	2	3	2	5	1	8	3	5	4	3	4	2	4	7	6	4	5	1	4	4	9	3
V-06	<i>M.tuberculosis</i> (u)		3	3	5	4	2	5	1	4	3	3	3	3	3	2	3	4	2	3	5	1	4	2	4	5
V-08	<i>M.tuberculosis</i> (u)		4	3	3	3	3	7	2	4	2	3	3	2	2	2	2	6	3	3	5	2	5	4	0	4
V-10	<i>M.tuberculosis</i> (u)		4	3	2	3	2	7	2	5	2	3	3	4	5	2	2	5	3	3	5	2	5	3	1	4
V-12	<i>M.tuberculosis</i> (u)		3	3	2	3	2	6	3	6	2	3	4	4	4	2	3	5	4	3	5	2	5	3	0	4
V-15	<i>M.tuberculosis</i> (u)		3	3	2	3	2	6	2	8	3	3	2	3	2	1	3	6	5	4	5	2	3	3	0	3
V-16	<i>M.tuberculosis</i> (u)		3	3	5	3	2	6	2	8	3	3	2	3	3	1	3	5	5	3	5	2	3	2	1	4
V-17	<i>M.tuberculosis</i> (u)		4	3	5	2	2	3	3	9	3	2	3	3	3	3	3	5	5	4	5	2	4	5	1	7
V-18	<i>M.tuberculosis</i> (u)		1	3	3	3	2	8	1	5	2	1	2	7	1	1	4	3	5	3	2	2	2	2	7	3
V-19	<i>M.tuberculosis</i> (u)		1	3	4	3	1	8	1	7	3	2	2	1	2	1	4	3	3	3	2	2	2	2	7	3
V-20	<i>M.tuberculosis</i> (u)		2	4	5	3	1	4	1	7	3	2	2	4	3	1	3	1	3	1	5	2	3	5	4	3
V-21	<i>M.tuberculosis</i> (u)		2	4	5	3	2	8	2	6	3	2	2	6	3	2	3	4	3	2	5	2	3	3	7	4
V-22	<i>M.tuberculosis</i> (u)		1	5	4	3	2	9	2	3	3	3	3	3	2	7	3	1	10	2	3	2	2	6	6	1
V-23	<i>M.tuberculosis</i> (u)		1	3	5	3	2	8	1	7	3	2	2	3	4	2	3	2	2	3	6	2	1	4	6	3
V-24	<i>M.tuberculosis</i> (u)		1	3	5	3	2	3	1	8	2	2	2	6	4	2	3	2	3	1	6	2	3	5	4	4
V-25	<i>M.tuberculosis</i> (u)		1	3	4	3	1	3	1	7	3	3	3	5	3	2	3	3	3	1	6	1	3	4	8	4

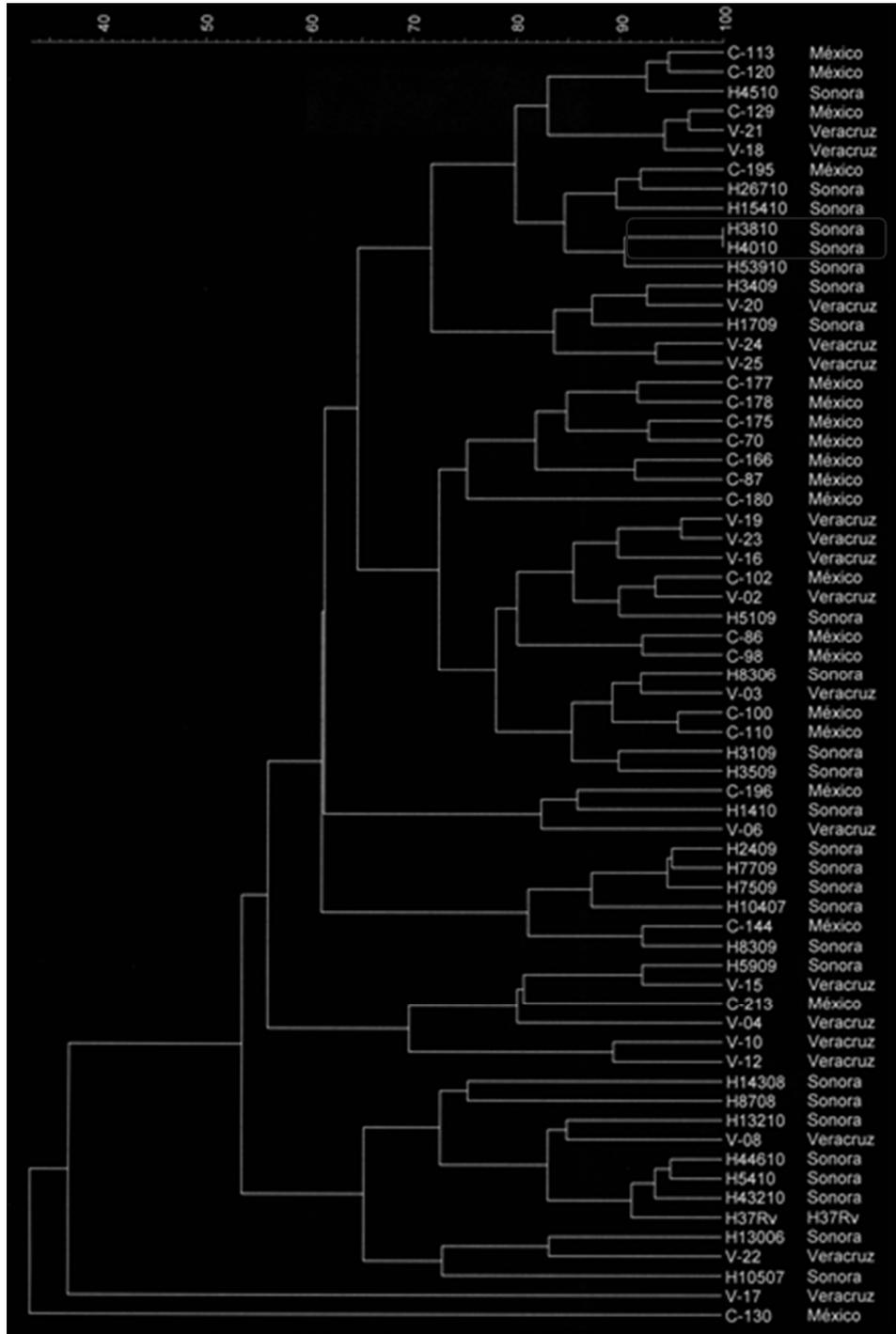


Figura 8. Dendrograma generado con MIRU-VNTR de 12 *loci*, para todos los aislamientos clínicos utilizados en el presente estudio.

identificaron grupos formados por diferentes combinaciones, sin embargo, se observa cierta tendencia de agrupamientos por entidad federativa.

Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo, se obtuvieron en un estudio realizado en España, donde se evaluaron aislamientos obtenidos de una población con un alta proporción de inmigrantes (59%) y se pudo apreciar la formación de grupos integrados principalmente por aislamientos de una sola región geográfica (Alonso-Rodriguez y col., 2009).

En el presente trabajo, se pudo apreciar que la mayoría de los aislamientos presentaron códigos numéricos diferentes, a excepción de los aislamientos clínicos H3810 y H4010 que presentaron un código numérico de 12 dígitos idéntico. En estudios previos se ha observado el poder de este panel para diferenciar entre aislamientos distintos, sin embargo, al igual que en el presente trabajo, se han encontrado un número importante de aislamientos con el mismo código numérico (Supply y col., 2001; Alexander y col., 2009).

La aparente incapacidad del panel de 12 *loci*, para diferenciar a todos los aislamientos, podría deberse al hecho de que esta formado por seis MIRU-VNTR altamente polimórficos y seis elementos con bajo polimorfismo. Este tipo de resultados llevaron a proponer que en estudios posteriores se utilice un panel nuevo con elementos MIRU que presenten un mayor grado de polimorfismo. El panel resultante, de 15 MIRU-VNTR, incluye los seis MIRU con mayor polimorfismo del panel inicial de 12 *loci*, y nueve *loci* adicionales (Alonso-Rodriguez y col., 2008).

En el presente estudio, al realizar el análisis utilizando el panel de 15 MIRU-VNTR (Figura 9), se observó la formación de grupos que contienen aislamientos provenientes de distintas regiones geográficas, sólo que en esta ocasión el número de grupos generado fue mayor. Adicionalmente, en las figuras 8 y 9, se puede observar que para algunos aislamientos, como H44610 y H5410, el porcentaje de similitud fue similar en ambos análisis (MIRU-12 y

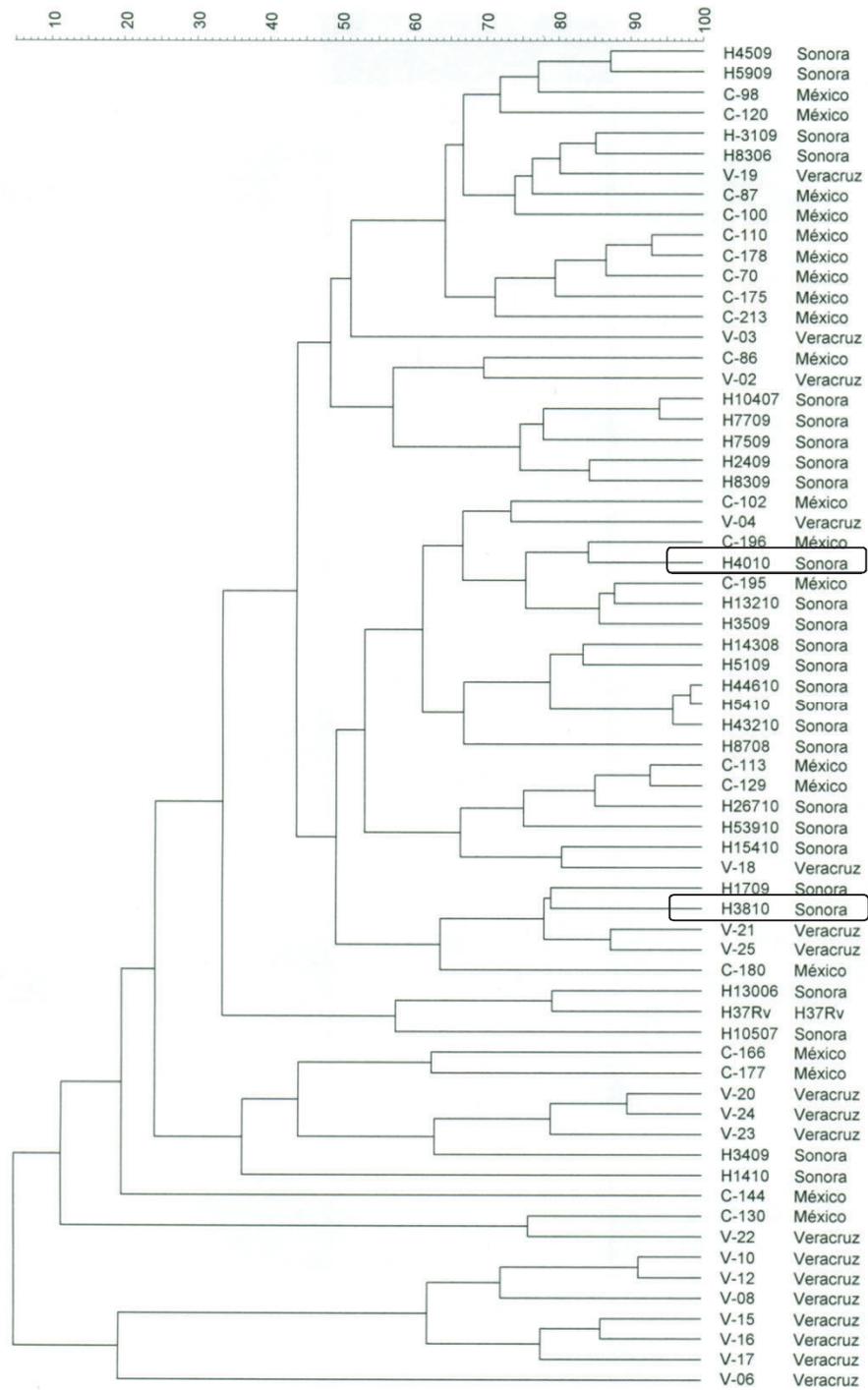


Figura 9. Dendrograma, generado con MIRU-VNTR de 15 *loci*, para todos los aislamientos clínicos utilizados en el presente estudio.

MIRU-15). Por el contrario, los aislamientos H3810 y H4010, que habían sido clasificados como la misma cepa, ya que presentaron una similitud del 100% con MIRU-12, ahora, no solamente se diferenciaron, sino que también, el porcentaje de similitud disminuyó considerablemente, hasta un 50%.

