

**“ANÁLISIS MOLECULAR DE LA
VARIABILIDAD DE CEPAS DE *M. Tuberculosis*
FARMACORRESISTENTE EN POBLACIÓN DEL
ESTADO DE JALISCO”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO

ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA
EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA PRODUCTIVA**

PRESENTA

M. en C. GLADYS GUADALUPE LÓPEZ AVALOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

Guadalajara, Jalisco, México

Dirigida por:

Dra. Ikury Alvarez Maya
(CIATEJ)

Y

Asesorada por:

Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez
(CIATEJ)

Dr. Eduardo Padilla Camberos
(CIATEJ)

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me permitió seguir en este camino y que me dio la paz y la tranquilidad en los momentos en los que mas lo necesite.

A mi familia por su apoyo tanto moral como económico, su paciencia y su cariño aunque fuera a la distancia nunca me sentí sola debido a que sabía que siempre podía contar con ellos.

A mi querido esposo que siempre ha sido mi gran apoyo, la persona que siempre esta a mi lado echándome porras y que nunca me deja sola por más difícil que sea el camino, le agradezco el haber estado conmigo tantas veces en esos experimentos que parecían interminables, en esas noches de desesperación que pasamos y que me ayudo a convencerme que si podía con esto y a no regresarme a Chihuahua al día siguiente de haber llegado.

A la doctora Ikury porque me aceptó en su grupo de trabajo aún y cuando ya sólo me quedaba la mitad del tiempo de mi estancia en CIATEJ, que me apoyo siempre para probar metodologías nuevas y hacer crecer mi pasión por el mundo de la investigación

A la doctora Sara y al doctor Eduardo que fueron un gran apoyo en este camino, por sus palabras de aliento, sus aportaciones al proyecto, por siempre interesarse en mi tesis y en mí como persona.

A mis compañeras de laboratorio Lupita y Moni que fueron un gran apoyo en el laboratorio y en la vida, por siempre enseñarme cosas nuevas y entenderme y quererme en el transcurso de nuestro tiempo juntas en el laboratorio.

A todos los que fueron mis alumnos y que me ayudaron con la elaboración de el trabajo experimental: a Ninfa, Daniel, Rodrigo, Eduardo, Andrés, Ana Laura, Isabel, Vero y Cesar; gracias por su paciencia y por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Chuck, Brenda, Yessi, Marce, Chuy, Lalo, Rosa, Titi, Paty y Gisela, por sus risas, sus regaños, y por hacer mas amena la vida en el laboratorio, de las cosas que mas extrañare de Ciatej serán todos y cada uno de ustedes, gracias por su amistad y su cariño a lo largo de estos 4 años.

DEDICATORIA

*Deseo dedicar este trabajo a la memoria de mi
hija, la que solo estuvo en mi vientre y en mi corazón y que
aunque no tuvo la oportunidad de llegar a mis brazos me enseñó lo que
es el amor incondicional y el ser madre por primera vez, y también a
ese bebe que viene en camino en estos momentos que a sido mi fuerza,
mi voluntad, mi razón de vivir y la alegría que por fin mi corazón vuelve a
sentir*

A ambas les dedico este trabajo.

teÍndice de contenidos

1.- Resumen -----	1
2.- Antecedentes -----	2
2.1.- Tuberculosis -----	2
2.2.- Epidemiología y estadísticas de tuberculosis -----	3
2.3.- Epidemiología y estadísticas de MDR-TB -----	4
2.4.- Farmacorresistencia de M. tuberculosis -----	4
2.5.- Métodos de evaluación de variabilidad genética -----	4
2.6.- Fragmento de inserción IS6110 -----	6
2.7.- Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism RFLP)-----	6
2.8.- Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism AFLP) -----	7
2.9.- Spoligotyping -----	7
2.10.- Unidades interespaciadores micobacterianas repetidas, número variable de repeticiones en tándem (MIRU-VNTR) -----	9
2.11.- Transmisión de la tuberculosis -----	10
2.12.- Factores de riesgo de transmisión reciente -----	11
2.13.- Programas de control de la tuberculosis -----	11
3.- Hipótesis -----	12
4.- Justificación -----	12
5.- Objetivo general -----	13
5.1.- Objetivos particulares -----	13
6.- Materiales y descripción del estudio -----	14
6.1.- Descripción del estudio -----	14
6.2.- Criterios de selección de muestras de tuberculosis -----	14
6.3.- Factores de riesgo analizados -----	15
6.4.- Descontaminación del esputo por la técnica de Petroff -----	16
6.5.- Inactivación mediante la técnica de ebullición -----	16
6.6.- Extracción de ADN -----	16
6.7.- Sensibilidad a antibióticos -----	17
6.8.- Amplificación mediante PCR -----	17
6.8.1.- Fragmento de inserción IS6110 -----	17
6.9.- Determinación de la variabilidad genética por la técnica de Spoligotyping-----	18
6.10.- Determinación de variabilidad genética por el método de MIRU- VNTR -----	22
6.11.- Análisis filogenético -----	24
7.- Resultados -----	25
7.1.- Descripción de las muestras -----	25
7.2.- Factores de riesgo -----	29
7.3.- PCR IS6110 -----	31
7.4.- Evaluación de la variabilidad genética por la técnica de spoligotyping -----	33
7.5.- MIRU – VNTR -----	54

7.6.- Localización geográfica de las cepas -----	68
8.- Correlación de características clínicas y de resistencia a antibióticos ----	69
9.- Conclusiones -----	74
10.- Perspectivas -----	74
11.- Bibliografía -----	75

Índice de figuras

1.- Ciclo de amplificación para el fragmento de inserción IS6110 -----	18
2.- Ciclo de amplificación de la región RD -----	18
3.- Ciclo de amplificación del MIRU-VNTR -----	23
4.- Gráfica de la escolaridad de los pacientes del estudio -----	29
5.- Gráfico de barras de la escolaridad de los pacientes del estudio -----	30

6.- Gráfico de barras de los factores de riesgo presentes en los pacientes del estudio-	30
7.- Cinética de DNA y Taq polimerasa -----	31
8.- Amplificación del fragmento de inserción IS6110 -----	32
9.- Amplificación de secuencias espaciadoras -----	33
10.- Film de quimioluminiscencia -----	34
11.- Datos simplificados de lo obtenido en la membrana de hibridación en la que se muestra el linaje al que pertenece cada una de las muestras -----	36
12.- Dendograma de Neighbour Joining de las muestras del estudio -----	41
13.- Análisis de complejos clonales formados en las cepas del estudio mediante Minimum spanning tree -----	46
14.- Árbol de expansión mínima del análisis de Spoligotyping y MIRU-VNTR de 24 locis -----	48
15.- Árbol de expansión mínima de las técnicas de Spoligotyping y MIRU-VNTR de 15 locis -----	50
16.- Árbol de expansión mínima de la técnica de Spoligotyping y MIRU-VNTR 12 locis-----	52
17.- MIRU 26 en muestras polirresistentes -----	53
18.- MIRU 52 y 47 en muestras polirresistentes -----	54
19.- MIRU 47 y 53 en muestras polirresistentes -----	55
20.- MIRU 31 en muestras polirresistentes -----	55
21.- MIRU 48 en muestras polirresistentes -----	56
22.- MIRU 49 en muestras polirresistentes -----	56
23.- MIRU 10 y 46 en muestras polirresistentes -----	57
24.- MIRU Mtub 21, QUB 11b, ETRC y ETRA en muestras polirresistentes-----	58
25.- MIRU 16 en muestras polirresistentes -----	58
26.- MIRU 39 y 27 en muestras polirresistentes -----	59
27.- MIRU 2 y ETRA en muestras polirresistentes -----	59
28.- MIRU 20, 24 Y 23 en muestras polirresistentes -----	60
29.- MIRU 26 en muestras reincidentes -----	60
30.- MIRU 10, MIRU 49 Y MIRU 16 en muestras reincidentes -----	61
31.- MIRU 46 en muestras reincidentes -----	61
32.- MIRU 42 en muestras MDR -----	62
33.- MIRU 26 en muestras MDR -----	62
34.- MIRU 52 en muestras MDR -----	63
35.- MIRU 53 en muestras MDR -----	63
36.- MIRU 16 y MIRU 29 en muestras MDR -----	64
37.- Dendograma del análisis MIRU-VNTR de los 3 grupos de estudio: MDR, Reincidentes y polirresistentes -----	65
38.- Análisis geográfico de linajes de las cepas presentes en el estado de Jalisco -----	67

Índice de tablas

1. Criterios de inclusión, no inclusión y exclusión para formar los grupos de estudio -----	14
2. Condiciones de amplificación del fragmento de inserción IS6110 -----	18
3. Condiciones de amplificación de la región RD -----	19
4. Oligonucleotidos inmovilizados en la membrana -----	21

5.- Conversión de tripletes en código octal -----	22
6.- Reactivos utilizados para la amplificación de los loci del MIRU-VNTR -----	22
7.- Base de datos de las muestras del estudio -----	25
8.- Escolaridad de los pacientes del estudio -----	29
9.- Ocupación de los pacientes del estudio -----	30
10.- Factores de riesgo de los pacientes del estudio -----	30
11.- Linaje de cepas presentes en el estudio -----	37
12.- Características de los clusters observados en el análisis del dendograma -----	42
13.- Razón de momios de los factores de riesgo y linajes respecto a la resistencia de las muestras-----	68

1.- Resumen

La tuberculosis es un problema de salud a nivel mundial que ha sido controlado, pero no ha sido posible su erradicación. Existen diferentes técnicas de biología molecular que nos permite identificar la variabilidad genética de las muestras presentes en nuestra población, y son capaces de distinguir si la cepa es una reinfección o una reactivación o si se trata de una contaminación cruzada y las dinámicas de transmisión de las muestras. El objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad genética y las dinámicas de transmisión de las muestras presentes en nuestro estudio, nuestra hipótesis es que las muestras están interrelacionadas y están distribuidas a través de todo el estado de Jalisco. Las muestras fueron obtenidas del laboratorio estatal de salud pública, el DNA fue aislado por la técnica de CTAB y se realizó una PCR para amplificar la secuencia de inserción IS6110 para verificar que las muestras pertenecían al complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Después de esto la técnica de Spoligotyping y MIRU-VNTR de 24 locis fue realizada, los resultados fueron analizados mediante dendogramas y árboles de expansión mínima usando apropiados programas de bioinformática. En el estudio, 64 muestras fueron analizadas y la técnica de spoligotyping mostró un índice de discriminación de 0.64%. Siete diferentes linajes fueron identificados, huérfanos 53.96%, T 25.63%, H 7.93%, MANU 4.76%, X 3.17%, LAM y EAI5 1.68%, con la formación de seis clusters, lo cual sugiere que existen diferentes puntos de infección en la comunidad. Sin embargo cuando se realizó la técnica de MIRU, la cual tiene un índice de discriminación de 0.99, no se observó la formación de ningún cluster sugiriendo que las muestras no están interrelacionadas, y quizá esta variabilidad está relacionado a la baja adherencia al tratamiento. Se realizó el análisis de correlación de comorbilidades con la resistencia a antibióticos de las muestras demostrando que aquellos pacientes diabéticos, con VIH, alcohólicos o desnutridos tienen un mayor riesgo de tener fallo al tratamiento o de ser resistentes a más de un antibiótico; de igual manera los linajes huérfanos, T1 y H3

2.- ANTECEDENTES

2.1 Tuberculosis

La tuberculosis permanece como un problema global relacionado principalmente con pobreza y co-infecciones (Nava y cols 2011), esta enfermedad causada por la bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis*, ataca los pulmones, pero puede dañar otros órganos del cuerpo como el riñón, la espina dorsal y el cerebro y si no se trata apropiadamente puede ser mortal. La tuberculosis se disemina a través del aire de persona a persona a través de pequeñas gotitas que son liberadas cuando una persona infectada con tuberculosis pulmonar tose, estornuda, habla o canta (CDC).

Si bien la mayoría de los casos de tuberculosis son sensibles a los medicamentos, la tuberculosis multifarmacorresistente (MDR-TB) es una amenaza emergente para el control a nivel mundial de la enfermedad. Las cépas que se consideran MDR-TB son aquellas con resistencia a los dos medicamentos más potentes (isoniazida y rifampicina), lo cual se traduce en una mayor dificultad para curar a este tipo de enfermos (CENAVECE).

En la tuberculosis el desarrollo de resistencia a antibióticos a nivel genético es principalmente debido a sustituciones sinónimas de un solo nucleótido, inserciones o deleciones (Osorio y cols 2013). El desarrollo de esta resistencia es debido a tres causas principales: por el personal de salud con tratamientos inadecuados (dosis no efectiva, prescripción incompleta o inadecuada, empleo de medicamentos o combinaciones de los mismos con eficacia no demostrada), debido a los medicamentos (mala calidad, tratamientos incompletos, falta de disponibilidad de medicamentos, malas condiciones de almacenamiento), pacientes (ingesta inadecuada de medicamentos, efectos adversos, falta de recursos económicos para transporte, mala absorción, factores socioculturales), por lo que es cada vez más frecuente que se desarrolle la multirresistencia en ésta enfermedad (CENAVECE).

Los lineamientos para el manejo de la tuberculosis recomienda el uso de rifampicina e isoniazida, se le comienza a tratar con estos dos fármacos ya que se combina la actividad



bactericida temprana de la isoniazida con la actividad esterilizante de la rifampicina produciendo desenlaces clínicos favorables en el caso de las cepas que son sensibles a estos antifímicos. Sin embargo en las cepas multidrogorresistentes (MDR-TB) estos antifímicos no son efectivos, en este caso se necesita utilizar antibióticos de segunda generación los cuales son menos efectivos, más tóxicos (Kennedy y cols 2011) y más costosos (Merza y cols 2010)

Una de las mayores preocupaciones en el control de la tuberculosis es la dispersión de las cepas MDR-TB, y de las llamadas extremadamente resistentes (XDR-TB) las cuales tienen resistencia adicional a las fluoroquinolonas y a uno de los tres antifímicos inyectables de segunda línea (amikacina, capreomicina, kanamicina) y recientemente se ha reportado un tercer tipo de resistencia la panresistencia en las cuales son resistentes a todas las drogas de primera y segunda línea (Stoffels y cols 2013)

2.2.- Epidemiología y Estadísticas de tuberculosis

De acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* y de 5 a 10 por ciento de las personas infectadas podrían desarrollar tuberculosis activa a lo largo de su vida (CENAVECE)

En el 2012 se reportaron 8.6 millones de casos y más de 1.3 millones de muertes por tuberculosis en todo el mundo

En la unión Europea el costo anual asociado con infecciones resistentes a tuberculosis se estima en 1.5 mil millones de euros mientras que en Estados Unidos se estima que son más de 16 mil millones de dólares (Spicknall y cols 2013)

En México en el 2011 se detectaron 12960 nuevos casos de tuberculosis pulmonar y 3529 nuevos casos de tuberculosis extra pulmonar así como 2000 decesos debido a esta enfermedad, también hubo 1542 casos de retratamiento debido a falla o abandono del tratamiento (WHO 2011)

En el país existe un patrón de concentración bien definido de estados con tasas de incidencia elevadas, principalmente en occidente y golfo de México con menor incidencia en los estados del centro, además la TB sigue siendo más frecuente en los varones (1.5:1), aunque varía de

un estado a otro, esto puede deberse a factores sociales y de comportamiento, ya que en los enfermos en edad pediátrica prácticamente no existe diferencia alguna (1.1:1) (CENAVECE).

2.3.- Epidemiología y Estadísticas de MDR-TB

El último estimado de la OMS menciona que hubo 650 000 casos de MDR-TB de los 12 millones de casos de tuberculosis (Stoffels y cols 2013). No se conoce con exactitud el número de casos con tuberculosis extremadamente resistente que existe, pero se estima que por lo menos 19 por ciento de aquellos casos con multifarmacorresistencia son extremadamente resistentes (CENAVECE)

En pacientes que son MDR- TB se han observado tasas de mortalidad de 11-37%, sin embargo cuando se tiene la co-infección de TB-VIH la prevalencia de mortalidad anual es de más del 71% (Kennedy y cols 2011).

El número de casos y el impacto de las medidas de control actuales en tuberculosis enfatizan la necesidad urgente de generar mejores herramientas para el diagnóstico, tratamiento y prevención de tuberculosis, entre estos se encuentra la necesidad de realizar diagnósticos más sensibles y rápidos, tiempos de tratamiento más cortos y vacunas más efectivas

2.4.- Farmacorresistencia de M. Tuberculosis

La evolución y la dispersión de las cepas resistentes a antibióticos es un problema creciente en salud pública. La frecuencia de resistencia a antibióticos en bacterias patógenas se está incrementando alrededor del mundo, y las resultantes fallas en la terapia antimicrobiana causa miles de muertes anualmente (Palmer y cols 2013)

2.5.- Métodos de evaluación de variabilidad genética

Por décadas los científicos creían que diferentes desenlaces clínicos o epidemiológicos de la infección de *M. Tuberculosis* en humanos estaban relacionados a la susceptibilidad del hospedero y a factores medio ambientales pero no por la bacteria. Sin embargo esta visión ha cambiado desde la mitad del año 2000 (Elvira- Balcells y cols 2015)

Para la identificación de cepas, durante mucho tiempo se han utilizado marcadores que se basan en las características expresadas por los microorganismos (fagotipia, resiotipia, serotipia, y análisis de plásmidos), actualmente estas técnicas fenotípicas se están sustituyendo por técnicas moleculares que analizan la huella genética. En 1991 se logró la obtención de secuencias repetitivas en el genoma de *M. tuberculosis*, este ha sido el punto de partida para comparar las huellas genéticas de los distintos aislamientos y, por tanto, establecer diferencias entre diversas cepas (García-Pachón y cols 2005)

M. tuberculosis, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. canettii* son pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y están altamente relacionadas genéticamente lo cual se ha demostrado con la alta similitud en la secuencia genética del 16s al 23s. Debido a esto un alto grado de polimorfismos de DNA están asociados con DNA repetitivos como son los elementos de inserción (IS), se han identificado varios IS en *M. tuberculosis*: IS6110, -1081, -1547 y elementos parecidos a IS, de éstos el que más se utiliza como marcador genético en investigaciones epidemiológicas es el IS6110 debido a su aparente movilidad y su alto número de copias en la mayoría de las muestras clínicas (Kremer y cols 1999)

Por décadas los científicos creían que los diferentes desenlaces clínicos y epidemiológicos de esta infección en humanos estaban relacionados con la susceptibilidad y factores medioambientales, y no con la bacteria. Sin embargo esta visión ha cambiado a partir de la mitad de los años 2000 cuando herramientas genómicas y moleculares identifican polimorfismos de secuencia larga (LSPs) que permite diferenciar *M. Tuberculosis* dentro de los principales 6 linajes que define su origen. Estos linajes fueron definidos como Indo-Oceanic (linaje I), East Asian (linaje II incluyendo Beijing), East African Indian (linaje III), Euro-American (linaje IV), West-Africa (linaje V, *M. Africanum* I), y West Africa (Linaje VI; *M. Africanum* II). Los linajes I, V y VI son considerados ancestrales y del II al IV modernos (Elvira-Balcells y cols 2015).