Previamente se han reportado algunas diferencias entre los resultados obtenidos con MIRU-VNTR de 12 o 15 *loci*. En un estudio realizado en España, donde se comparan ambos paneles, se observó que el panel de 15 *loci* presentó un mayor poder de diferenciación, además, al comparar los resultados obtenidos por RFLP-IS6110 y los resultados obtenidos por MIRU-VNTR 15, se encontró que este último panel, presentó una mayor correlación, que utilizando el panel de 12 *loci* (Alonso-Rodríguez y col., 2008).

La aplicación de MIRU-VNTR de 15 *loci*, ha sido ampliamente utilizada para la genotipificación de aislamientos en diferentes lugares del mundo, donde se han obtenido resultados satisfactorios. En Brasil, se realizó un estudio de genotipificación con este panel, donde se pudieron diferenciar casi todos los aislamientos y sólo dos aislamientos presentaron el mismo código numérico y no pudieron ser diferenciados, lo que puede ser explicado por el hecho de que ambas muestras provenían del mismo paciente (Alves y col., 2011). Por otra parte, Nabyonga y colaboradores, genotipificaron mediante MIRU-VNTR de 15 *loci*, aislamientos obtenidos en la región de Kampala, Uganda y sus resultados muestran que el método tiene un gran poder de diferenciación (Nabyonga y col., 2011).

El panel más completo de MIRU-VNTR, que incluye 24 *loci*; se considera el panel más discriminatorio y por lo tanto se ha propuesto como el panel internacional para la estandarización de este método (Supply y col., 2006). En la figura 10 se muestra el dendrograma obtenido utilizando el panel completo (24 *loci*), donde se puede observar la diferenciación de todos los aislamientos utilizados en el presente trabajo.

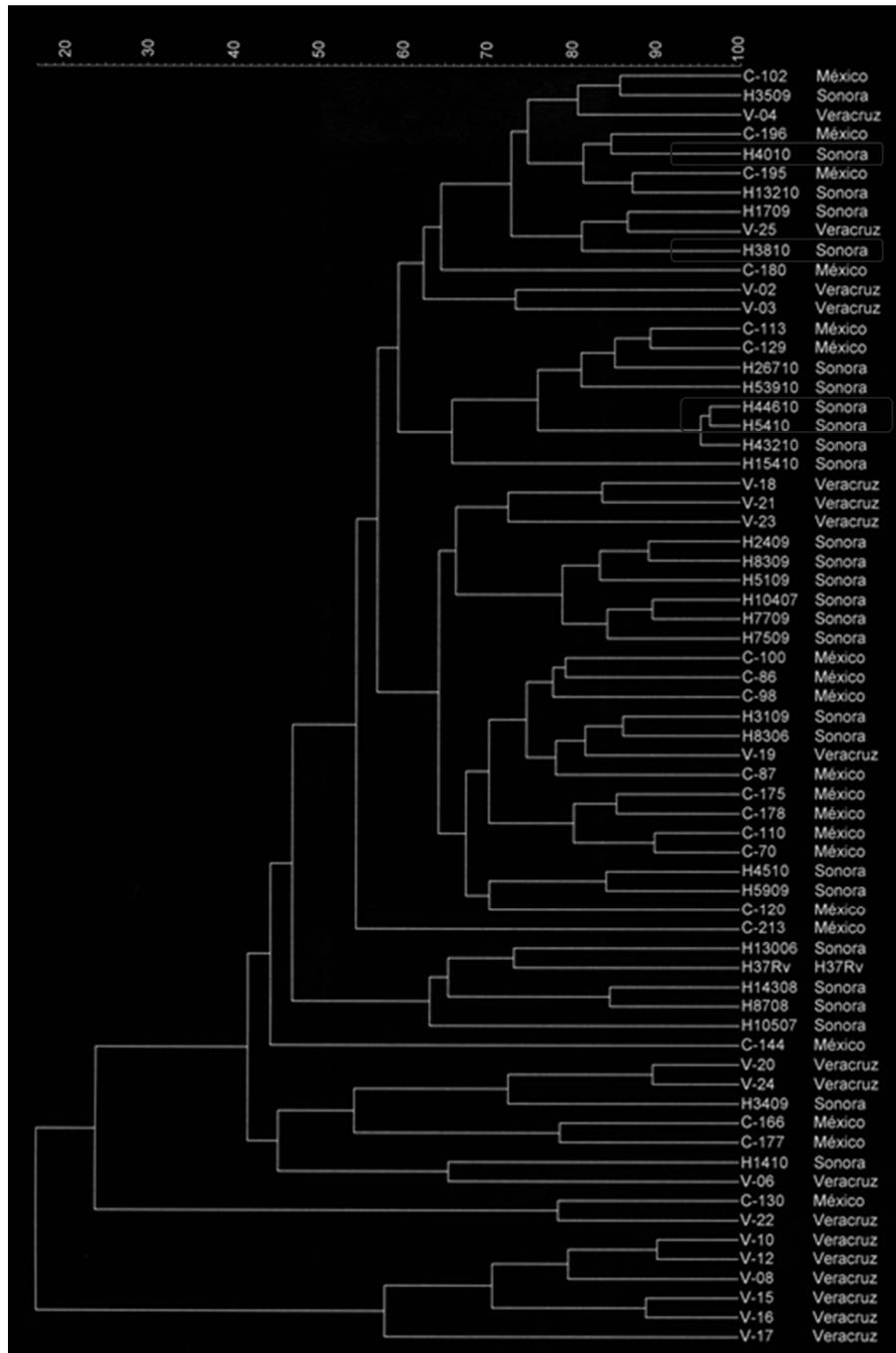


Figura 10. Dendrograma, generado con MIRU-VNTR de 24 *loci*, para todos los aislamientos clínicos utilizados en el presente estudio.

En los últimos años, numerosos estudios han evaluado el poder de discriminación de este panel. Oelemann, en el 2007, realizó una comparación entre RFLP-IS6110 y MIRU-VNTR de 24 *loci*, este último método presentó un poder de discriminación ligeramente más alto (115 perfiles únicos y 117 perfiles únicos, respectivamente) (Oelemann y col., 2007). Resultados similares fueron encontrados en un estudio realizado en Venezuela, utilizando MIRU-VNTR de 24 *loci*, donde se obtuvieron 11 perfiles únicos para 41 aislamientos, a diferencia de los resultados generados por IS6110-RFLP, procedimiento que sólo permitió distinguir nueve perfiles únicos (Maes y col., 2008).

En un estudio más reciente, con 258 aislamientos, se obtuvieron 167 perfiles únicos utilizando el método de referencia, mientras que utilizando MIRU-VNTR de 24 *loci* se obtuvo una mayor diferenciación, con 180 perfiles únicos. Adicionalmente, en este estudio, se observó que al utilizar MIRU-VNTR de 15 *loci*, en estos mismos aislamientos, se obtenía el mismo poder de diferenciación que utilizando el panel completo (Allix-Béguec y col., 2008).

Hoy en día, la genotipificación utilizando MIRU-VNTR es ampliamente aplicada a nivel mundial, debido a que presenta un nivel de diferenciación genotípica similar al estándar de oro, incluso en algunas ocasiones puede llegar a presentar mayor nivel de diferenciación (principalmente en aislamientos con bajo número de copias de IS6110). Adicionalmente, es menos compleja y se pueden obtener resultados en menor tiempo (Valcheva y col., 2008; Liu y col., 2011).

A partir de la información anterior, es posible concluir que la mayoría de los estudios han utilizado el panel convencional de 12 *loci* (Cerezo y col., 2011; Mendes y col., 2011), no obstante, este panel en ocasiones puede presentar bajo poder de discriminación. Por otro lado el panel de 15 *loci*, presenta un mayor poder de discriminación y se ha utilizado ampliamente para estudios epidemiológicos (Supply y col., 2006; Alonso-Rodríguez y col., 2008; Maes y col., 2008, Cerezo y col., 2011). Finalmente el panel de 24 *loci*, es el que

presenta el mejor poder de discriminación y adicionalmente permite realizar estudios filogenéticos (Valcheva y col., 2008; Comas y col., 2009).

Además de evaluar el poder de discriminación de los diferentes paneles de MIRU-VNTR, también se ha evaluado el poder de discriminación de cada uno de los elementos MIRU. Esto ha permitido detectar, una gran variabilidad en la diversidad alélica bacteriana en diferentes regiones del mundo. Sin embargo, actualmente se recomienda la evaluación y selección de aquellos *loci* MIRU-VNTR más adecuados para la discriminación de aislamientos de *M. tuberculosis*, en diferentes regiones geográficas (Valcheva y col., 2008).

En el presente trabajo, se observó que la variabilidad alélica de cada locus fue significativamente diferente entre los aislamientos de los diferentes Estados. Asimismo, se observó un índice de diversidad alélica elevado en cada uno de los *loci* (Tabla VII). Los *loci* MIRU 31, MIRU 39, ETRC, MIRU 20 y MIRU 24 presentaron niveles bajos de diversidad alélica, por lo que al omitir estos MIRU-VNTR en nuestro estudio, no se afectó la diferenciación de los aislamientos.

El bajo polimorfismo que presentan los MIRU's 20, 24 y 39, ha sido reportado anteriormente (Supply y col., 2001), de hecho, son tres de los seis elementos MIRU-VNTR que fueron descartados al crear el panel de 15 *loci* (Alonso-Rodriguez y col., 2008). En el presente estudio, los *loci* QUB 26, Mtub 04, QUB 11b, MIRU 26 y MIRU 40 fueron los más altamente discriminatorios para las tres regiones geográficas evaluadas, con índices de diversidad alélica (*h*) entre 0.74 y 0.87.

Es importante mencionar, que el poder de discriminación de cada *locus* puede variar en distintas regiones geográficas. Por ejemplo, en un estudio con 66 aislamientos de Camboya, se encontró que los *loci* MIRU-VNTR con mayor poder de discriminación fueron: ETRD, Mtub39, ETRA, Mtub21, ETRB, QuB26, MIRU40 y QuB11b; estos *loci* en combinación con los resultados de espoligotipado, permitieron obtener el mismo poder de discriminación que

Tabla VII. Índice de diversidad alélica correspondiente a los 24 *loci*, para las tres regiones geográficas incluidas en el presente estudio.

MIRU <i>locus</i>	Índice de diversidad alélica		
	Veracruz	Estado de México	Sonora
MIRU 2	0.72	0.67	0.60
MIRU 4	0.47	0.41	0.55
MIRU 10	0.68	0.63	0.79
MIRU 16	0.29	0.74	0.73
MIRU 20	0.27	0.58	0.63
MIRU 23	0.82	0.64	0.69
MIRU 24	0.55	0.61	0.50
MIRU 26	0.82	0.69	0.76
MIRU 27	0.47	0.6	0.64
MIRU 31	0.57	0.39	0.53
MIRU 39	0.62	0.55	0.61
MIRU 40	0.74	0.76	0.79
Mtub 4	0.82	0.79	0.82
Mtub 21	0.67	0.68	0.71
Mtub 29	0.66	0.64	0.31
Mtub 30	0.62	0.62	0.73
Mtub 34	0.34	0.66	0.60
Mtub 39	0.71	0.58	0.63
ETR A	0.74	0.57	0.58
ETR B	0.59	0.59	0.5
ETR C	0.49	0.56	0.66
QUB 11b	0.79	0.76	0.76
QUB 26	0.84	0.85	0.82
QUB 4156	0.71	0.65	0.66

MIRU-VNTR de 24 *loci* (Zhang y col., 2011).

Por otro lado, en un estudio reciente, se observó que los MIRU-VNTR que presentaban mayor diversidad alélica en Moscú, Rusia, fueron QUB 26, MIRU 26, MIRU 31, QUB 11b y ETRA, mientras que siete *loci* (MIRU 04, MIRU 20, MIRU 23, MIRU 27, ETRB, Mtub 29, y Mtub 34) fueron casi monomórficos (Afanas'ev y col., 2011). Se puede observar que existen algunos MIRU-VNTR que presentan elevada diversidad alélica en las tres regiones geográficas estudiadas en el presente trabajo. También se ha observado que regiones geográficas, relativamente cercanas, pueden compartir la variabilidad alélica de varios elementos MIRU-VNTR.

En Colombia en el 2011, utilizando el panel de 12 *loci* se reportó que los *loci* que contribuían más al poder de discriminación eran MIRU 10, 16, 23, 26 y 40 (Cerezo y col., 2011). Recientemente se obtuvieron resultados similares en diferentes regiones de América: Mendes y colaboradores (2011) encontraron que los MIRU 10, 23, 26 y 40 también fueron los más discriminatorios en Brasil, mientras que Taype y colegas, en el 2012 reportaron los MIRU 40, 10, 23, 31 y 26, como los elementos más discriminatorios en Perú.