Una variedad de métodos han sido utilizados para visualizar los polimorfismos en cepas del complejo *M. tuberculosis*, éstas incluyen Fragmentos de restricción en longitudes de polimorfismos (RFLP), hibridación de DNA (*Spoligotyping*), PCR (MIRU-VNTR) y

combinaciones de éstos métodos (Kremer, K y cols 1999). La genotipificación de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* ha cambiado de forma revolucionaria muchos conceptos sobre la transmisión de la tuberculosis que se habían aceptado durante décadas (García- Pachón E y Rodríguez J 2005) contribuyen al control de la enfermedad, indicando posibles asociaciones epidemiológicas entre pacientes, detectando brotes sospechosos, detectar contaminación cruzada en el laboratorio y distinguir de reinfección exógena de un caso de reactivación endógena en recaídas (Supply, P y cols 2006)

2.6.- Fragmento de inserción IS6110

IS6110 es un elemento de inserción que se encuentra exclusivamente dentro del complejo *Micobacterium*; esto debido a la carencia de intercambio genético con otras especies de micobacterias (Coros A y cols 2008). Estas secuencias difieren entre especies en solo unas pocas pares de bases y pueden ser consideradas esencialmente el mismo elemento (Van Embden J y cols 1993). Un beneficio de esta exclusividad es que el IS6110 se ha vuelto un diagnóstico importante en la diferenciación de especies que pertenecen al complejo *M. tuberculosis* comparada con aquellas que no están dentro de este complejo. Además la presencia de este fragmento de inserción en múltiples copias y en diferentes lugares en el genoma es un excelente método para genotipificar cepas de tuberculosis, debido a esto IS6110 ha sido utilizado para estudios epidemiológicos (Coros A y cols 2008 y Nava-Aguilera E y cols 2011).

2.7.- Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism RFLP)

Es el método más utilizado y que se considera de referencia. Se realiza siguiendo un protocolo estandarizado que analiza la secuencia IS6110 y es una técnica muy reproducible y útil para distinguir entre los aislamientos relacionados epidemiológicamente de los no relacionados, de modo que se ha utilizado como indicador de transmisión reciente. Se basa en estudiar el número de veces que el fragmento IS6110 se repite en el genoma de la micobacteria (generalmente entre 0 y 25 veces) (García-Pachón E y Rodríguez J 2005); sin embargo tiene algunos inconvenientes ya que se necesita de mucho trabajo manual, es



técnicamente complejo y caro; requiere trabajar con cultivos que tengan varias semanas de crecimiento (Varma-Basil M y cols 2011) debido a que se necesitan cantidades grandes de DNA >1mg, se requiere una purificación subsecuente del DNA y sufre de problemas de interpretabilidad y portabilidad debido a los patrones de bandeo complejos (Supply P y cols 2006) además de que tiene un poder discriminatorio bajo en las muestras que tienen menos de 6 copias del complejo de inserción IS6110 (Said H y cols 2012).

2.8.- Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism AFLP)

Este método estudia todo el genoma de la micobacteria, por lo que podría ser más específico que el RFLP para confirmar la transmisión reciente de una cepa, sin embargo, este método que se basa en la reacción en cadena de la polimerasa es caro, requiere mucho tiempo y personal muy especializado, además su posible aplicación en epidemiología molecular y la interpretación de sus resultados todavía debe evaluarse con más profundidad (García- Pachón y Rodríguez J 2005).

2.9.- SPOLIGOTYPING

El método de *Spoligotyping* es muy utilizado por su relativa simplicidad, rapidez y bajo coste, generalmente como complemento del anterior (García-Pachón E y Rodríguez J 2005), utiliza un locus dentro del genoma del complejo *M. tuberculosis*, el locus de los repetidos directos (DR), que consiste en alternados idénticos DRs y espaciadores variables. Esta técnica detecta variaciones en el locus de los DR, los cuales son secuencias de 36 pb interpuestas en 43 fragmentos de ADN no repetidos de 31-41 pb llamadas secuencias espaciadoras (Nava-Aguilera E 2011). La región DR se amplifica y se hibrida el producto con sondas inmovilizadas en una membrana que detectan las secuencias específicas de los espaciadores. El patrón de reconocimiento que se observa se le llama espoligotipo (Molina-Torres C y cols 2010). Esta técnica es rápida, robusta, barata, altamente reproducible, requiere de menos ADN que el RFLP y los resultados son expresados en un patrón digital simple (Said H y cols 2012) otorgando una técnica alterna y/o complementaria al RFLP del fragmento IS6110. Sin embargo cuando se utiliza solo, puede subestimar la diversidad clonal de la *M. Tuberculosis*

(Varma-Basil M y cols 2011), debido a que tiene un menor poder discriminante (García-Pachón E y Rodríguez J 2005). Existe una base de datos internacional del Instituto Pasteur de la Guadalupe el cual es una actualización de la base de datos SITVITWEB con más de 112000 patrones (espologotipos) de aislamiento obtenidos en más de 170 países en el año del 2014 (García-Pachón E y Rodríguez J 2005; Elvira-Balcells M y cols 2015). En esta base de datos el Spoligotype International Type (SIT) y MIRU International Type (MIT) designa patrones compartidos por dos o más pacientes aislados, mientras que “huérfanos” son los patrones reportados por un único aislado. Los linajes genotípicos fueron asignados de acuerdo a reglas descritas en esta base de datos de SITVITWEB en el cual el Euro-linaje Americano (linaje IV) basado en LSPs se divide en Latin American and Mediterranean (LAM), T, Haarlem (H), X, y linajes S. De manera importante la nomenclatura East-African Indian (EAI o linaje III) mediante *spoligotyping* fue nombrado Indo-Oceanic, mientras que EAI fue nombrado Central-Asian (CAS) por LSPs (Elvira-Balcells M y cols 2015).

Cada uno de los linajes tiene características diferentes (Orduz M y Ribón W 2015):

- Haarlem (H). Es caracterizado por un patrón con ausencia del espaciador 31 y la presencia de al menos un espaciador entre 1-30. Tiene una alta prevalencia en el norte de Europa, mientras es menos extendido en el caribe y África central, donde se piensa que fue introducida por la colonización Europea
- Latin America and Mediterranean (LAM). Caracterizada por la ausencia de los espaciadores 21 a 24 y 33 a 36 y la presencia de al menos un espaciador entre el 1 y 30. Es frecuente en países Mediterráneos y latino americanos.
- T. Comprenden las cepas modernas de TB. Caracterizado por la ausencia de espaciadores 33-36 y la presencia de al menos un espaciador entre 1 al 30 entre la presencia de los espaciadores 9 o 10 y 31, existe además la presencia de un espaciador entre el 21 al 24. Este linaje es caracterizado “por default” e incluye cepas que son difíciles de clasificar dentro de otros grupos.
- X. Su patrón tiene la ausencia de los espaciadores 18 y 33 al 36. Fue identificado en ciudades anglo sajonas, y tiene una alta prevalencia en sur África, y un poco menos

frecuente en latín América. Sin embargo, existe una alta prevalencia de este genotipo en México, lo cual puede ser explicado por su gran cercanía a los Estados Unidos.

- East African-Indian (EAI). Ausencia de espaciadores 29 al 32 y 34; y la presencia de al menos un espaciador entre el 1 y 30. Es frecuente en el sureste de Asia, India y el oeste de África.
- Asia Central (CAS). Ausencia de espaciadores 4 a 27 y 23 a 34. Tiene una alta prevalencia en países sub-saharianos y pakistaníes. Este espoligotipo tiene numerosas variantes y subgrupos como el CAS1-Kili (Kilimanjaro), CAS-Dar (Dar-es Salaam) y CAS-Delhi.
- Beijing. Este genotipo tiene ausencia de los espaciadores 1 al 33 y la presencia de los espaciadores 34 al 43; en términos de salud pública continua siendo un problema sería para el control de TB debido a su alta virulencia y la asociación con la multidrogo resistencia.
- MANU. Puede ser la clona ancestral de las muestras en el grupo genético1. Esta subdividido en Manu 1 (ausencia del espaciador 34), Manu 2 (ausencia de espaciadores 33-34) y Manu 3 (ausencia de espaciadores 34 al 35). Es una familia nueva en la India.

Unidades interespaciadores micobacterianas repetidas, número variable de repeticiones en tándem (Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis MIRU-VNTR)

Una de las técnicas más recientes es la basada en los números variables de repetidos en tándem (VNTR's) de elementos genéticos llamados unidades repetidas micobacterianas intercaladas (MIRU's) los cuales muestran un poder de discriminación cercano al mostrado por la técnica de RFLP (Varma-Basil M 2011). Este método se basa en amplificaciones por PCR de múltiples loci usando primers específicos para las regiones que flanquean cada locus repetido, esto nos dará un amplicon, el cual con su tamaño reflejara el número de copias de MIRU-VNTR; los perfiles esta representados como códigos numéricos y cada dígito representa en número de copias en un locus (Said H y cols 2012) en cada uno de los locis hay de 2 a 8 alelos, lo que da lugar a unos 20 millones de posibles combinaciones de alelos

(García-Pachón y Rodríguez J 2005). Esta técnica es flexible técnicamente ya que puede realizarse usando capilares, geles o HPLC. Es más rápida que las otras técnicas, puede aplicarse a extractos crudos de DNA de cultivos con pocas semanas de crecimiento, los resultados son expresados en códigos numéricos lo cual lo hace muy fácil de comparar y compartir intra e inter laboratorios (Supply P y cols 2006) y es más discriminante que el *spoligotyping* y similar al basado en RFLP IS6110. Existe una base de datos internacional accesible por internet para poder comparar los hallazgos (García-Pachón y Rodríguez J 2005) en la dirección www.miru-vntrplus.org.mx la cual es una colección de 186 cepas en el 2014. Esta base de datos contienen información de la cepa, linaje, especies, país de aislamiento, número de copias de 24 loci de MIRU, patrones de espoligotipado, perfiles de regiones de diferenciación, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), datos de drogo susceptibilidad e imágenes de IS6110-RFLP (Elvira-Balcells y cols 2015).

Existen diferentes sets de MIRU-VNTR descritos para tipificar aislados de *M. tuberculosis*, el más utilizado es el basado en 12 locus incluso ha sido integrado en el sistema de control de TB en Estados Unidos. En estudios pilotos con limitado número de muestras se comprobó que el poder de discriminación en casos no epidemiológicamente relacionados es cercano al mostrado con el RFLP-IS6110, sin embargo se menciona que se debe utilizar este junto con el *spoligotyping* en genotipificación de estudios a larga escala y prospectivos. Sin embargo el IS6110 es aun requerido como método adicional en casos donde los datos de contacto, epidemiológicos o demográficos no proveen pistas independientes de la existencia o ausencia de los links entre pacientes (Supply P y cols 2006). Se ha visto que el poder discriminatorio de la técnica de *Spoligotyping* y MIRU-VNTR solo es más bajo que el obtenido con el RFLP sin embargo cuando se usan combinado el poder discriminatorio se aproxima al obtenido con el RFLP-IS6110 (Said H y cols 2012)

En un trabajo realizado por Supply en el 2006 demostró que el utilizar un set de 24 MIRU-VNTR el valor predictivo de transmisión es igual al mostrado con el IS6110, y además propusieron que se utilizara un set de 15 locis para estudios epidemiológicos y de 24 para estudios filogenéticos (Supply P y cols 2006)

Además de la utilidad que tiene la técnica de MIRU para rastrear la transmisión de TB éstos marcadores también arrojan información filogenética, especialmente el formato de 24 locus y puede ser utilizado para predecir agrupamiento entre los linajes de las cepas, ésta información es útil en perspectiva del control epidemiológico y puede proveer información en la fuente de los casos de TB es decir de donde se originó el primer caso en una infección (Cardoso y cols 2011)

2.11.- Transmisión de la tuberculosis

La transmisión reciente se asume cuando se obtienen aislamientos de *M. Tuberculosis* que tienen huellas de ADN idénticas o muy similares que se denominan “aislamientos en agregaciones” o “cluster cases”. Cuando se aíslan patrones únicos de ADN se considera en general que se debe a la reactivación de una infección adquirida en un momento muy anterior. El ADN de *M. Tuberculosis* se modifica progresivamente con el tiempo, mediante RFLP se obtuvo una semivida de entre 2 – 30 años, lo que puede variar debido a la eficacia del tratamiento, el intervalo entre el inicio de la enfermedad y el del tratamiento y probablemente el predominio en cada zona de cepas más o menos estables del patógeno así como la situación de latencia o de enfermedad activa del germen (García-Pachón y Rodríguez J 2005).

2.12.- Factores de riesgo de transmisión reciente

Se han descrito factores de riesgo para la transmisión de la tuberculosis entre ellos en el la edad menor de 25 años, ser nacido en Estados Unidos, ser hispano, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (Alland y cols 1994), existencia de un elevado porcentaje de infección en el primer círculo de contactos, vivienda urbana, uso de broncoscopio para la obtención de las muestras, trabajar y vivir en hacinamiento (Ruiz M y cols 2003).

2.13.- Programas de control de la tuberculosis

Los estudios de epidemiología molecular han permitido detectar brotes de casos relacionados de tuberculosis que se habían pasado por alto con la epidemiología clásica, es importante poder distinguir si, en un área determinada, en la población afectada por tuberculosis ésta se debe a una infección reciente o a la reactivación de una tuberculosis latente. Si los casos de



infección reciente son significativos deben buscarse esos casos y darles tratamiento, si por el contrario la infección latente es la principal causa de deben aplicar las medidas para prevenir la reactivación(García-Pachón E y Rodríguez J 2005).

3. Hipótesis

Las cepas circulantes en Jalisco de *M. tuberculosis* presentan variabilidad genética y serán relacionadas entre sí. El análisis molecular mediante la técnica de MIRU-VNTR y el *spoligotyping* evidenciará la posible relación genética entre ellas. Entonces se detectará posibles nuevos focos de infección en la región.

4.- Justificación

La resistencia a antibióticos es un problema de salud a nivel mundial la pérdida económica debido a una inadecuada administración de antibióticos es cada vez mayor. En México, la aparición de la resistencia a los medicamentos antituberculosos y en particular la tuberculosis MDR se ha convertido en un problema importante de salud pública. Se estima que cada año los casos en esta condición representan el 2.5 %, motivo por el cual se incluyen en el



Programa Nacional para la Prevención y Control de la Tuberculosis (CENAVECE/OPS-OMS/CONAVE/INER/InDRE). México ha reportado 18,848 nuevos casos de TB en todas sus formas en el 2011. Particularmente en Jalisco, se registraron 149 casos de tuberculosis en 2011, (Secretaría de Salud de Jalisco)

El tratamiento de la *M. tuberculosis* es prolongados (de 6 meses a dos años), por lo que el hecho de estar recibiendo antibióticos inadecuados al tipo de cepa que el paciente tiene provoca que fácilmente sea transmisible entre sus contactos, por lo que evaluando la variabilidad genética de muestras clínicas del estado de Jalisco se podría llevar un mejor control y poder localizar focos de infección, sitios de mayor transmisión y zonas endémicas.

En Jalisco no se cuenta con trabajos de este tipo, por lo que es de suma importancia analizar la variabilidad genética de las cepas multidrogorresistentes para establecer si se trata de una sola cepa circulante, si son casos de reinfección o si se trata de una cepa adquirida.

5.- Objetivo general

Analizar los patrones de transmisión de los aislados clínicos de *M. Tuberculosis* multifarmacorresistente en cepas circulantes en el estado de Jalisco.

5.1.- *Objetivos particulares*

- Evaluar la variabilidad genética de las muestras clínicas de tuberculosis en población del estado de Jalisco.
- Describir la frecuencia de las familias de *M. tuberculosis* presentes en el estado de Jalisco.
- Analizar la correlación existente entre las características clínicas y bacteriológicas así como la variabilidad genética de las cepas de TB y TB-MDR.

6.- Materiales y Descripción del estudio

6.1. Descripción del estudio

El presente es un estudio longitudinal, prospectivo con una duración de 2.5 años (Abril 2013-Agosto 2015).

6.2- Criterios de selección de muestras de tuberculosis

Se trabajó con cepas aisladas de pacientes con tuberculosis activa, tanto de origen pulmonar como de extra pulmonar. Las cepas son otorgadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Jalisco debido a una colaboración que se tiene, en éste laboratorio se tomarán las muestras de los cultivos y se inactivarán mediante la técnica de ebullición, para después ser procesadas en el laboratorio de Bioseguridad nivel 2 (BSL-2), en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco (CIATEJ).

Se obtuvieron tres grupos de muestras con las cuales se trabajarán: Pacientes, Reincidentes y Controles; cada uno con diferentes criterios de inclusión y exclusión los cuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios de inclusión, no inclusión y exclusión para formar los grupos de estudio

Grupo / Criterio	Inclusión	No inclusión	Exclusión
Pacientes	<ul style="list-style-type: none"> - Cultivo y tinción de Ziehl – Neelsen positivas. -Sintomatología positiva - Residente de Jalisco -muestra con suficiente cantidad y calidad - Resistente al menos a un antifímico. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cultivo y/o tinción Ziehl – Neelsen negativas. - Sintomatología negativa. - No residir en Jalisco. - Muestra sin calidad y cantidad suficiente 	<ul style="list-style-type: none"> - Sin expediente completo del paciente.
Reincidentes	<ul style="list-style-type: none"> - Cultivo y tinción de Ziehl – Neelsen positivas. - Residente de Jalisco. -Muestra con suficiente cantidad y calidad -Diagnosticado en un periodo no menor a 6 meses. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cultivo y/o tinción Ziehl – Neelsen negativas - No residir en Jalisco -Muestra sin calidad y cantidad suficiente -Sin tratamiento inicial. - Negativize la muestra 	<ul style="list-style-type: none"> - Sin expediente completo del paciente

	- Recibido tratamiento inicial y no haya negativizado
Controles	- Cultivo y tinción de Ziehl – Neelsen positivas. - Residente de Jalisco. -Muestra con suficiente cantidad y calidad - Sensible a todos los antifímicos Cultivo y/o tinción Ziehl – Neelsen negativas - No residir en Jalisco - Muestra sin calidad y cantidad suficiente -Resistente a un antifímico o más. - Sin expediente completo del paciente.

6.3.- Factores de riesgo analizados

Los potenciales factores de riesgo que se evaluaron fueron edad (menos de o mayor de 30 años), sexo, educación, empleo, área de residencia, uso de alcohol, coinfección de VIH y/o diabetes, exposición previa a TB. Se evaluara el riesgo relativo con un 95% de intervalo de confianza en una prueba de X².

6.4.- Descontaminación del esputo por la técnica de Petroff (31)

La descontaminación del esputo se realizó en el laboratorio estatal, se partió siempre de esputo fresco con menos de 4 horas de haber sido expectorado, se colocaron partes iguales de esputo y de hidrato de sodio al 3% y se agitó uniformemente, después se incubó por 20 – 30 min hasta que el esputo esté completamente digerido. Una vez que se termina el tiempo de incubación la solución se neutraliza con ácido clorhídrico, se centrifuga y el sedimento se inoculó dentro de los tubos con medio Lowenstein-Jensen y las botellas de cultivo para el análisis de sensibilidad de antibióticos

6.5- Inactivación mediante la técnica de ebullición

Se tomó una asada de cultivo a un microtubo rotulado conteniendo 400ml de buffer TE 1X, se calentó durante 10 min a 80° C para la inactivación de las células, se agitó en vórtex, y se calentó de nuevo por 10 min más para después dejarlo enfriar a temperatura ambiente.

6.6.- Extracción de ADN

Una vez inactivadas las células se agregaron 50 ml de lisozima (10mg/ml), se agitó en vórtex y se incubó a 37° C por un periodo de una hora. Se adicionaron 70 ml de SDS al 10% y 5 ml de proteinasa K (10 mg/ml), se agitó en vórtex y se incubó por 10 min a 65° C, al mismo tiempo se calentó la solución CTAB/NaCl a 65° C con el fin de disminuir su viscosidad. Se agregaron 100 ml de NaCl 5M y 100 ml de solución CTAB/NaCl se mezcló perfectamente hasta que la mezcla adquirió un color blanco y se incubó por 10 min a 65° C. Se adicionaron 700 ml de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) se agitó manualmente y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm a temperatura ambiente, se separó la fase acuosa tratando de no tocar la interface y se pasó a otro tubo limpio y rotulado. Se adicionaron 600 ml de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) se agitó manualmente y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm a temperatura ambiente, se separó la fase acuosa tratando de no tocar la interface y se pasó a otro tubo limpio y rotulado. Se adicionaron 600 ml de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó manualmente y se centrifugó 10 min a 12000 rpm a 20° C. Si el sobrenadante no se observó claro se repitió el paso anterior. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo rotulado y se agregaron 0.6 del volumen final de isopropanol para precipitar el ADN, se agitó manualmente y se llevó al congelador a -20° C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó la mezcla por 15 min a 12000 rpm y se descartó el sobrenadante, a la pastilla se le agregarán 600 ml de etanol al 70% frío, se invirtió el tubo varias veces, se centrifugó durante 5 min a 4° C a 12000 rpm. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el resto del líquido con el tubo abierto por 10 min. Finalmente se resuspendió la pastilla con TE 1X o agua usando de 15 a 60 ml según la cantidad de pastilla recuperada.

6.7.- Sensibilidad a antibióticos

La sensibilidad a antibióticos se realizó con el equipo VersaTREK con el que se detectó tanto el crecimiento de la micobacteria como la sensibilidad a antifímicos. La inoculación del espécimen (esputo, sangre, tejido, orina, etc.) se realizó directo en la botella de cultivo (previa descontaminación), la cual contenía medio de cultivo, esponjas de celulosa (la cual provee una matriz sólida en la cual se adhieren los bacilos y crecen fácilmente), suplemento de crecimiento y suplemento de antibiótico para aquellas muestras que pudieran estar contaminadas. Además el sistema cuenta con tres antifímicos principales: Rifampicina (1 mg/ml), Isoniazida (0.4 mg/ml y 0.1 mg/ml) y Ethambutol (8 mg/ml y 5 mg/ml).

El crecimiento se detectó mediante un monitoreo automático de la tasa del consumo de oxígeno dentro de la botella de cultivo cada 24 minutos; si se detectó crecimiento se reportó con una señal visible y audible. (Thermoscientific)

6.8 – Amplificación mediante PCR

6.8.1.- Fragmento de inserción IS6110

Para la identificación de micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* se amplificó un fragmento de 137 pb del segmento de inserción 6110 (IS6110) el cual es característico de dicho complejo, para ello se utilizó el juego de iniciadores IS6110F/IS6110R que fueron sintetizados previamente en el laboratorio. Para llevar a cabo la reacción se realizó una mezcla con los reactivos que se muestran en la tabla 1 con el ciclo de amplificación ilustrado en la figura 1.

Tabla 2. Condiciones de amplificación del fragmento de inserción IS6110

Reactivo	[] Inicial	[] final	ml
Buffer 10X	y 10 X	1X	2.5
MgCl ₂			
dNTP	10 mM	200 µM	0.5

Primer 1	100 mM	4 mM	1
Primer 2	100 mM	4 mM	1
Agua			17.5
DNA		10 ng	Variable
Taq	5 U/ml	1 U/rxn	0.2

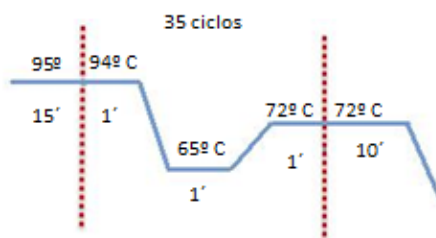


Figura 1. Ciclo de amplificación para el fragmento de inserción IS6110

6.9.- Determinación de la variabilidad genética por la técnica de Spoligotyping

Se amplificará la región completa RD con los iniciadores DRa GGTTTTGGGTCTGACGAC, biotinilado y DRb CCGAGAGGGGACGGAAAC por PCR. Los primers deben ser disueltos con 1.72 ml de agua MQ o inyectable estéril, el primer DRa biotinilado debe de guardarse a 4° C y el primer DRb que no tiene biotina debe alicuotarse y guardarse en el congelador. Las condiciones de PCR se muestran en la tabla 3 y el ciclo de amplificación se ilustra en la figura 2.

Tabla 3. Condiciones de amplificación de la región RD

Reactivo	[] Inicial	[] final	ml
Buffer	10 X	1X	2.5

dNTPs	2.5 mM	0.2 mM	2
Primer Dra	10 mM	2 mM	5
Primer Drb	10 mM	2 mM	5
Agua			5
DNA		50 ng	5
Taq	5 U	2.5	0.5

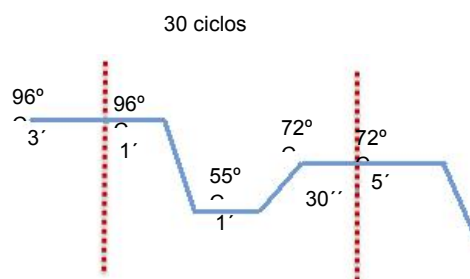


Figura 2. Ciclo de amplificación de la región RD

Antes de realizar la técnica se corroboró que existiera una amplificación realizando un gel de agarosa al 2% y se observó un amplificado en el gel.

Los amplificados se hibridaron con 43 oligonucleótidos inmovilizados, cada uno correspondiente a uno de los espaciadores únicos de DNA dentro del locus RD. Los oligonucleótidos se enlistan en la tabla 3.

Se preparan 3 buffers diferentes para el *spoligotyping*:

2XSSPE/ 0.1% SDS = 50 ml 20X SSPE + 5 ml SDS 10% + 445 H₂O

2XSSPE/ 0.5% SDS = 50 ml 20X SSPE + 25 ml SDS 10% + 425 H₂O

2XSSPE = 25 ml 20X SSPE + 225 ml H₂O

La membrana con los oligonucleótidos inmovilizados se activó colocándola en un recipiente plástico y se lavó por 15 minutos a 55° C en 250 ml de 2XSSPE/ 0.1% SDS, en lo que se realizó el lavado se añadió a un tubo 25 ml de producto de PCR a 120 ml de SSPE2X/

0.1% SDS y se desnaturizó por 10 minutos a 99° C y antes de que la temperatura descienda en el termociclador se para la reacción y se colocan los tubos inmediatamente en hielo, esto para evitar que las cadenas que ya fueron separadas se vuelvan a unir.

La membrana ya activada se colocó en el cojín de soporte dentro del miniblotter de tal manera que las ranuras fueran perpendiculares a la línea patrón de los oligos, se remueve el fluido residual de los pozos del miniblotter por aspiración mediante una bomba de vacío y se llenaron los pozos con el producto de PCR diluido (evitando la formación de burbujas) en el primer carril se colocó el control de H37Rv en el segundo carril el control de BCG y en el tercer carril se colocó el control negativo a partir de este pozo se colocaron las muestras de los pacientes analizados, se hibridó 60 min a 55° C en una superficie horizontal sin agitación.

Una vez finalizado la hibridación se removieron las muestras del miniblotter por aspiración y se tomó la membrana del miniblotter usando pinzas, se lavó dos veces la membrana en 250 ml de 2XSSPE/ 0.5% SDS por 10 min a 60° C, se permitió que la membrana se enfriara y se añadieron 7.5 ml de conjugado de streptavidin peroxidasa (500 U/ml) a 30 ml de 2XSSPE/ 0.5% SDS 10 min a 42° C, se lavó la membrana 2 veces con 250 ml de 2XSSPE/ 0.5% SDS por 5 minutos a temperatura ambiente. Se incubó la membrana por 2 minutos en 20 ml de ECL líquido de detección (10 ml de cada uno).

Se cubrió la membrana con un plástico transparente cuidando de que ni la membrana ni el plástico se doblen y se expuso la membrana 1 min a un film de quimioluminiscencia en una carpeta de exposición dentro de un cuarto oscuro y se revela colocando el film 1 min en el líquido de revelado luego 1 min en el líquido fijador y 1 min en agua destilada; si la señal es muy débil o muy fuerte se puede repetir inmediatamente. Los líquidos debe volver a guardarse en sus recipientes correspondientes sin encender la luz.

Una vez que se terminó el proceso de revelado se regeneró la membrana para poder volverla a utilizar (5 veces); se lavó la membrana 2 veces por incubación en 1% SDS a 80° C por 30 min, se lavó la membrana en 20 mM EDTA pH 8 por 15 min a temperatura ambiente y se guardó la membrana a 4° C.

Tabla 4. Oligonucleotidos inmovilizados en la membrana

Spacer no.	Oligonucleotide sequence	Spacer no.	Oligonucleotide sequence
1.....	ATAGAGGGTCGCGGTTCTGGATCA	23.....	AGCATCGCTGATCGGGTCCAGCTCG
2.....	CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG	24.....	CCGCCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG
3.....	CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA	25.....	GATCAGCGACCACCGCACCTGTCA
4.....	ACGTCATACGCGACCAATCATCAG	26.....	CTTCAGCACCCATCATCCGGCGC
5.....	TTTTCTGACCACTTGTGGGATTA	27.....	GGATTCTGATCTCTCCCGCGGAT
6.....	CGTCGTATTTCCGGCTTCAATTC	28.....	TGCCCGCGCTTTAGCGATCACAAC
7.....	GAGGAGGCGAGTACTCGGGCTGC	29.....	AAATACAGGCTCCACGACGACCA
8.....	CGTGAACCGCCCCAGCCTCGCCG	30.....	GTTGCCCGCGCCCTTTCCAGCC
9.....	ACTCGAATCCCATGTGCTGACAGC	31.....	TCAGACAGGTTCCGCTCGATCAAGT
10.....	TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC	32.....	GACCAATAGGTATCGGCGTGTCA
11.....	GTGAGCAACGGCGGCGCAACTGG	33.....	GACATGACGGCGGTGCCGCACTGA
12.....	ATATCTGCTGCCCGCCGGGAGAT	34.....	AAGTCACTCGCCACACCGTGGAA
13.....	GACCATCATTGCCATTCCCTCTCCC	35.....	TCCGTACGCTCGAAAAGCTTCCAAC
14.....	GGTGTGATGCGGATGGTCCGGCTCGG	36.....	CGAATCCAGCACCATCCGCGGC
15.....	CTTGAATAACGCGCAGTGAATTCG	37.....	CGCGAAGTCCGTCACAGTCCCGCTT
16.....	CGAGTTCCTCGTCCGCTCGTAAATC	38.....	CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC
17.....	GCGCCGCGCCGCGCGGATGACTCCG	39.....	GACGATGGCCAGTAAATCCGCGTGG
18.....	CATGGACCCGGGCGAGCTGCAGATG	40.....	CGCCATCTGTGCCTCATAAGGTCC
19.....	TAACTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT	41.....	GGAGCTTCCGGCTTCTATCAGGTA
20.....	TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA	42.....	ATGGTGGGACATGGACGAGCGGAC
21.....	TCGATGTGATGTCCCAATCGTCCA	43.....	CGCAGAATCGACCGGGTCCGGGAG
22.....	ACCGCAGACGGCAGATTGAGACAA		

Una vez que se revelo el film se analizan las señales de hibridación así como en las que no hubo de los 43 marcadores inmovilizados en la membrana, cuando se observe una señal de hibridación se colocara un 1, cuando no exista dicha señal se colocará un 0 con esto se realizará un código binario, una vez que se tiene completo este código se coloca por tripletes y cada uno se transforma de acuerdo a la tabla 5 para convertir nuestro código binario en un código octal.

Tabla 5. Conversión de tripletes en código octal

000	0
001	1
010	2
011	3
100	4
101	5
110	6
111	7

Una vez que se ha obtenido el código octal se comparan los resultados con la base de datos SpolDB4 del Instituto Pasteur de Guadalupe, la cual al momento del presente trabajo contenía 1939 tipos de 39295 cepas contribuidas por 122 países.

6.10 Determinación de variabilidad genética por el método de MIRU-VNTR

La amplificación por PCR es realizada usando primers específicos para las regiones que flanquean cada región de VNTR los cuales se muestran en el anexo 1.

Para cada locus se siguen diferentes condiciones de amplificación, las cuales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Reactivos utilizados para la amplificación de los loci del MIRU-VNTR

Loci	4-26-40-2401- 3690-4156	10-16-31-2347- 2461-3171	20-24-27-0424- 0577-2165- 2163b-1955- 4052	2-23-39
Concentración final de MgCl₂	3 mM	2mM	1.5mM	2.5mM
H₂O	9.1	9.9	10.3	9.5
Buffer 10X	2	2	2	2
Solución Q 5X	4	4	4	4
MgCl₂ 25mM	1.2	0.4	0	0.8
DNTP 5mM	0.8	0.8	0.8	0.8
Primer R	0.4	0.4	0.4	0.4
Primer F	0.4	0.4	0.4	0.4
Taq	0.5	0.5	0.5	0.5
DNA	2 ng	2ng	2ng	2ng
Total	18	18	18	18

Las condiciones de amplificación que se utilizaron son las siguientes:

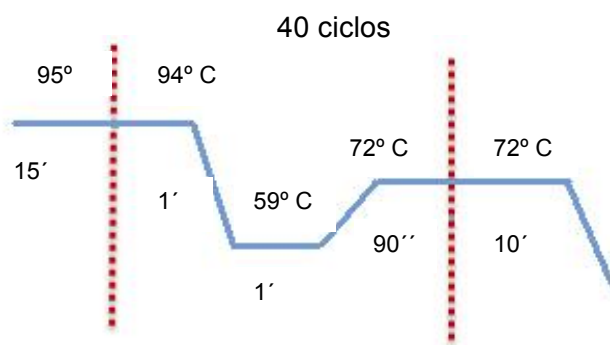


Fig. 3. Ciclo de amplificación del MIRU-VNTR

Una vez que se amplificaron los diferentes locus se guardan a -20°C hasta el momento en que se vayan a utilizar. Cuando se vayan a analizar los fragmentos se realizará una electroforesis en agarosa al 2%, es de suma importancia que las condiciones de corrida no provoquen que las muestras simulen una “sonrisa” ya que si esto pasara no se podría determinar el tamaño exacto del amplificado lo cual es crítico para esta metodología, por lo que se recomienda utilizar geles grandes (de aproximadamente 25 cm) y con un tiempo de corrida largo (17 h 60 v). Al momento de preparar el gel se recomienda de igual manera prepararlo con TAE y cargar 2 marcadores, uno al inicio otro y otro al final ya que con eso se elimina el riesgo de otorgarle un peso erróneo al amplificado.