En un esfuerzo por reducir el número de MIRU-VNTR necesarios para una adecuada diferenciación, se han realizado numerosos estudios en diversas partes del mundo. Es por ello que en un análisis adicional, realizado en el presente trabajo, se utilizaron solamente los *loci* que mostraron ser más altamente discriminatorios (QUB 26, Mtub 04, QUB 11b, MIRU 26 y MIRU 40). El dendrograma generado permitió identificar y diferenciar los 65 aislamientos clínicos, así como la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, ya que todos presentaron patrones diferentes (Figura 11). Por otro lado, a diferencia de los agrupamientos obtenidos con los paneles anteriores, donde se observan grupos formados por aislamientos de diferentes regiones, en este dendrograma podemos observar que los porcentajes de similitud son más altos en aislamientos de una misma región geográfica.

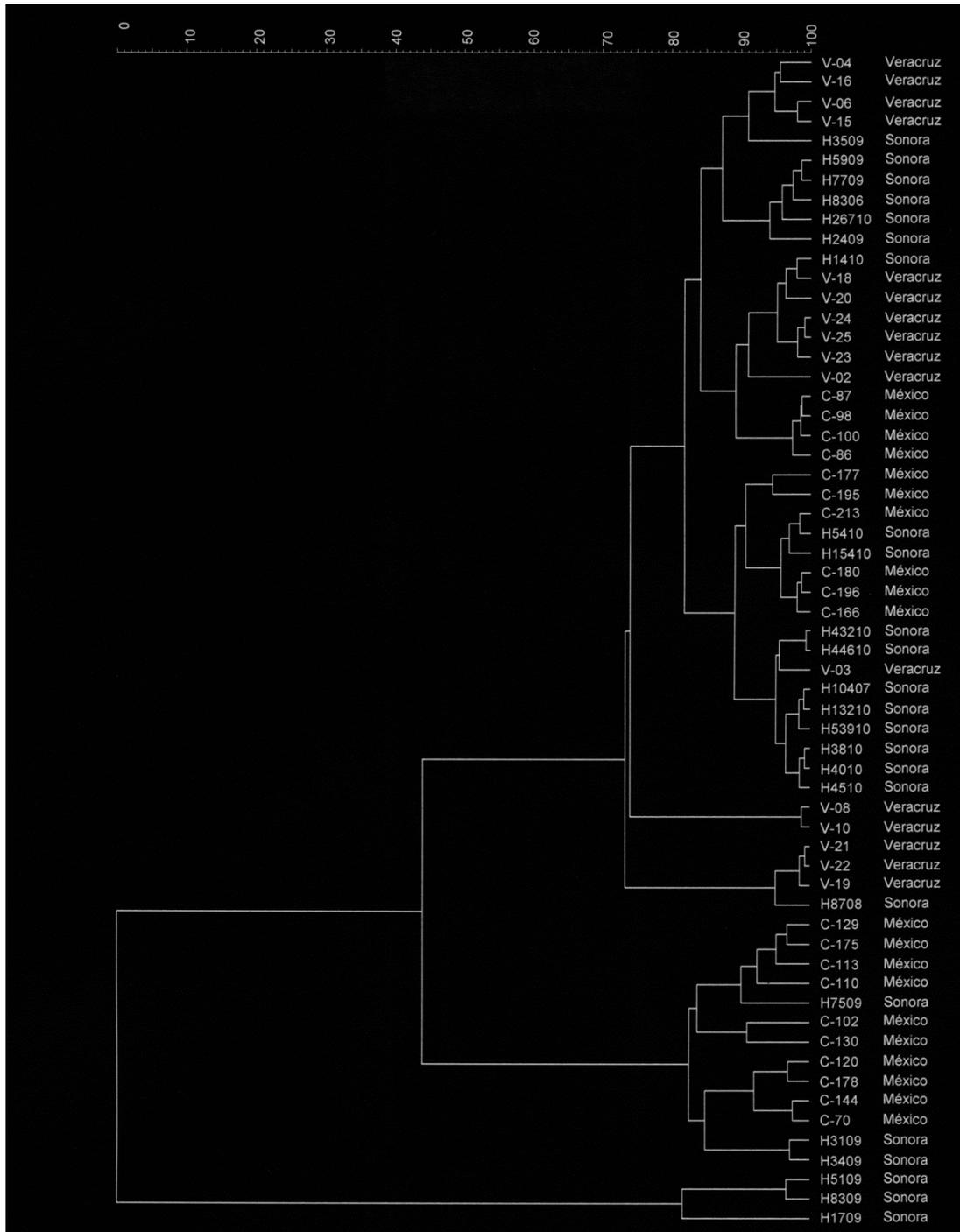


Figura 11. Dendrograma, generado con los 5 *loci* que presentaron los índices de diversidad alélica más elevados, para todos los aislamientos clínicos utilizados en el presente estudio.

Anteriormente se ha reportado el alto poder de discriminación de un número reducido de elementos MIRU. Valcheva y colaboradores, realizaron una evaluación de MIRU-VNTR de 24 *loci*, donde detectaron cinco *loci*, que en conjunto, obtuvieron el suficiente poder de discriminación para diferenciar todos sus aislamientos (Valcheva y col., 2008). En Corea del sur, se evaluó el panel completo de 24 *loci*, con el fin de determinar el panel con el menor número de *loci* que pudiera discriminar el mayor número de aislamientos. Los resultados mostraron que un panel de ocho *loci* permitía la diferenciación de la mayoría de sus aislamientos (Shamputa y col., 2010).

Por otra parte, Cerezo y colaboradores seleccionaron los cinco *loci* que obtuvieron los más altos índices de diversidad alélica y compararon el poder de diferenciación obtenido, mediante el panel propuesto y el panel tradicional de 12 *loci* en combinación con un análisis de espoligotipo; los resultados mostraron una gran similitud entre ambos paneles (Cerezo y col., 2011).

Recientemente, se evaluaron cuatro nuevos elementos MIRU's en aislamientos provenientes de China, los resultados de este estudio fueron satisfactorios, ya que este panel obtuvo un alto poder discriminatorio (Jiang y col., 2012). Así como se ha observado que la amplificación de los 24 *loci* no es necesaria en todos los casos, se ha demostrado que se pueden y deben seleccionar los *loci* que permitan la diferenciación de los aislamientos prevalentes en un área determinada (Liu y col., 2011).