Una vez que se realiza la electroforesis se debe observar una sola banda definida, si se observan varias bandas o bandas tenues se debe re amplificar. Cuando se haya obtenido una sola banda bien definida, se determinará su peso exacto con la ayuda de los marcadores de peso molecular, para cada locus se obtendrán los valores de repetidos al ingresar el peso de cada banda en la base de datos de la página <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>.

6.11 Analisis filogenético

En la página www.miru-vntrplus.org se compararon los patrones de Spoligotipos y MIRU-VNTR, en ésta se realizaron los arboles de expansión mínima para visualizar las relaciones evolucionarias entre los aislados clínicos en nuestro estudio, este estudio muestra gráficos indirectos en el cual todas las muestras están conectados juntos con las menores conexiones entre sus vecinos cercanos. Se realizó también dendogramas con el método del vecino más cercano (Neighbour Joining) ya que en este método se pueden visualizar distancias evolutivas en las muestras analizadas.

7.- RESULTADOS

7.1.- Descripción de las muestras

En México se reportó una incidencia de 16.8 casos por cada 100 000 habitantes para el año 2012 que correspondió a 19 697 casos de TB notificados. De estos 15858 (81%) fueron formas pulmonares, 17.8% extrapulmonares y 1.5% meníngeas. Los grandes desafíos identificados para el control de la TB en México son la resistencia a fármacos, que para el 2012 reportaron el 34% de los estimados por la OMS, la proporción de pacientes con VIH en el 2012 alcanzó el 65% y la coinfección TB-VIH en los mismos fue de 5.8%; la asociación TB/Diabetes que para México representa una de las principales comorbilidades asociadas a la TB en el 2012 fue reportada en un 21%. (CENAPRECE)

En el estudio se cuenta ya con 90 muestras los datos más relevantes se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Base de datos de las muestras del estudio

# Muestra	Tipo de muestra	Edad	Sexo	Procedencia	Resistencia
5306	Expectoración	56	M	Zapopan	I, R, P
25510	Expectoración	---	F	P. Vallarta	I, R, P
1065	Expectoración	---	M	Tlaquepaque	I, R
884	Expectoración	37	M	P. Vallarta	I, R
25508	Expectoración	25	M	P. Vallarta	I
10920	Expectoración	---	F	P. Vallarta	I
16162	Expectoración	---	M	-----	I
16168	Expectoración	21	M	P. Vallarta	I
49162	Expectoración	49	M	P. Vallarta	I
55627	Expectoración	41	M	P. Vallarta	I

14841	Expectoración	36	M	P. Vallarta	I, P
16167	Expectoración	49	F	P. Vallarta	I, P
3642	Expectoración	48	F	Tonalá	I, P
8019	Expectoración	19	F	P. Vallarta	I, E
10555	Expectoración	47	F	San Juan de los lagos	I, P
33033	Expectoración	81	F	P. Vallarta	R
33034	Expectoración	51	M	P. Vallarta	R
29667	Expectoración	---	M	Guadalajara	R, P
34729	Expectoración	25	M	Tlaquepaque	R, E
2616/12	Expectoración	28	M	Guadalajara	Sensible
53183	Expectoración	---	M	P. Vallarta	Sensible
51003	Expectoración	47	M	P. Vallarta	Sensible
53802	Expectoración	32	M	P. Vallarta	Sensible
39963	Ganglio	---	M	----	Sensible
49041	Expectoración	49	M	P. Vallarta	Sensible
256	Ganglio	---	F	Magdalena	Sensible
19440	Biopsia	---	F	Guadalajara	Sensible
481	Expectoración	45	F	Zapopan	Sensible
3028	Expectoración	26	F	Tlaquepaque	Sensible
36826	Expectoración	55	F	El Grullo	Sensible
9354	Expectoración	58	M	P. Vallarta	Sensible
25858	Expectoración	79	F	Colotlan	Sensible
8020	Expectoración	57	M	P. Vallarta	Sensible
26772	Expectoración	---	F	Guadalajara	Sensible
249	Ganglio	40	M	Guadalajara	Sensible
47121	Expectoración	---	M	El Salto	Sensible
10912	Expectoración	29	M	P. Vallarta	Sensible
3026	Expectoración	37	F	Guadalajara	Sensible
2258	Expectoración	46	M	Tlaquepaque	Sensible

2197	Expectoración	46	M	Tlaquepaque	Sensible
24534	Expectoración	62	F	Cocula	Reincidente
25285	Expectoración	19	M	Zapopan	Reincidente
28621	Expectoración	28	F	Tlaquepaque	Reincidente
25757	Expectoración	38	M	Tlaquepaque	Reincidente
25750	Expectoración	55	F	El Grullo	Reincidente
22374	Expectoración	52	F	Tala	Reincidente
21798	Expectoración	---	M	Tonalá	Reincidente
20935	Expectoración	50	M	Guadalajara	Reincidente
20433	Expectoración	---	F	Guadalajara	Reincidente
17872	Expectoración	38	M	Cihuatlán	Sensible
1517	Expectoración	58	M	La Barca	Reincidente
2170	Expectoración	63	M	Guadalajara	Reincidente
2196	Expectoración	57	M	Tlaquepaque	Reincidente
2222	Expectoración	46	F	Guadalajara	Reincidente
24838	Expectoración	57	F	Tala	Reincidente
1069	Expectoración	65	M	Tala	Reincidente
43156	Lavado gástrico	---	M	Autlán de Navarro	P
28313	Expectoración	42	M	Tlaquepaque	E
30393	Expectoración	---	M	P. Vallarta	E
43195	Expectoración	19	F	P. Vallarta	E
12851	Expectoración	33	M	P. Vallarta	E, P
1856	Expectoración	23	M	P. Vallarta	P
46474	Expectoración	67	M	P. Vallarta	P
52542	Expectoración	26	F	Tlaquepaque	P
54008	Expectoración	51	M	Guadalajara	P
4331	Expectoración	45	M	P. Vallarta	I
7496	Ganglio	25	M	Tlajomulco de Zuñiga	I

10078	Expectoración	52	M	P. Vallarta	I
1833	Expectoración	49	F	P. Vallarta	I
12111	Expectoración	41	M	P. Vallarta	I
17155	Expectoración	60	M	Tlajomulco de Zuñiga	I, E
6615	Guadalajara	48	M	Guadalajara	R
15678	Expectoración	69	F	Tepatitlán de Morelos	I, R
17215	Expectoración	---	M	Guadalajara	Reincidente
5156	Expectoración	---	M	P. Vallarta	Reincidente
17962	Líquido ascítico	38	M	Tepatitlán de Morelos	P
15722	Expectoración	52	M	Guadalajara	E
8544	Expectoración	19	F	Tlaquepaque	P
4744	Expectoración	---	M	Tonalá	P
8086	Expectoración	26	M	P. Vallarta	P
8087	Expectoración	51	M	P. Vallarta	P
1620	Expectoración	67	F	Guadalajara	Sensible
19633	Expectoración	40	M	Guadalajara	P
20871	Expectoración	16	M	Guadalajara	I
24536	Expectoración	35	M	Guadalajara	I, P
24936	Expectoración	42	M	P. Vallarta	I
29434	Expectoración	42	M	P. Vallarta	I
29988	Expectoración	50	M	Cihuatlán	I
27125	Expectoración	45	M	Tomatlán	Sensible
32695	Expectoración	66	F	Lagos de moreno	I, R
34053	Expectoración	45	F	Zapotlanejo	P
36124	Expectoración	56	M	P. Vallarta	P
38515	Expectoración	27	M	P. Vallarta	P

38519	Expectoración	57	M	P. Vallarta	P
39619	Expectoración	47	M	-----	Sensible
40441	Expectoración	29	M	Zapopan	Sensible
40554	Expectoración	70	F	Guadalajara	I, R
40660	Expectoración	43	M	P. Vallarta	I, R
43538	Expectoración	53	F	Tonalá	Sensible
45210	Expectoración	42	M	P. Vallarta	-----
47057	Ganglio	38	M	Ocotlán	----
47369	Expectoración	53	M	P. Vallarta	Estreptomycin
49492	Expectoración	40	M	P. Vallarta	----
49493	Expectoración	14	F	P. Vallarta	----

En los datos anteriores se puede observar que existe una relación de hombres: mujeres de 1.5 : 1, lo cual concuerda con un estudio realizado en África, en el que vieron que el ser hombre era un factor de riesgo para contraer la enfermedad (Green E y cols 2013); y con lo que se reportó en el año 2011 por la secretaria de salud que reporta una relación de 2.1:1 además la media de edad fue de 44.6 años, la resistencia que más se observó fue para isoniazida, y la muestra más frecuente fue la expectoración, otro aspecto importante es la localización, donde se obtuvieron más casos fue en Puerto Vallarta.

Respecto a la resistencia en la base de datos se observó que se tienen 33 muestras monoresistentes, 10 polirresistentes y 9 MDR

7.2 Factores de riesgo

Se evaluaron diversas características de los pacientes para evaluar si existe algún factor de riesgo relacionado con la tuberculosis. Se evaluaron aspectos sociales como son la escolaridad y la ocupación observando que el 21% de los pacientes contaba con primaria inconclusa y el 15% con licenciatura concluida; además el número de empleados era mayor que al de cualquier otro grupo.

Tabla 8. Escolaridad de los pacientes del estudio

Escolaridad	
ninguna	7
primaria c	11
primaria inc	12
secundaria c	17
secundaria inc	3
preparatoria c	10
licenciatura inc	1
licenciatura	8

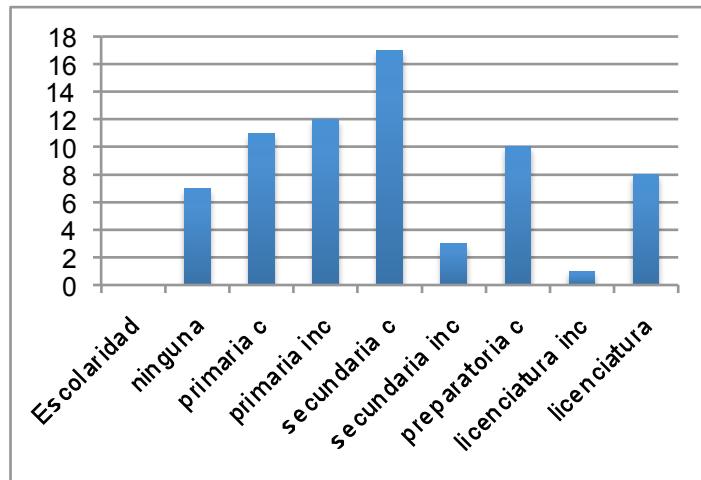


Figura 4. Gráfica de la escolaridad de los pacientes del estudio

Ocupación	
Hogar	8
empleado	22
desempleado	13
campesino	3

Comerciante	11
Peón	6
Estudiante	2
Artesano	2

Tabla 9. Ocupación de los pacientes del estudio

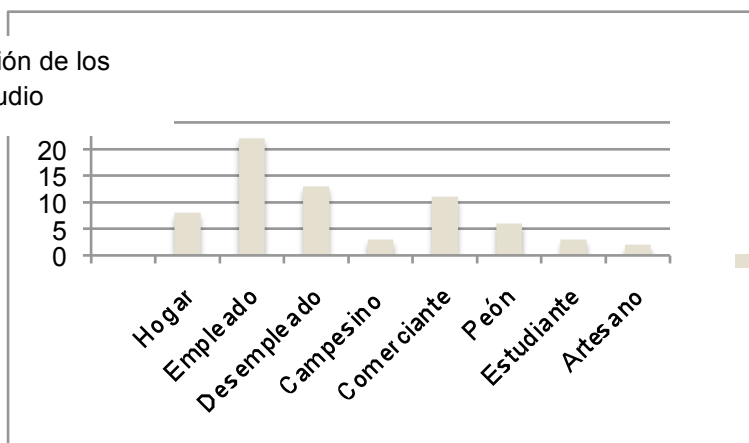


Figura 5. Gráfico de barras de la escolaridad los pacientes del estudio

Se analizaron también enfermedades que estuvieran presentes al mismo tiempo que la tuberculosis para ver si existía alguna relación con la presencia de estas co-infecciones y la severidad de la tuberculosis.

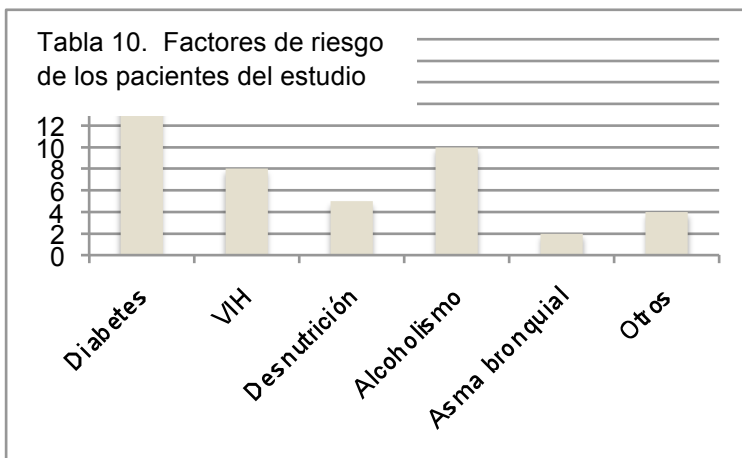


Tabla 10. Factores de riesgo de los pacientes del estudio

FACTORES RIESGO	DE	No. casos
Diabetes		18
VIH		8
Desnutrición		5
Alcoholismo		10
Asma bronquial		2
Otros		4

Figura 6. Gráfico de barras de los factores de riesgo presentes en los pacientes del estudio

Se observó que la co-infección más frecuente fue la diabetes lo cual concuerda con un estudio realizado anteriormente (Aguilar y cols 2005) en el cual ellos determinaron que el riesgo de sufrir tuberculosis activa atribuible a la diabetes es varias veces mayor al de condiciones que son consideradas como determinantes mayores de la incidencia, además en el 2013 (Kumar A y cols 2013) se determinó que la diabetes mellitus incrementa el riesgo de contagiarse de TB por un factor de 2-3. La secretaria de salud reportó para el 2011 que la comorbilidad para la tuberculosis farmacorresistente era con el 52% la diabetes mellitus. Se realizó además un meta análisis de artículos publicados en pubmed de 1980 al 2010 y se encontró que la diabetes está asociada con un incremento en el riesgo de falla del tratamiento, muerte y recaídas de la enfermedad durante el tratamiento (Baker y cols 2011)

7.3 PCR IS6110

Para determinar la presencia del gen IS6110 se realizó la amplificación del fragmento de inserción del gen para demostrar que la cepa pertenece al Complejo *M. Tuberculosis*, esta prueba se realizó tanto en los especímenes clínicos obtenidos del laboratorio estatal como de los controles negativos (*Staphilococcus aureus* y *Escherichia coli*) para comprobar que los primers fueran específicos a las muestras pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*; como control positivo se utilizó DNA de cultivo conocido de TB.

Los iniciadores se diseñaron previamente en el laboratorio y en este trabajo se estandarizaron las condiciones de amplificación realizando una cinética de taq y de DNA como se muestra en la figura 7.

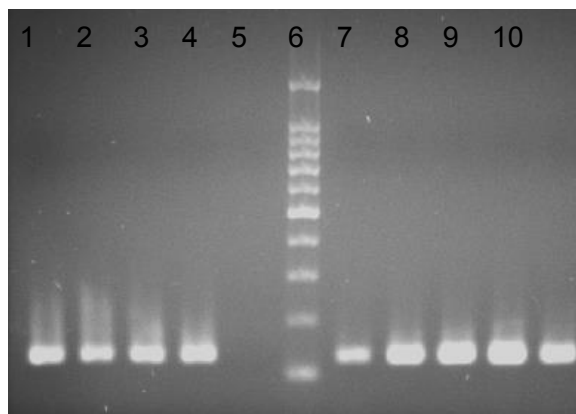


Figura 7.-Cinética de DNA y Taq polimerasa. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: 2.5 U de Taq; Carril 2: 2 U Taq, Carril 3: 1.5 U de Taq, Carril 4: 1 U de Taq, Carril 5: CN, Carril 6: Marcador 100 pb, Carril 7: 7.7 ng, Carril 8: 27.6 ng, Carril 9: 46.5 ng, Carril 10: 67 ng, Carril 11: 134 ng.

Al analizar el gel no se observa una diferencia marcada en las concentraciones de Taq, por lo que se decidió utilizar la más baja de 1 unidad por reacción, en cambio respecto a la concentración, se decidió utilizar 10 ng por reacción ya que en 7 ng se observaba la banda muy delgada pero ya en 27 se observaba bien definida, por lo que decidimos utilizar una concentración intermedia para no desperdiciar el DNA.

Una vez que se conocieron las concentraciones adecuadas tanto de Taq polimerasa como de DNA se realizaron las amplificaciones con los especímenes clínicos y en cada ocasión con sus controles tanto negativos como positivos como se muestra en la Figura 8.

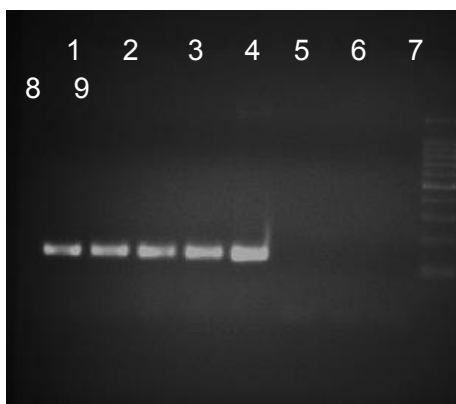


Figura 8. Amplificación del fragmento de inserción IS6110. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: muestra 14841, Carril 2: muestra 1065, Carril 3: Muestra 1856, Carril 4: Muestra 43156, Carril 5: Control positivo TB de cultivo, Carril 6: Control negativo, Carril 7: *Staphilococcus aureus*, Carril 8: *Escherichia coli*, Carril 9: Marcador de 100 pb.

Una vez que se analizaron las muestras analizadas en el presente trabajo se comprobó que todas las muestras pertenecía al complejo *M. tuberculosis* lo cual concuerda con lo que se había reportado previamente (Thierry D y cols 1990) en el que se analizaron 30 muestras de *M. Tuberculosis* y los iniciadores lograron discriminar entre las pertenecientes y las no

pertenecientes al complejo *M. Tuberculosis*, además determinaron que se podía realizar el diagnóstico directamente por esta PCR la cual es más rápida y más sensible que las técnicas bacteriológicas clásicas.

7.4 Evaluación de la variabilidad genética por la técnica de Spoligotyping.

Se realizó la amplificación de las secuencias espaciadoras y se obtuvo una sola banda como se observa en la siguiente figura.

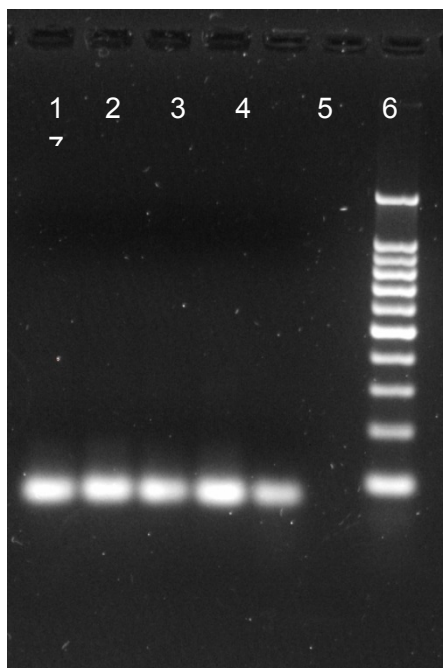


Fig. 9. Amplificación de secuencias espaciadoras. Gel de agarosa al 2% teñido con sybersafe. Carril 1: Muestra 25510, carril 2: muestra 2258, carril 3: muestra 25750, carril 4: muestra 24976, carril 5: muestra 3034, carril 6: Control negativo, Carril 7: Marcador 100 pb.

Una vez que amplificaron todas las muestras se realizó la hibridación con la membrana del *spoligotyping* y se reveló con el protocolo de quimioluminiscencia obteniéndose un film como se muestra en la figura 10.

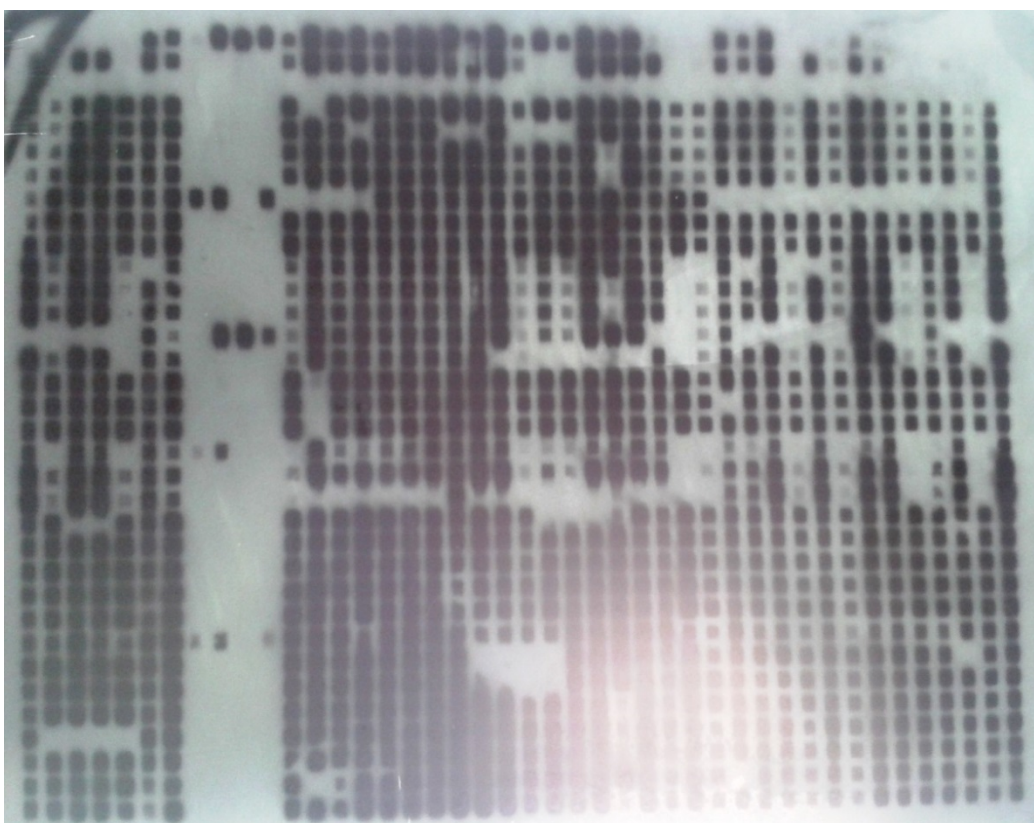


Fig. 10. Film de quimioluminiscencia carril 1 y 2 controles BCG y H37Rv, carril 3: control negativo, carril 4- 34 muestras clínicas.

Para poder trabajar en la conversión del código binario de una mejor manera se transformó la membrana en un documento de fácil interpretación, es decir se creó en Word una cuadrícula representando cada uno de los espaciadores que nos podrían dar una señal en caso de que exista hibridación de la muestra con los mismos, un ejemplo se muestra en la figura 11.

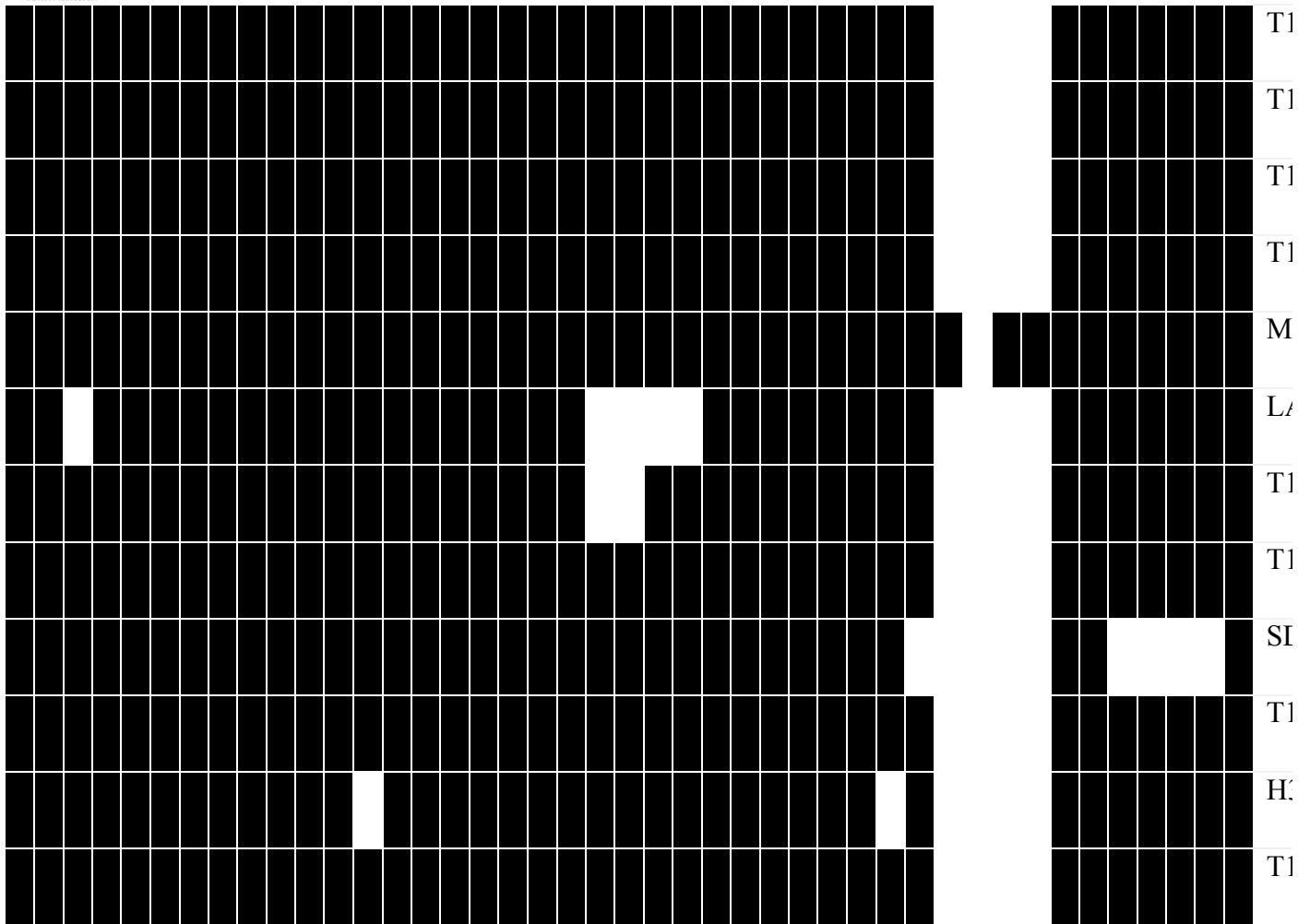


Fig. 11. Datos simplificados de lo obtenido en la membrana de hibridación en la que se muestra el linaje al que pertenece cada una de las muestras.

Para poder interpretar que cepa es cada patrón se convirtió la secuencia de cuadros en un código binario, cuando se tuviera color un cuadro con color se toma como 1 cuando carece de color se toma como 0; una vez que se transforman los cuadros a 0 y 1 se toman tripletes y se les da un valor como se mostró en la tabla 5.

Una vez que se transforma toda la línea a este código octal se introduce en la base de datos del Instituto Pasteur de la Guadalupe llamada SITVIT primero se tiene un número llamado SIT

(Shared International Types), y este nos dice que familia es, en nuestras muestras hasta el momento contamos con las siguientes muestras:

Tabla 11. Linajes de cepas presentes en el estudio

Familia	Número
T1	16
X1	2
EAI5	1
MANU2	2
LAM1	1
MANU1	1
H37Rv	1
H3	5
Orphan	34

En la segunda membrana que se realizó se hicieron repetidos de 4 muestras analizadas en la primera membrana (25510, 24534, 26772, 33034) y en las dos nos dieron el mismo resultado (T1, SD, SD, SD respectivamente) por lo que se comprueba la reproducibilidad del método.

En nuestros datos observamos que tenemos dos muestras del mismo paciente pero que fueron obtenidas en diferente momento las muestras 2197 y 2258, al momento de hacer el *spoligotyping* se observa que en la primera muestra la cepa que el paciente tenía pertenecía a la familia EAI5 y la muestra de 6 meses después pertenecía a la familia T1, por lo que se puede demostrar gracias a esta técnica que el paciente estaba enfermo con una nueva cepa, recibió tratamiento pero al ir a la visita siguiente no había negativizado, esto debido a que se enfermó con una cepa diferente.

Una de las muestras nos dio resultado de ser perteneciente a la familia de H37Rv, lo cual no es algo común ya que esta cepa es muy utilizada para controles en laboratorios muy frecuentemente, debido a eso puede pensarse que es una contaminación cruzada de alguna cepa de referencia que se tenga en el laboratorio en el que nos proveen las muestras o que efectivamente se trate de un caso clínico; en un trabajo realizado anteriormente por Bifani en el 2010 (Bifani y cols 2000) ellos diferenciaron varias cepas pertenecientes a la familia H37Rv y H37Ra para determinar la naturaleza de la presencia de esa cepa, y llegaron a la conclusión que la técnica de *spoligotyping* no era lo suficientemente discriminadora para determinar si era del mismo tipo del control o era una variante diferente, lamentablemente el DNA de esta muestra se terminó por lo que no fue posible realizar el análisis de esta muestra con la técnica de MIRU-VNTR.

En un trabajo realizado en Monterrey México (Molina-Torres C y cols 2010) encontraron también que la familia con mayor prevalencia era la T1 con un 41%, lo que concuerda con nuestro estudio ya que es de igual manera la que tiene más prevalencia hasta el momento con un 30%. Se han realizado este tipo de estudios en otras partes del mundo en las que se han observado un tipo diferente de familias de *M. tuberculosis* por ejemplo se realizó un estudio en Brasil en el que la familia predominante con un 47% era LAM (Pitondo-Silva A y cols 2013).

En Veracruz (Cancino 2013) realizaron un trabajo en el que clasificaron 100 muestras por la técnica de MIRU-VNTR de 12 locis y *Spoligotyping* en el que los resultados mostraron que los linajes X y H fueron los más abundantes (21%) seguido por LAM (18%) y T (14%); los linajes EAI y Beijing con un 11% y el resto de los aislados se identificaron como huérfanos

(11%), en este trabajo encontraron las mismas familias que en nuestro trabajo pero en diferente porcentaje, esto podría deberse a la diferente región en la que se encuentra Veracruz.

En Acapulco (Nava-Aguilera E y cols 2010) los resultados fueron diferentes a los que se había observado anteriormente ya que la familia más frecuente fue con 44.6% EAI seguida de 11.6% LAM lo cual podría deberse a la localización de este municipio geográficamente en México además de que en Guerrero es conocido que se tiene una carga genética Africana debido a la previa colonización de este estado.

En el estado de México (López-Álvarez R 2010) se realizó un estudio con pacientes con VIH, la familia más frecuente fue la LAM9 seguida de la familia T1 y la familia X y el 41.17% fueron muestras que no tenían un patrón conocido o reportado denominados huérfanos, en este estudio es el primero en el que se reporta un alto número de cepas huérfanas lo que podría deberse a cepas endémicas de la región.

En el 2012 se publicó un artículo (Martínez-Guarneros A y cols 2013) en el que se realizó el análisis de 109 cepas multirresistentes de *M. Tuberculosis* colectadas en 23 diferentes estados México de esto se obtuvieron 62 diferentes patrones de espoligotipado, las familias predominantes fueron la T1 seguida de la familia EAI 2 y 5 pero lo que llama más la atención de este artículo es que la mayoría de las muestras (35.48%) fueron huérfanas lo que sugiere que en México existen cepas endémicas que no han sido reportadas por lo que sus patrones no se encuentran registrados en la base de datos

En un estudio realizado en el 2013 en San Luis Potosí (López-Rocha E y cols 2013) se encontraron resultados completamente diferentes a los de nuestro estudio ya que la familia predominante fue la EAI y obtuvieron cepas Beijing, MANU y *M. Bovis*.

Existe solamente un reporte previo en Guadalajara (Flores-Treviño S y cols 2015) en el que evaluaron 68 muestras y encontraron resultados similares a los que obtuvimos en nuestro estudio ya que las familias predominantes fueron la T (38.2%), Haarlem (17.7%) y LAM (17.7%) la diferencia fue que en este estudio realizaron la técnica de RFLP complementaria al *spoligotyping* y no la técnica de MIRU-VNTR como fue en el caso de nuestro estudio.

Al momento de realizar el análisis del código octal se obtiene un SIT y aun y cuando el SIT sea diferente nos puede dar que pertenece a la misma familia, este fue el caso en nuestras muestras pertenecientes a la familia T1, ya que de 14 muestras 9 tienen código octal idéntico (1069, 3026, 3642, 10555, 10920, 5156, 13939, 12851, 16162) lo que se ha mencionado que sugiere que es debido a una transmisión reciente causado por un solo caso (Merza M y cols 2010; Said H y cols 2012; Small P y cols 1994; Luciani F y cols 2008), cabe resaltar además que las muestras son de pacientes que habitan en todo Jalisco es decir no son de una zona en particular lo que podría inferir que se están diseminando rápidamente o que como se mencionó anteriormente que los pacientes con ninguna relación epidemiológica infectados con la misma cepa demuestra que la *M. tuberculosis* puede ser transmitida durante un contacto breve en personas que no viven o trabajan juntas (Small P y cols 1994), además las cepas que no tienen el mismo código octal pertenecientes a la familia T1 la mayoría (3 de 5) son de Puerto Vallarta lo que sugiere que estas no se transmiten tan fácilmente. En la familia H3 se observó también un hecho interesante ya que se tienen dos muestras pertenecientes a miembros de la misma familia que viven incluso en la misma casa y observamos un espoligo idéntico para ambos, lo que confirma que uno transmitió la enfermedad al otro, lo que nos sugiere la falta de control por los miembros del sector salud en prevenir el contagio entre miembros de la misma familia.

Obtuvimos también 23 cepas con un patrón único llamadas huérfanas o *singletons* las cuales son consideradas que fueron adquiridas por migración o por una reactivación reciente de infecciones adquiridas en un tiempo distante (Said H y cols 2012; Luciani F y cols 2008)

Para poder analizar de una mejor manera la distancia genética entre las cepas que tenemos en nuestro estudio y ver si se formaban *clusters* que señalaran una posible transmisión reciente de las cepas se realizó un análisis por dos metodologías, mediante dendograma y por un árbol de expansión mínima. Estos análisis se hicieron en línea en la dirección www.miru-vntrplus.org, se escogió este programa ya que nos permite realizar los dos análisis y cuando se tengan los resultados del miru-vntr se podrá realizar el análisis en conjunto con el espoligo para obtener *clusters* más definidos y mejor clasificados. El dendograma es una vía gráfica que nos ayuda a observar la relación que existe entre las cepas, el programa da la opción de realizar el



dendograma por UPGMA o por Neighbour- Joining, el primero calcula el dendograma a partir de las distancias medias y el segundo ofrece el resultado en relación del grado de proximidad por lo que es más detallado; debido a eso se escogió el Neighbour Joining para realizar el estudio.