Comparación entre Procedimientos de Genotipificación

Para evaluar cuál método de tipificación es más eficiente, es necesario tomar en cuenta varios factores: capacidad de tipificación, reproducibilidad y poder de discriminación. La tipificación y la reproducibilidad son relativamente sencillas de cuantificar, ya que pueden expresarse en porcentajes. Pero el poder de discriminación de un método de tipificación es la capacidad de

distinguir entre dos cepas no relacionadas que no puede ser expresado de la misma forma (Hunter y Gaston, 1988).

El índice más comúnmente utilizado para evaluar el poder de discriminación de un método de tipificación, es el índice de discriminación de Hunter-Gaston (HGDI, por sus siglas en inglés) (Maes y col., 2008; Christianson y col., 2010; Cerezo y col., 2011; Vadwai y col., 2012). Este índice, es el resultado de un modelo matemático basado en la probabilidad de que dos cepas no relacionadas de una población de prueba sean caracterizadas como diferentes por el método utilizado (Barlow y col., 2001).

Con el fin de determinar el poder de discriminación de los procedimientos utilizados en este trabajo (MIRU-VNTR y ERIC-PCR), se utilizó el HGDI empleando la ecuación que se muestra en la figura 12. Para el procedimiento de tipificación de MIRU-VNTR de 12 *loci* se obtuvo un índice de discriminación de 0.999, mientras que para MIRU-VNTR de 15 y 24 *loci*, se obtuvo un índice de discriminación igual a 1, el resultado más alto que puede obtenerse. Este mismo resultado se obtuvo utilizando el panel con los 5 *loci* más discriminatorios, lo que respalda la gran utilidad de este último panel. Sin embargo, cabe mencionar que para utilizar un panel con un bajo número de *loci*, es importante determinar primero los *loci* más discriminatorios para cada región, ya que de esto depende obtener un panel con un alto índice de discriminación (Valcheva y col., 2008).

Este alto poder de discriminación de MIRU-VNTR ha sido previamente reportado por una gran cantidad de autores (Supply y col., 2006; Oelemann y col., 2007; Jiao y col., 2008; Mulenga y col., 2010; Mendes y col., 2011; Nabyonga y col., 2011; Zhang y col., 2011).

Vadwai y colaboradores, en su estudio obtuvieron un HGDI=1 para MIRU-VNTR, mientras que para IS6110 se obtuvo un HGDI=0.998; en este trabajo se muestra que en algunas ocasiones MIRU-VNTR presenta mayor poder de discriminación que el estándar de oro (Vadwai y col., 2012).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

Donde:

N= número total de cepas en el estudio

S= número total de tipos descritos

n_j = número de cepas pertenecientes al tipo j th

Figura 12. Ecuación utilizada para obtener el índice de discriminación de Hunter-Gaston.

Fuente: Hunter y Gaston, 1988.

Desde años atrás se han realizado numerosos estudios donde se ha comparado el poder de discriminación del método de referencia contra MIRU-VNTR y los resultados han sido sumamente satisfactorios. Jiao y colaboradores, al realizar una comparación entre estos dos métodos, obtuvieron un HGDI=0.992 para MIRU-VNTR de 24 *loci* y un HGDI=0.999 para IS6110-RFLP, un índice ligeramente más alto (Jiao y col., 2008). En el 2010, Maes y colaboradores mostraron que al utilizar MIRU-VNTR de 24 *loci* se obtenía un mayor poder de diferenciación, que al utilizar IS6110-RFLP (HGDI de 0.95 y 0.93, respectivamente).

Por otra parte, también se ha evaluado el poder de discriminación de los diferentes paneles MIRU-VNTR. Se ha observado que entre mayor número de *loci* se utilice, mayor será el poder de diferenciación del método (Alonso-Rodríguez y col., 2008; Christianson y col., 2010; Afanas'ev y col., 2011). Se ha sugerido el uso combinado de MIRU-VNTR con espoligotipado, debido a que en conjunto (incluso utilizando panel de 12 *loci*) se obtienen índices de discriminación similares a los que se obtienen con IS6110-RFLP. Un ejemplo de esto se muestra en un estudio realizado en Perú, donde MIRU-VNTR de 12 *loci* presentó un HGDI=0.969, mientras que al combinar este método con espoligotipado se obtuvo un HGDI=0.988 (Taype y col., 2012).

Por otra parte, para el procedimiento de ERIC-PCR se obtuvo un índice de discriminación de 0.992, ligeramente menor a MIRU-VNTR. Hunter y Gaston en su trabajo sugieren que un índice mayor 0.90 es aceptable, por lo que podemos concluir que aun cuando no se hayan diferenciado todos los aislamientos con esta técnica, continúa siendo una buena opción para la genotipificación, en primera instancia, de aislamientos de *M. tuberculosis*.

Como se ha mencionado antes, el espoligotipo presenta un bajo poder de discriminación, además de índices de discriminación muy variables, que pueden ser tan bajos como menores de 0.8, o pueden llegar hasta un índice de discriminación cercano al 0.9 (Valcheva y col., 2008; Mulenga y col., 2010;

Cerezo y col., 2011; Zhang y col., 2011). Es por esto que el espoligotipo se utiliza como complemento a otros métodos de tipificación (Christianson y col., 2010; Bidovec-Stojkovic y col., 2011).

En este trabajo ERIC-PCR presentó un poder de diferenciación mayor a los reportados para espoligotipado, adicionalmente, requiere de menor tiempo, es menos costoso, y solamente requiere del equipo básico que se utiliza para biología molecular, por lo que podría ser utilizado como un método preliminar para la genotipificación de tuberculosis.

CONCLUSIONES

Existe una mejor discriminación al utilizar un mayor número de *loci* (24 ó 15 vs 12). No obstante, en algunos aislamientos, se detectó una gran variabilidad en el porcentaje de similitud dependiendo del número de *loci* utilizados para el análisis, mientras que en otros se mantuvo dicho porcentaje.

Al utilizar MIRU-VNTR 15 ó 24, no se observó la diferenciación de aislamientos en grupos específicos para cada región geográfica, sin embargo, para ambos métodos, sí se observó cierta tendencia a formar agrupamientos con aislamientos de una región.

Al hacer una evaluación de los MIRU-VNTR con mayor poder de discriminación, se pudo generar un panel con 5 MIRU-VNTR, que presenta el poder para diferenciar todos los aislamientos utilizados y permite obtener agrupamientos por región geográfica.

La diferenciación de aislamientos mediante MIRU-VNTR, fue mayor que la diferenciación que presentó ERIC-PCR, sin embargo, de acuerdo a Hunter y Gaston, esta técnica presenta un alto poder de discriminación, por lo que puede representar un buen método de genotipificación complementario, el cual puede realizarse en menor tiempo y con sólo un evento de amplificación.