El árbol de expansión mínima es otra vía de representar las cepas como un gráfico, es calculado por los genotipos de las cepas y usa las cuentas de variantes de locus y no distancias. Los genotipos están agrupados dentro de complejos clonales mediante su diferencia de locus respecto a otros genotipos, cabe señalar que un complejo clonal tiene al menos dos genotipos y que según la frecuencia del número de cepas con un cierto genotipo el círculo que representa los complejos clonales estará coloreado como se muestra en la figura 13.

El dendograma resultante se muestra en la figura 12.

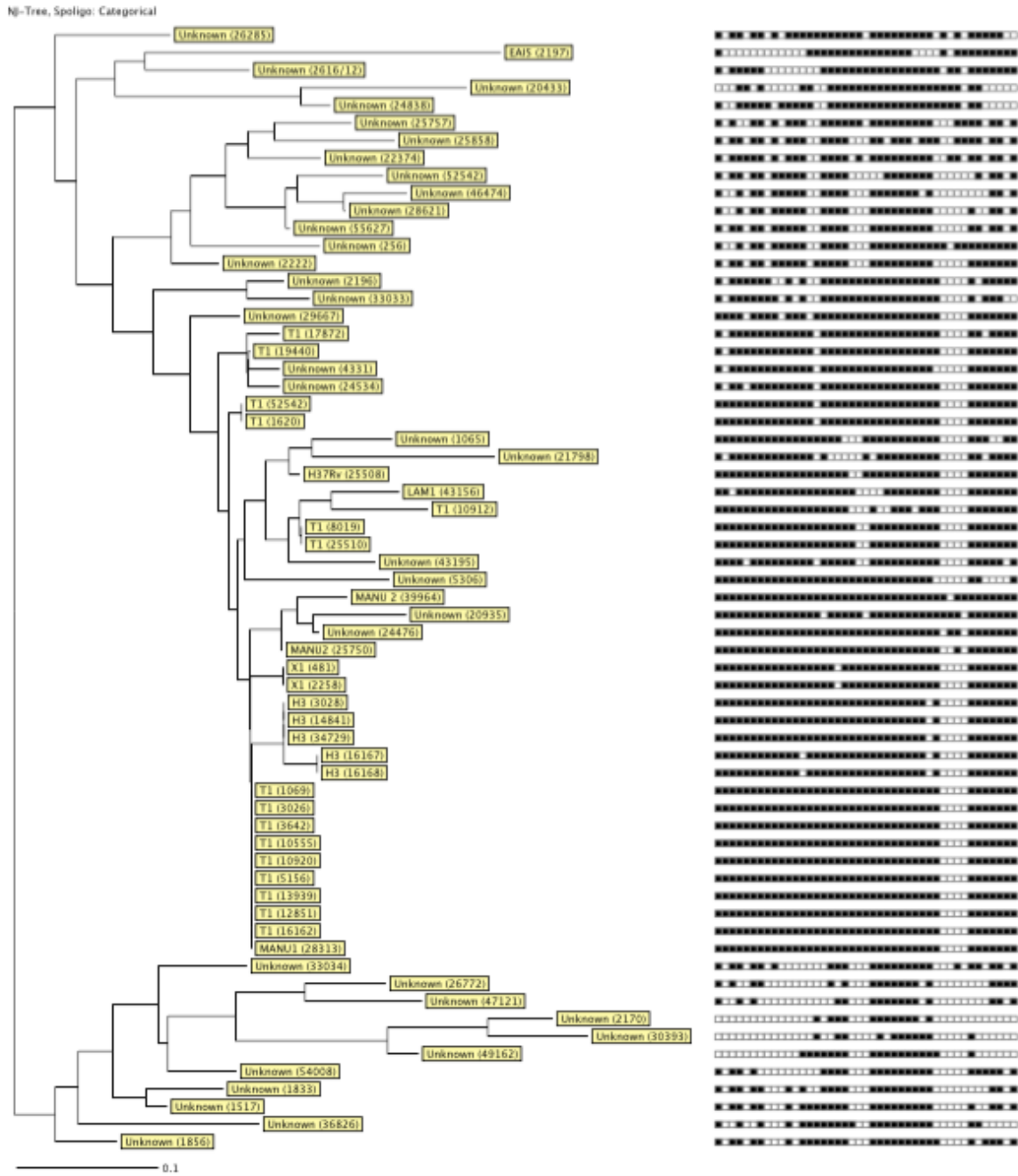


Fig. 12. Dendrograma de Neighbour Joining de las muestras del estudio

Se observa claramente señalado la formación de seis *clusters* los cuales están muy bien definidos ya que al observar el patrón del espoligo son exactamente iguales, pero en las demás

muestras no se observa una formación clara de *clusters*. La formación de cluster sugiere una fuente común de infección en la localidad del estudio (Nava-Aguilera E y cols 2011)

Tomando lo esencial de cada una de las muestras en los *clusters* formados obtenemos la tabla número dos:

Tabla 11. Características de los *clusters* observados en el análisis del dendograma

Cluster	Paciente	Municipio	Sexo	Edad	Ocupación	Resistencia	Co-infección
A	52542	Tlaquepaque	F	26	Ama de casa	Pirazinamida	Ninguna
A	1620	Guadalajara	F	67	Empleado	Sensible	Diabetes Esquizofrenia
B	8019	P. Vallarta	F	19	Estudiante	Iso y Etamb	Ninguna
B	25510	P. Vallarta	F	----	-----	Iso, rifa y pira	-----
C	481	Zapopan	F	45	Trabajador de la salud	Sensible	Ninguna
C	2258	Tlaquepaque	M	46	-----	Sensible	Diabetes
D	3028	Tlaquepaque	F	26	Ama de casa	Sensible	Ninguna
D	14841	P. Vallarta	M	36	Empleado	Iso y Pira	VIH/Sida
D	34729	Tlaquepaque	M	25	Empleado	Rifa y Etamb	Ninguna
E	16167	P. Vallarta	F	49	Comerciante	Iso y Pira	Diabetes
E	16168	P. Vallarta	M	21	Comerciante	Isoniacida	-----
F	1069	Tala	M	65	Ganadero	-----	Diabetes
F	3026	Guadalajara	F	37	Ama de casa	Sensible	Ninguna
F	3642	Tonalá	F	48	Comerciante	Iso y Pira	Obesidad
F	10555	San Juan de los lagos	F	47	Funcionario	Iso y Pira	Ninguna
F	10920	P. Vallarta	F	-----	-----	Isoniacida	-----
F	5156	Guadalajara	M	28	Técnico	Sensible	Ninguna
F	13939	Guadalajara	M	28	Técnico	Sensible	Ninguna

F	12851	P. Vallarta	M	33	Empleado	Etam y Pira	Ninguna
F	16162	-----	M	-----	-----	Isoniacida	-----
F	28313	Tlaquepaque	M	42	Peón	Etambutol	Alcoholismo

En los *clusters* formados se observa que los pacientes que se encuentran dentro de estos conglomerados viven en la misma región o en regiones cercanas e incluso en algunos casos la resistencia a antibióticos es la misma lo que podría hablar de una transmisión directa de estas muestras idénticas. Sin embargo es solo el 29% de la población estudiada que se encuentra en estos *clusters* por lo que no existe una transmisión directa entre la población al menos con esta metodología.

El nivel de discriminación del método fue calculado usando el índice discriminatorio Hunter-Gaston (HGI) mediante la siguiente ecuación.

$$D = 1 - \left[\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1) \right]$$

Donde D es el índice de discriminación numérica, N es el número total de muestras, s es el número total de tipos de cepas diferentes y n_j es el número de cepas que pertenecen al tipo j .

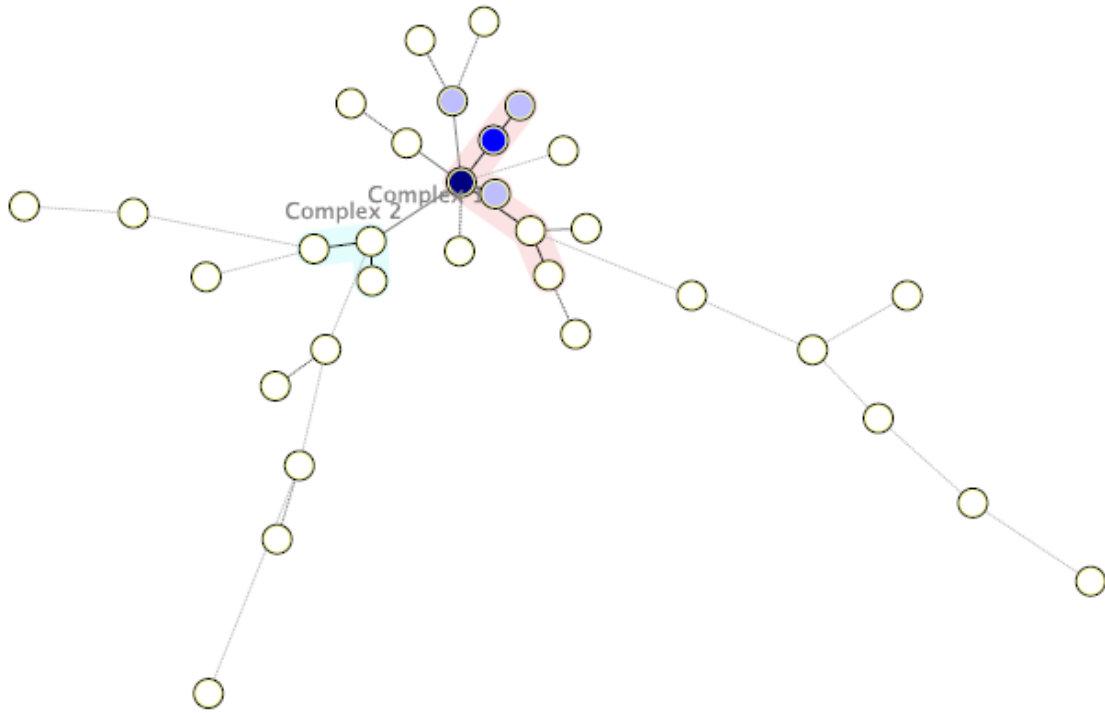
Una vez calculado se obtuvo que se tiene un índice de discriminación de 0.64.

Se calculó además la tasa de transmisión reciente usando la formula n-1 como se describió anteriormente (Small P y cols 1994). La tasa de transmisión del estudio fue de 0.20, lo que sugiere que no existe una transmisión activa en las muestras de nuestra población, a diferencia de lo que se observó en un trabajo realizado en Acapulco (Nava-Aguilera E y cols 2011), en el que se obtuvo una tasa de transmisión de 0.68. Estas tasas de transmisión tienen variaciones por las características metodológicas de los estudios, así se sabe que en áreas de elevada

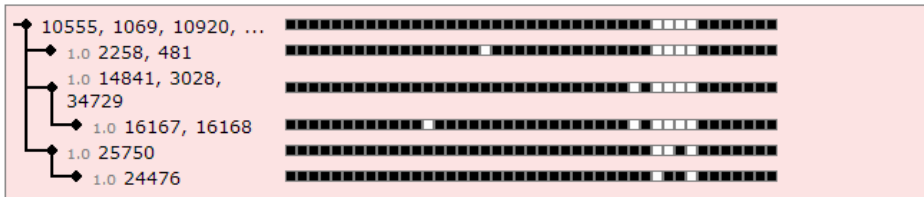


incidencia los estudios que incluyen pocos casos subestiman de forma muy acusada la transmisión reciente (García-Pachón E y cols 2005). La baja transmisión en cepas resistentes ya había sido reportada previamente (Van Soolingen D y cols 1999; García-García M y cols 2000) se ha observado una asociación negativa entre la agrupación de casos y la resistencia a fármacos antituberculosos y Murray et al propuso razones por lo que los *clusters* de tuberculosis con resistencia a uno o más fármacos pueden ser menores que los *clusters* de los casos sensibles: esto debido a que los pacientes con tuberculosis multirresistente son menos accesibles a los sistemas de salud en muchos países, pueden tener menos contactos sociales o éstos pueden haber estado expuestos al germen con mayor frecuencia(Murray M y cols 2002).

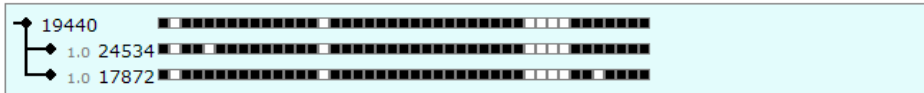
En la figura 13 se muestra el análisis realizado por árbol de expansión mínima en el cual se ilustra las relaciones evolutivas de las muestras de nuestro estudio con la técnica de *Spoligotyping*



CC 1



CC 2



Singletons

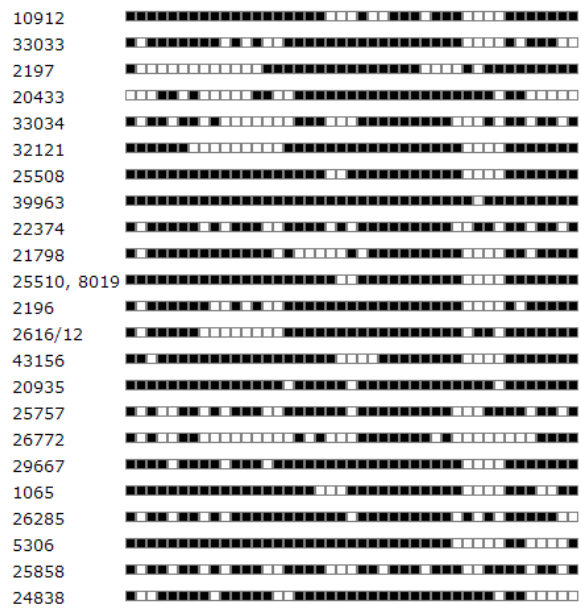
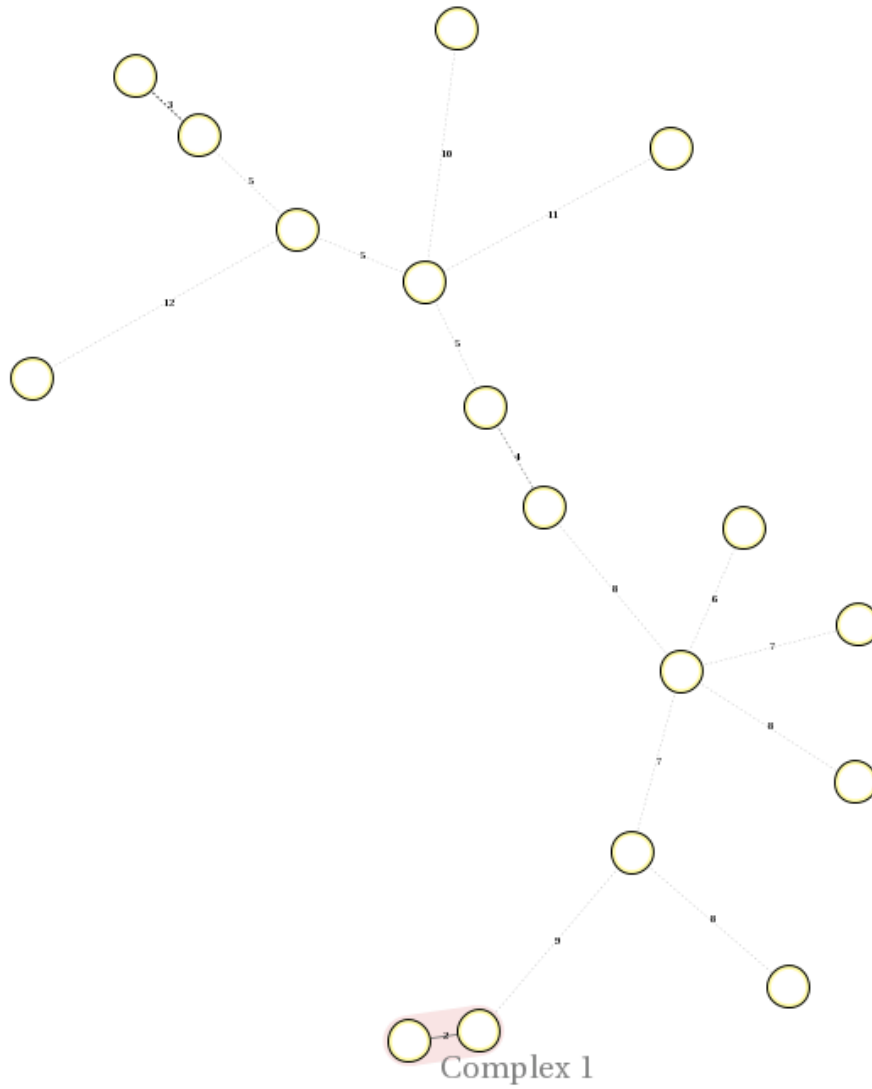
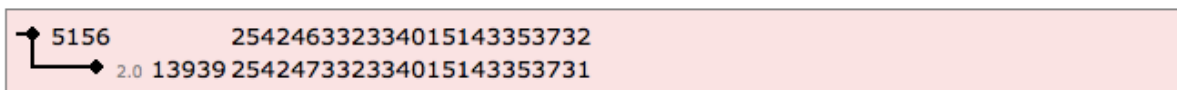


Fig. 13. Análisis de complejos clonales formados en las cepas del estudio mediante Minimum spanning tree

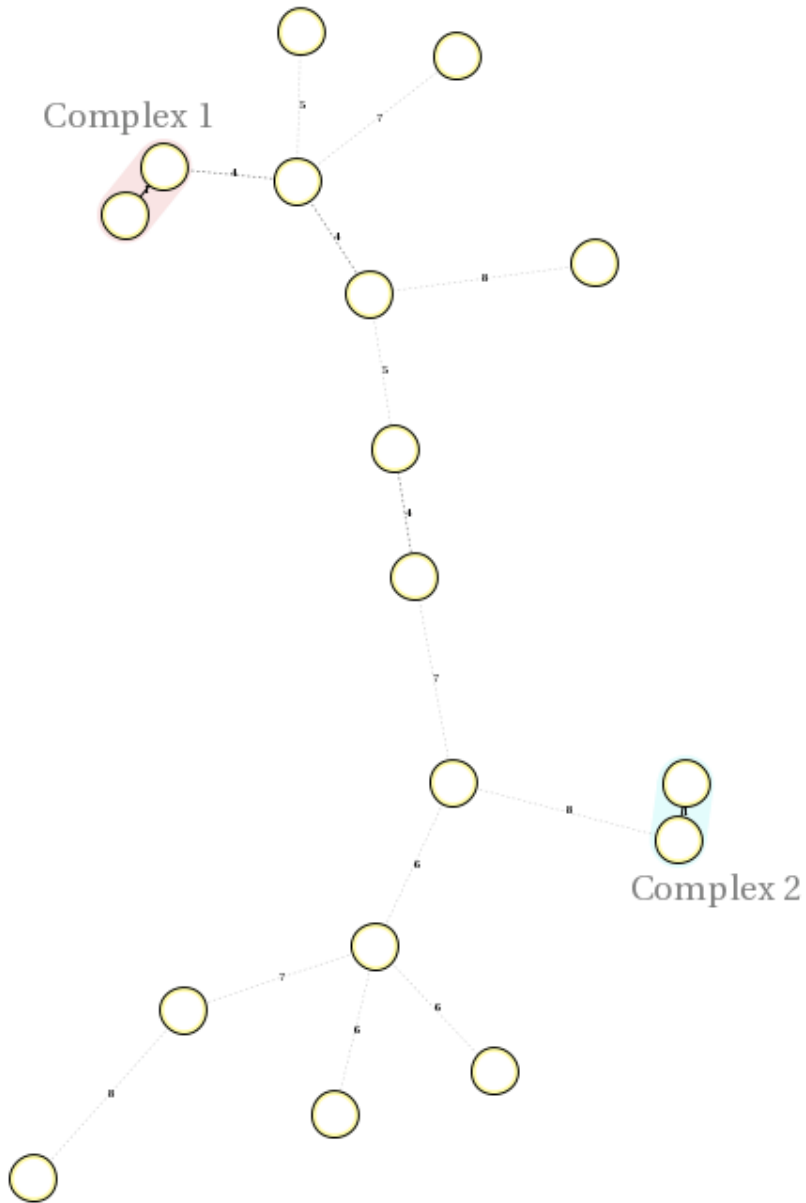




Singletons

1069 5422342242 0 143 3262
 3642 243233342632425163223632
 2222 224223322224025153332522
 2170 134274232224026153330732
 22374 21413342242402515334152
 14841 223235332534425163333532
 24838 224214232424216 73532622
 24534 234133422424025154341522
 16167 224245332432325163333452
 1065 221226322534425153353432
 29667 234223322234225163334522
 34729 213243332624425163333332
 5306 246216342034225153353922
 12851 234243322534225163333622
 1517 224213422424025155331522

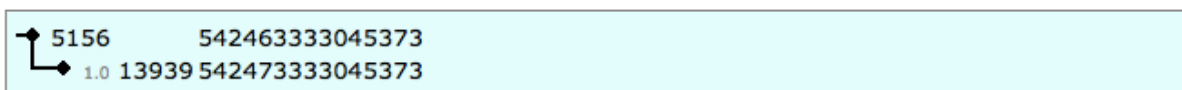
Fig. 14. Árbol de expansión mínima del análisis de *Spoligotyping* y MIRU-VNTR de 24 locis.



CC 1



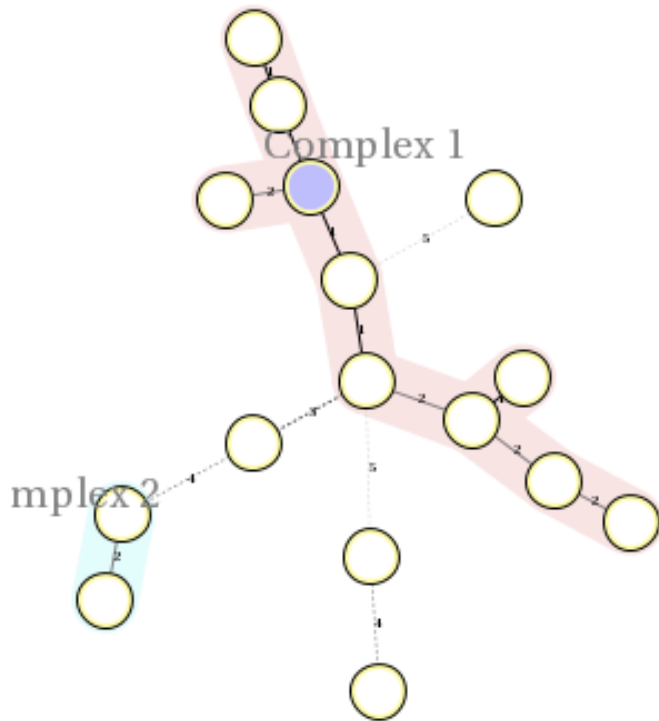
CC 2



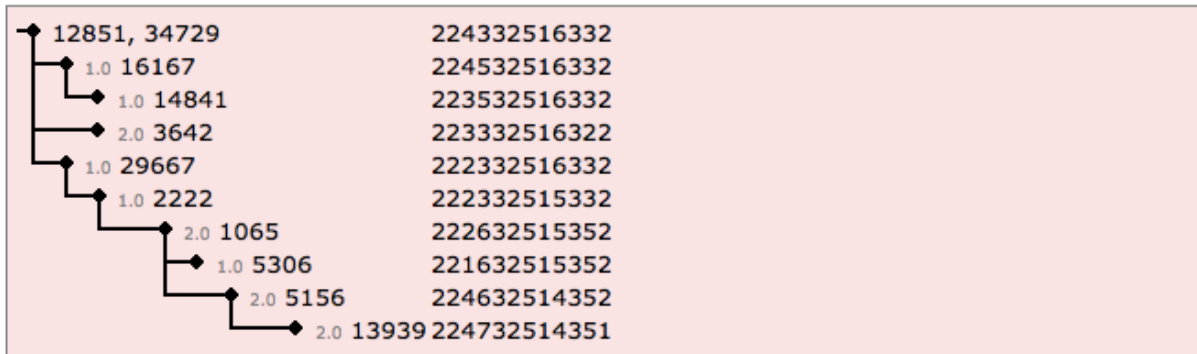
Singletons

- 1069 542234242043262
- 3642 432333463462363
- 2222 242233222053252
- 2170 342742322053073
- 14841 232353353463353
- 24838 242142342273262
- 16167 242453343363345
- 1065 212263253455343
- 29667 342233223263452
- 34729 132433362463333
- 5306 462163403255392
- 12851 342433253263362
- 1517 242134242053152

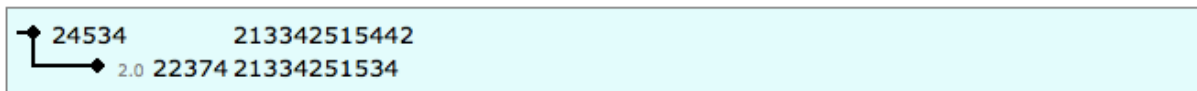
Fig. 15. Árbol de expansión mínima de las técnicas de *Spoligotyping* y MIRU-VNTR de 15 locis.



CC 1



CC 2



Singletons

1069 22342 1433
 2170 127422615332
 24838 2214226 7332
 1517 221342515532

Fig. 16. Árbol de expansión mínima de la técnica de *Spoligotyping* y MIRU-VNTR 12 locis

Mediante este análisis se pudo visualizar de mejor manera la formación de dos complejos principales en los cuales se encuentran las cepas con grandes similitudes. Al centro del diagrama se observan círculos con diferentes coloraciones, estas son según el número de cepas que entran en él, por ejemplo el primero en el que se ve de una coloración azul más intensa se encuentran diez cepas (10555, 1069, 10920, 12851, 13939, 16162, 28313, 3026, 3642 y 5156), en la de coloración azul más baja se encuentran tres muestras (14841, 3028 y 34729) y en las grises se encuentran dos muestras. Entre cada una de las esferas se observa diferencia en los patrones del espoligo pero gracias a este análisis se pueden unir varias en nodos debido a su similitud lo cual a simple vista o en los dendogramas no es tan fácil realizar. Mediante este análisis se puede llegar a la conclusión de que tenemos dos nodos en nuestro análisis marcado en rosa y azul en el diagrama.

7.5 MIRU-VNTR

Se realizó la técnica de MIRU-VNTR de 12, 15 y 24 locis y el análisis se realizó tanto sólo como en conjunto con el *Spoligotyping*, cabe mencionar que este estudio no se realizó en todas las muestras solamente se tomaron 3 grupos representativos: las muestras MDR, reinicidentes y polirresistentes, esto debido a que eran los grupos más interesantes por estudiar en nuestra población.

Se muestra en las siguientes figuras algunos de los geles obtenidos para las diferentes muestras.

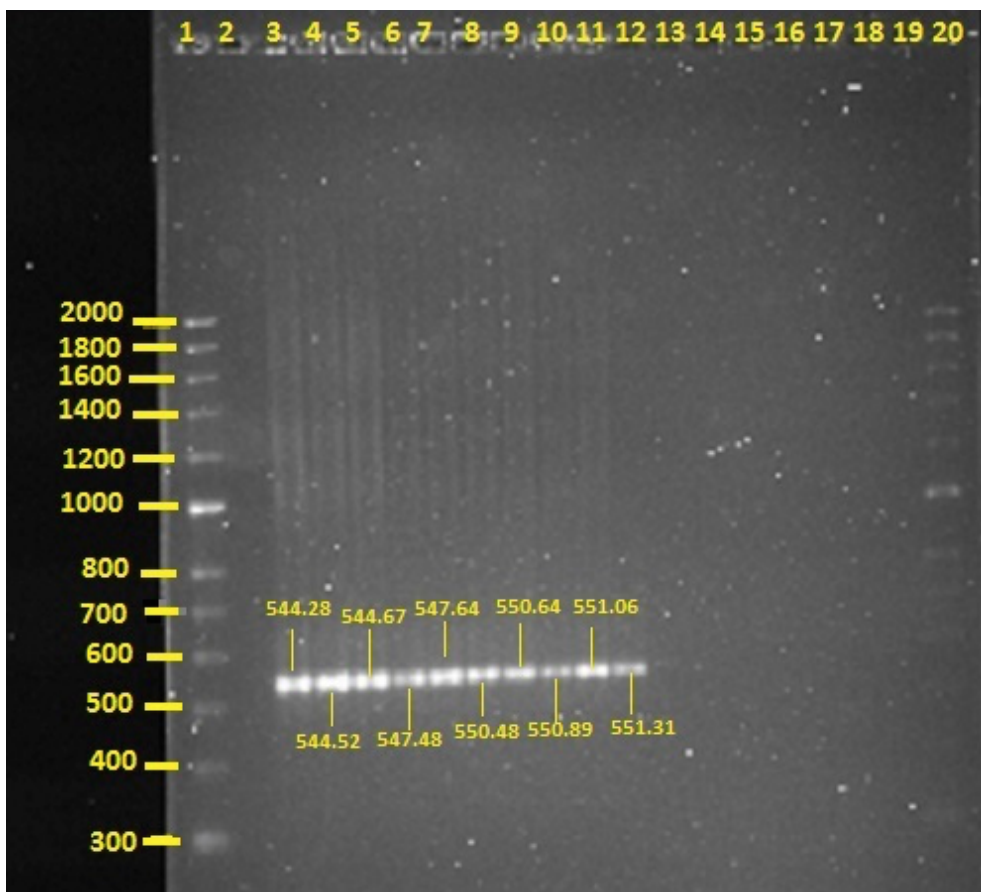


Fig. 17. MIRU 26 en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1: Marcador Hyperladder 50 pb, Carril 2: Control negativo, Carril 3 – 12: muestras clínicas, Carril 13: Marcador Hyperladder 50 pb.



Fig. 18. MIRU 52 y 47 en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1: Marcador Hypperladder 50 pb, Carril 2: Control negativo, Carril 3 – 24: muestras clínicas, Carril 13: Marcador Hypperladder 50 pb.ç

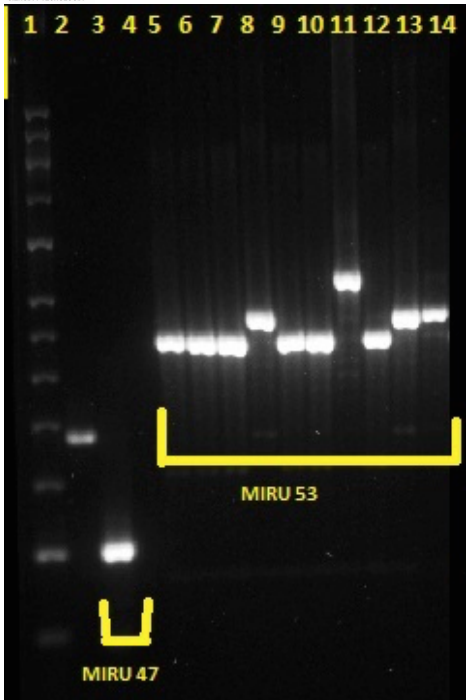


Fig. 19. MIRU 47 y 53 en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1: Marcador Hyperladder 50 pb, Carril 2– 14: muestras clínicas.

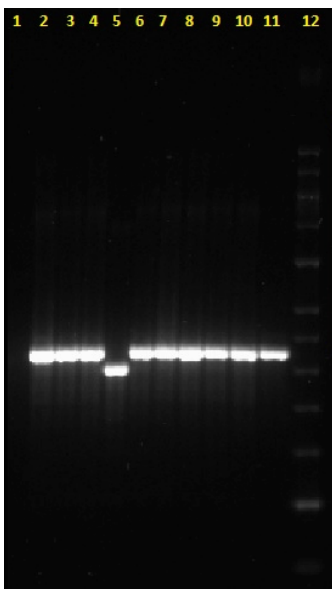


Fig. 20. MIRU 31 en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1: Marcador Hypperladder 50 pb, Carril 2– 11: muestras clínicas.

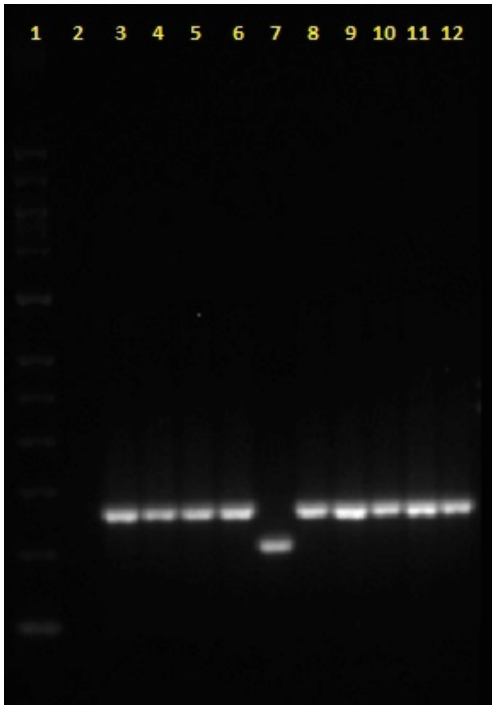


Fig. 21. MIRU 48 en muestras polirresistentes . Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1: Marcador Hypperladder 50 pb, carril 2: Control negativo, carril 3-12: muestras clínicas.

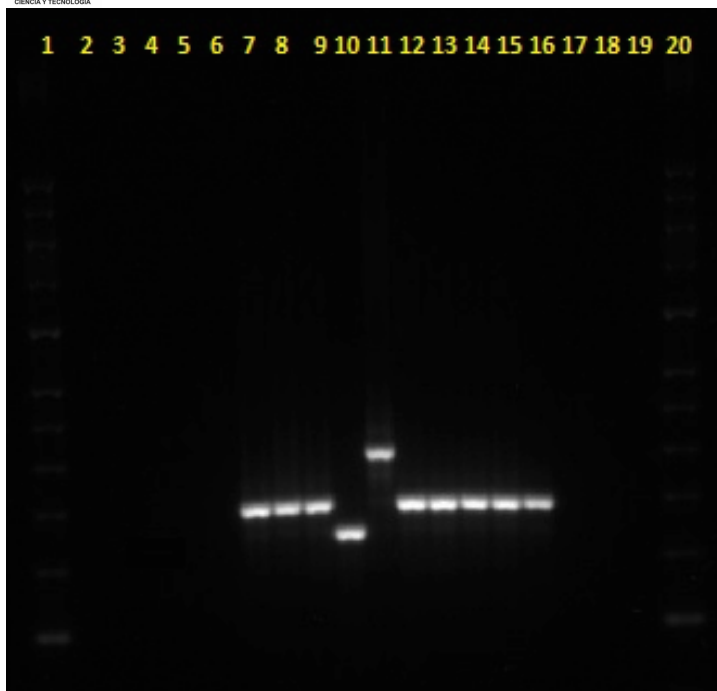


Fig. 22. . MIRU 49 en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1 y 20 : Marcador Hyperladder 50 pb, carril 2: Control negativo, carril 7-16: muestras clínicas.