REFERENCIAS

- Afanas'ev MV, Ikryannikova LN, Il'ina EN, Kuz'min AV, Larionova EE, Smirnova TG, Chernousova LN, Govorun VM. 2011. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* circulated in Moscow, Russian Federation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30(2):181–191.
- Alexander DC, Guthrie JL, Pyskir D, Maki A, Kurepina N, Kreiswirth BN, Chedore P, Drews SJ, Jamieson F. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* in Ontario, Canada: insights from IS6110 restriction fragment length polymorphism and mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping. *J Clin Microbiol* 47 (8):2651–2654.
- Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. 2008. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR_{plus}, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 46(8):2692-2699.
- Alcaide F, Coll P. 2011. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin Suppl* 1:34-40.
- Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Herránz M, Sanchez-Benitez M, Barroso P, INDAL-TB group, Bouza E, García D. 2008. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol* 8:34.
- Alonso-Rodriguez N, Martínez-Lirola M, Sánchez ML, Herranz M, Peñafiel T, Bonillo MC, Gonzales-Rivera M, Martínez J, Cabezas T, Diez-García LF, Bouza E, García D. 2009. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. *J Clin Microbiol* 47(7):2026-2032.

- Alves SL, Metzker FS, de Araújo-Filho JA, Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A. 2011. Clinical data and molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from drug-resistant tuberculosis patients in Goiás, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(6):655-661.
- Barnes PF, Cave MD. 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* 349(12):1149-1156.
- Barlow RE, Gascoyne-Binzi DM, Gillespie SH, Dickens A, Qamer S, Hawkey PM. 2001. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 39(7):2453-2457.
- Bidovec-Stojkovic U, Zolnir-Dovc M, Supply P. 2011. One year nationwide evaluation of 24-locus MIRU-VNTR genotyping on slovenian *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Respir Med Suppl* 1:S67-73.
- Bloom BR, Murray CJL. 1992. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. *Science* 257(5073):1055-1064.
- Bolado-Martínez E, Acedo-Félix E. 2009. Differentiation of porcine wild-type lactobacilli strains, with ERIC-PCR and PFGE band patterns included in polyphasic taxonomy. *Czech J Anim Sci* 54(7):307–314.
- Brennan PJ, Crick DC. 2007. The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug discovery. *Curr Top Med Chem* 7(5):475-488.
- Buttler JM. 2001. Forensic DNA typing. En: Sample collection and preparation (DNA extraction and quantification). Academic Press (Ed), p. 30-31. USA.
- Caminero JA. 2007. La vieja batalla entre la especie humana y el bacilo de Koch. ¿Es posible soñar con erradicar la tuberculosis?. *An Sist Sanit Navar* 30(Supl 2):163-180.
- Carriço JA, Pinto FR, Simas C, Nunes S, Souza NG, Frazão N, de Lencastre H, Almeida JS. 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for

- automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 43(11):5483-5490.
- Castellanos JM 2010. Situación actual de la tuberculosis en México... Avances y desafíos. <http://cenave.gob.mx/tuberculosis/>. [Fecha de último acceso: 05 de junio de 2012]
- Cerezo I, Jiménez Y, Hernandez J, Zozio T, Murcia MI, Rastogi N. 2011. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. *Infect Genet Evol* doi:10.1016/j.meegid.2011.07.006.
- Chimara E, Ferrazoli L, Leão SC. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using *gyrB*-restriction fragment length polymorphism analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(7):745-748.
- Cho EH, Bae HK, Kang SK, Lee EH. 2009. Detection of isoniazid and rifampicin resistance by sequencing of *katG*, *inhA*, and *rpoB* genes in Korea. *Korean J Lab Med* 29(5):455-60.
- Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. 1997. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques*. 22(3):550-553.
- Christianson S, Wolfe J, Orr P, Karlowsky J, Levett PN, Horsman GB, Thibert L, Tang P, Sharma MK. 2010. Evaluation of 24 locus MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Canada. *Tuberculosis (Edinb)* 90(1):31-38.
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. 2009. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One* 4(11):e7815.
- Da Mata-Jardín O, Hernandez-Pérez R, Corrales H, Cardoso-Leao S, Waard JH. 2010. Seguimiento de un brote de infección en tejido blando causado por *Mycobacterium abscessus* posterior a la mesoterapia en Venezuela. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28(9):596–601.

- De Armas Y, Capó V, González E, Mederos L, Díaz R. 2006. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. ADN de tejidos en parafina por resina quelante. Rev Esp Patol 39(3):171-174.
- Domínguez J, Blanco S, Lacoma A, García-Sierra N, Prat C, Ausina V. 2008. Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin 26 (Supl 9):33-41.
- Donoghue HD. 2009. Human tuberculosis-an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. Microbes Infect 11(14-15):1156-1162.
- Dorronsoro I, Torroba L. 2007. Microbiología de la tuberculosis. An Sist Sanit Navar 30 (Supl 2): 67-84.
- Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. 2006. The resumption of consumption - a review on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 101(7):697-714.
- Ferreira AE, Marchetti DP, da Cunha GR, de Oliveira LM, Fuentefria DB, Dall Bello AG, Barth AL, Corção G. 2011. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter sp.* from hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 44(6):725-730.
- Gorocica P, Jiménez-Martínez MC, Garfias Y, Sada Isabel, Lascurain R. 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 18(2):142-153.
- Hernández L. 2011. Comparación entre tres procedimientos para la extracción y purificación de ADN de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de cultivo en medio sólido. Tesis de Licenciatura, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Molina T, Valverde A, Saiz P, Jimenez M. 2009. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las

- especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27(9):496–502.
- Hett EC, Rubin EJ. 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 72(1):126-156.
- Huard RC, Lazzarini LCOO, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 41(4):1637-1650.
- Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 5(4):825-834.
- Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26(11):2465-2466.
- Iralu JV, Sritharan VK, Pieciak WS, Wirth DF, Maguire JH, Barker RHJr. 1993. Diagnosis of *Mycobacterium avium* bacteremia by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31(7):1811-1814.
- Jiang Y, Liu HC, Zheng HJ, Tang B, Dou XF, Zhao XQ, Zhu YQ, Lu B, Wang SY, Dong HY, Zhao GP, Zhang YY, Kan B, Wan KL. 2012. Evaluation of four candidate VNTR *Loci* for genotyping 225 chinese clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Biomed Environ Sci*. 25(1):82-90.
- Jiao WW, Mokrousov I, Sun GZ, Guo YJ, Vyazovaya A, Narvskaya O, Shen AD. 2008. Evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing genotype isolates from Beijing, China. *J Clin Microbiol*. 46(3):1045-1049.
- Kwara A, Schiro R, Cowan LS, Hyslop NE, Wiser MF, Roahen Harrison S, Kissinger P, Diem L, Crawford JT. 2003 Evaluation of the epidemiologic

- utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 41(6):2683-2685.
- Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutierrez MC, Hass WH, Panaiotov S, Skuce RA, Supply P, Van der Zanden AG, Van Soolingen D. 2005. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. J Clin Microbiol 43(11):5628-5638.
- Lange C, Mori T. 2010. Advances in the diagnosis of tuberculosis. Respirology 15:220–240.
- Liu Q, Yang D, Xu W, Wang J, LV B, Shao Y, Song H, Li G, Dong H, Wan K, Wang H. 2011. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates circulating in Jiangsu Province, China. BMC Infect Dis 11:28.
- Maes M, Kremer K, Van Soolingen D, Takiff H, Waard JH. 2008. 24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. Tuberculosis 88:490-494.
- Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. 2006. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. Clin Microbiol Rev 19(4):658–685.
- Mendes NH, Melo FA, Santos ACB, Pandolfi JRC, Almeida EA, Cardoso RF, Bergh H, David S, Johansen FK, Espanha LG, Leite SRA, Leite CQF. 2011. Characterization of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in São Paulo city, Brazil. BMC Res Notes 4:269.
- Metchock BG, Nolte FS, Wallace RJ. 1999. *Mycobacterium*. En: Manual of clinical microbiology. ASM Press (Ed), p. 399-437. Washington DC, USA.
- Michelim L, Muller G, Zacaria J, Delamare AP, Costa SO, Echeverrigaray S. 2008. Comparison of PCR-based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. Braz J Infect Dis 12(5):423-429.

- Mulenga C, Shamputa IC, Mwakazanga D, Kapata N, Portaels F, Rigouts L. 2010. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes circulating in Ndola, Zambia. BMC Infect Dis 10:177.
- Nabyonga L, Kateete DP, Katabazi FA, Odong PR, Whalen CC, Dickman KR, Moses JL. 2011. Determination of circulating *Mycobacterium tuberculosis* strains and transmission patterns among pulmonary TB patients in Kawempe municipality, Uganda, using MIRU-VNTR. BMC Res Notes 4:280.
- Niemann S, Harmsen D, Rühsh-Gerdes S, Richter EE. 2000. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. J Clin Microbiol 38(9):3231-3234.
- Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Haas W, Rüsche-Gerdes S, Loch C, Niemann S, Supply P. 2007. 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. J Clin Microbiol 45(3):691-697.
- Sampaio JLM, Chimara E, Ferrazoli L, da Silva MA, Del Guercio VMF, Jericó ZVN, Miyashiro K, Fortaleza CMCB, Padoveze MC, Leão SC. 2006. Application of four molecular typing methods for analysis of *Mycobacterium fortuitum* group strains causing post-mammoplasty infections. Clin Microbiol Infect 12(2):142-149.
- Sechi LA, Zanetti S, Dupré I, Delogu G, Fadda GG. 1998. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences as molecular targets for typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol 36(1):128-132.
- Shamputa IC, Lee J, Allix-Béguec C, Cho EJ, Lee JI, Rajan V, Lee EG, Min JH, Carroll MW, Goldfeder LC, Kim JH, Kang HS, Hwang S, Eum SY, Park SK, Lee H, Supply P, Cho SN, Via LE, Barry CE 3rd. 2010. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a tertiary care tuberculosis hospital in South Korea. J Clin Microbiol 48(2):387-394.

- Shuan Ju Teh C, Thong KL, Osawa R, Heng Chua K. 2011. Comparative PCR-based fingerprinting of *Vibrio cholerae* isolated in Malaysia. *J Gen Appl Microbiol* 57(1):19-26.
- Shuhaimi M, Ali AM, Saleh NM, Yazid AM. 2001. Utilisation of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence-based PCR to fingerprint the genomes of *Bifidobacterium* isolates and other probiotic bacteria. *Biotechnol Lett* 23(9):731-736.
- SINAVE, Secretaría de Salud. 2012. Perfil epidemiológico de la tuberculosis en México. SINAVE/DGE/SALUD/Perfil Epidemiológico de Tuberculosis en México.
- SLAMTB. Curso precongreso. 2010: Zacatecas, Zacatecas, México.
- Sun YJ, Bellamy R, Lee AS, Ng ST, Ravindran S, Wong S, Loch C, Supply PH, Paton NI. 2004. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *J Clin Microbiol* 42(5):1986-1993.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsç-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Loch C, van Soolingen D. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44(12):4498-4510.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, Loch C. 2001. Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 39(10):3563-3571.
- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Loch C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 36(3):762-771.

- Taype CA, Agapito JC, Accinelli RA, Espinoza JR, Godreuil S, Goodman SJ, Bañuls AL, Shaw MA. 2012. Genetic diversity, population structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *Infection, Genetics and Evolution* 12:577–585.
- Vadwai V, Shetty A, Supply P, Rodrigues C. 2012. Evaluation of 24-locus MIRU-VNTR in extrapulmonary specimens: study from a tertiary centre in Mumbai. *Tuberculosis (Edinb)* 92(3):264-272.
- Valcheva V, Mokrousov I, Narvskaya O, Rastogi N, Markova N. 2008. Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. *J Clin Microbiol* 46(9):3005-3011.
- Van Soolingen D, de Haas PEW, Haagsma J, Eger T, Hermans PWM. 1994. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 32(10):2425-2433.
- Ventura M, Meylan V, Zink R. 2003. Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. *Appl Environ Microbiol* 69(7):4296-4301.
- Vilchez G, Alonso G. 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev Soc Ven Microbiol* 29(1):6-12.
- World Health Organization. 2011. World Health Organization Report 2011. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Yang JL., Wang MS., Cheng AC., Pan KC., Li CF., Deng SX. 2008. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World J Gastroenterol* 14(18):2872-2876.

- Zhang J, Heng S, Le Moullec S, Refregier G, Gicquel B, Sola C, Guillard B. 2011. A first assessment of genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Cambodia. *BMC Infect Dis* 11:42.
- Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL, Zhang XL, Wang HH. 2005. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 43(11):5477-5482.