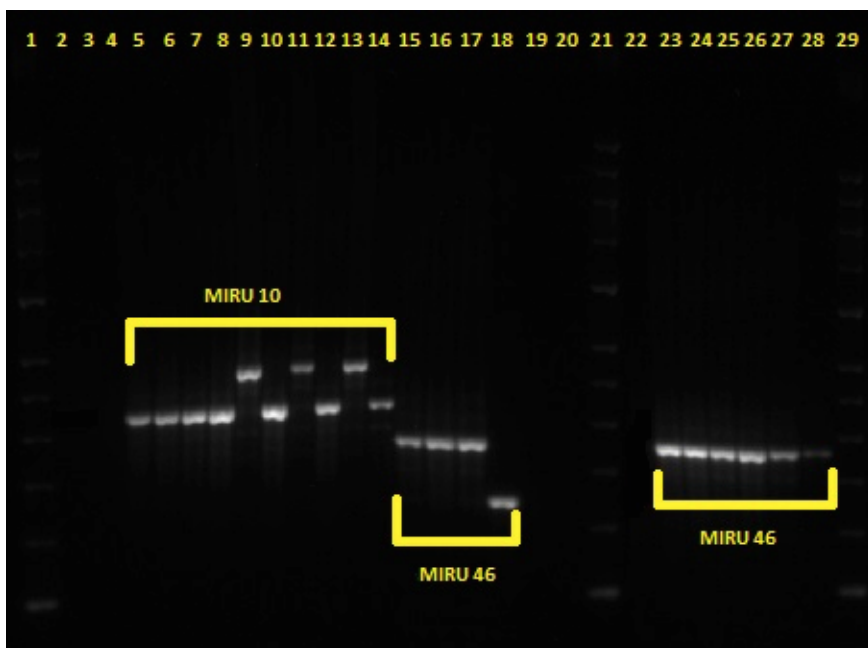


Fig. 23. MIRU 10 y 46 en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1, 21 y 29 : Marcador Hypperladder 50 pb, carril 2: Control negativo, carril 5-18 y 23-28: muestras clínicas

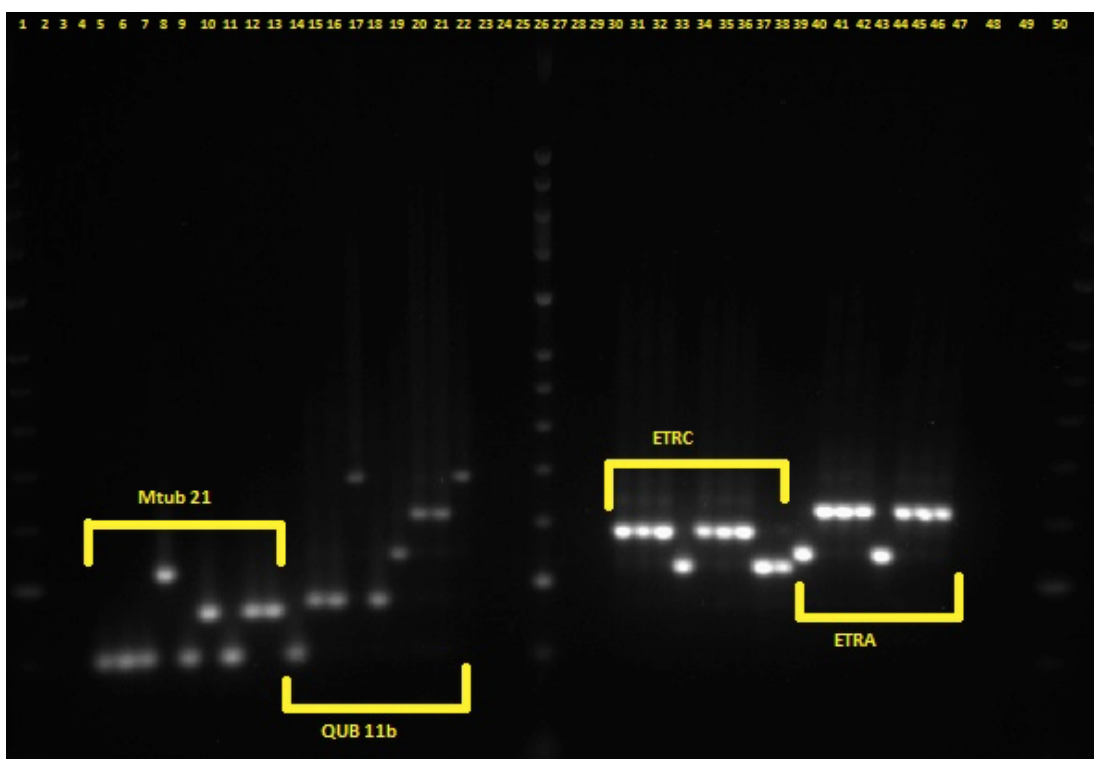


Fig. 24. MIRU Mtub 21, QUB 11b, ETRC y ETRA en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red Carril 1, 26 y 50 : Marcador Hypperladder 50 pb, carril 2: Control negativo, carril 5-22 y 31-46 muestras clínicas.

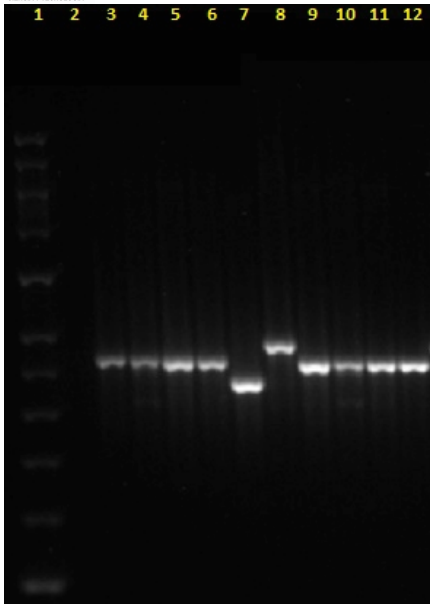


Fig. 25. MIRU 16 en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1, Marcador Hyperladder 50 pb, carril 2: Control negativo, carril 3-12 muestras clínicas.

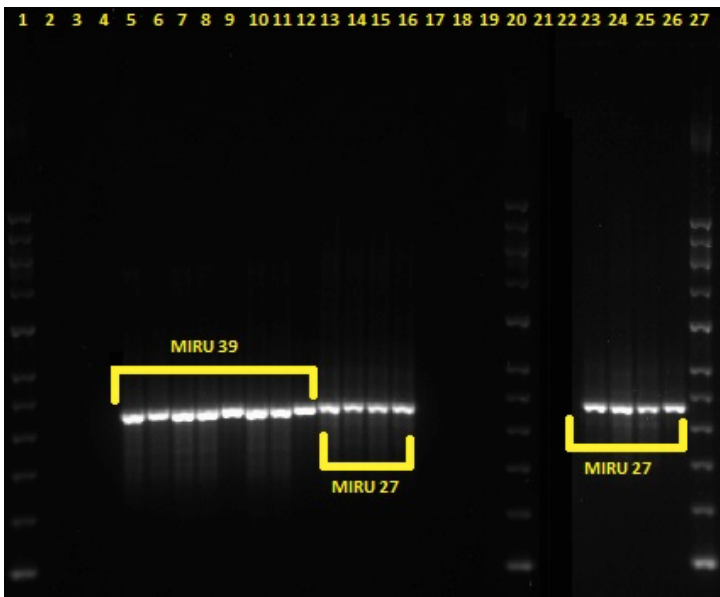


Fig. 26. MIRU 39 Y 27 en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1, 20 y 27 : Marcador Hyperladder 50 pb, carril 2: Control negativo, carril 5-15 y 23-26 muestras clínicas.

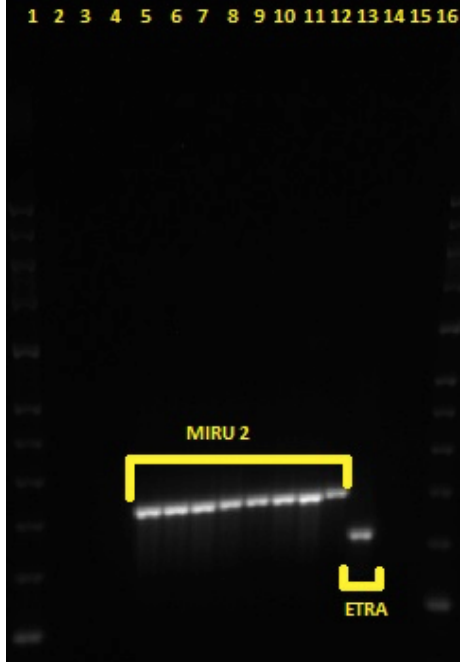


Fig. 27. MIRU 2 y ETRA en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1 y 16 : Marcador Hypperladder 50 pb, carril 2: Control negativo, carril 5-12 muestras clínicas.

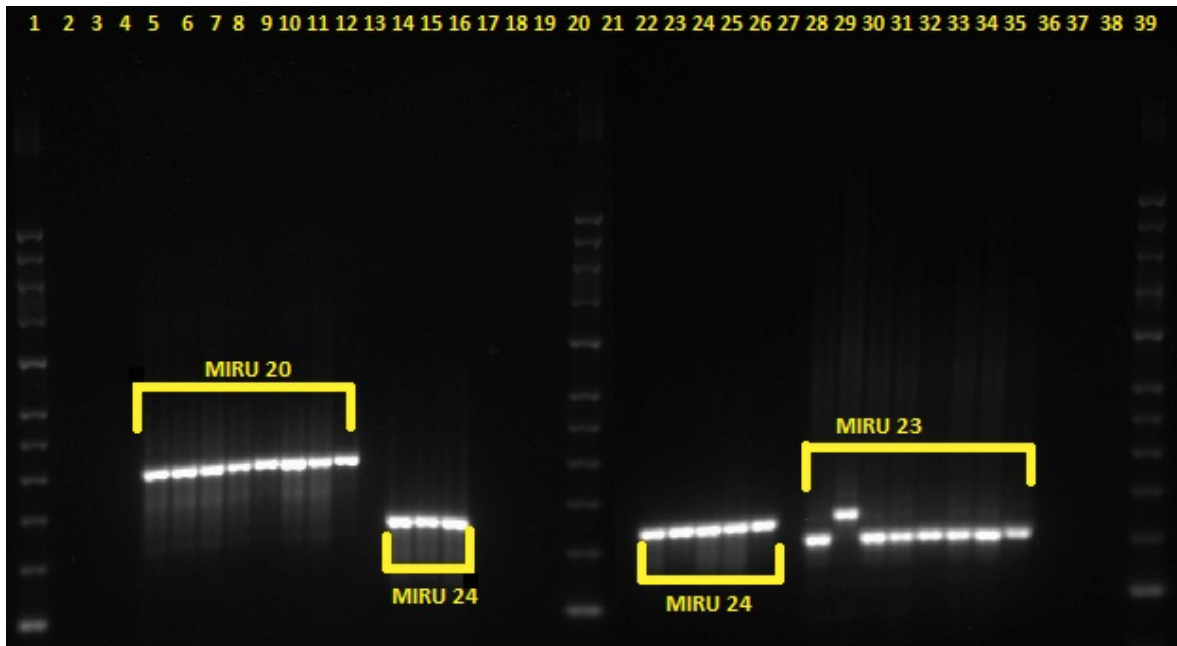


Fig. 28. MIRU 20, 24 y 23 en muestras polirresistentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red.. Carril 1, 20 y 39 : Marcador Hypperladder 50 pb, carril 2, 13, 21 y 27: Control negativo, carril 5-12, 14-16, 22-26 y 28-35 muestras clínicas.

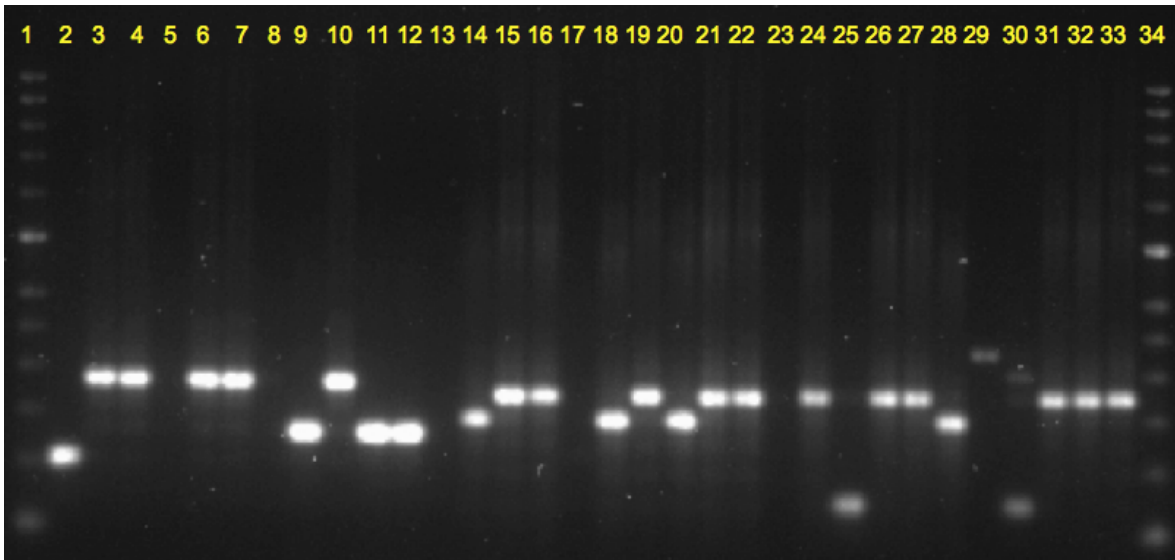


Fig. 29. MIRU 26 en muestras reincidentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1 y 34 : Marcador Hypperladder 50 pb, carril 2-33 muestras clínicas.

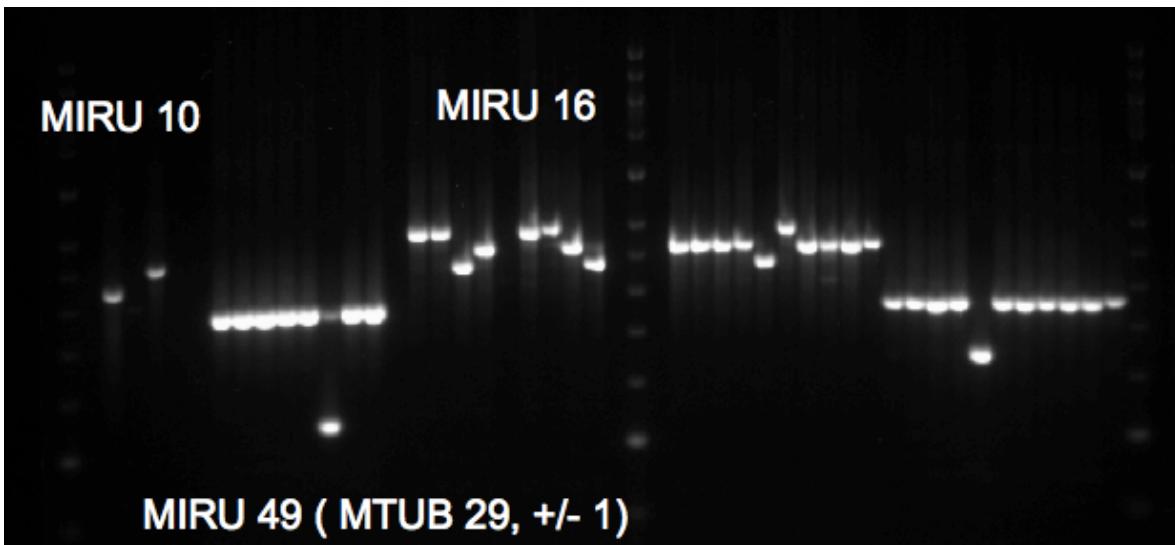


Fig. 30. MIRU 10, MIRU 49 y MIRU 16 en muestras reincidentes. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1 y 34 : Marcador Hyperladder 50 pb, carril 2-33 muestras clínicas.

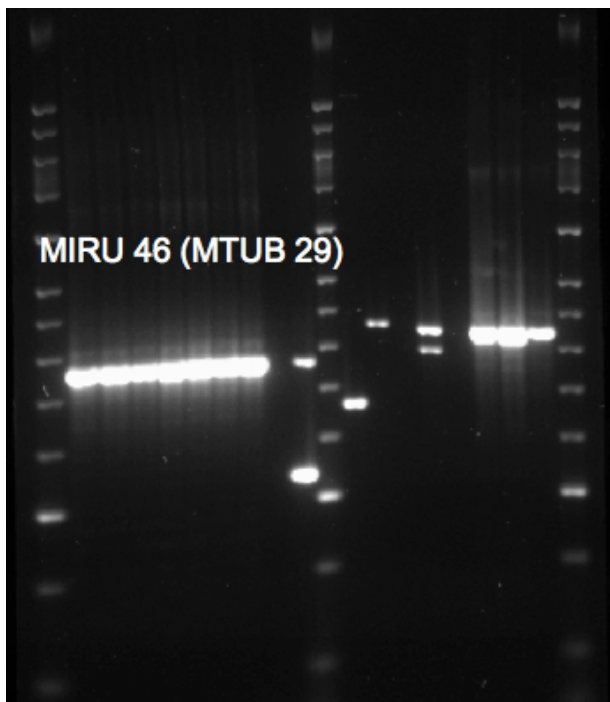


Fig. 31. MIRU 46 en muestras reincidentes .Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1, 11 y 20: Marcador Hyperladder 50 pb, carril 2-10 y 12 – 19 muestras clínicas.

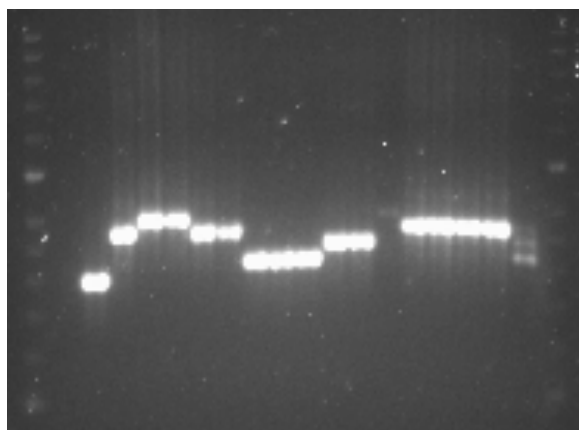


Fig. 32. MIRU 42 en muestras MDR. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1 y 20: Marcador Hyperladder 50 pb, carril 2: Control negativo, carril 3 – 19: Muestras clínicas.

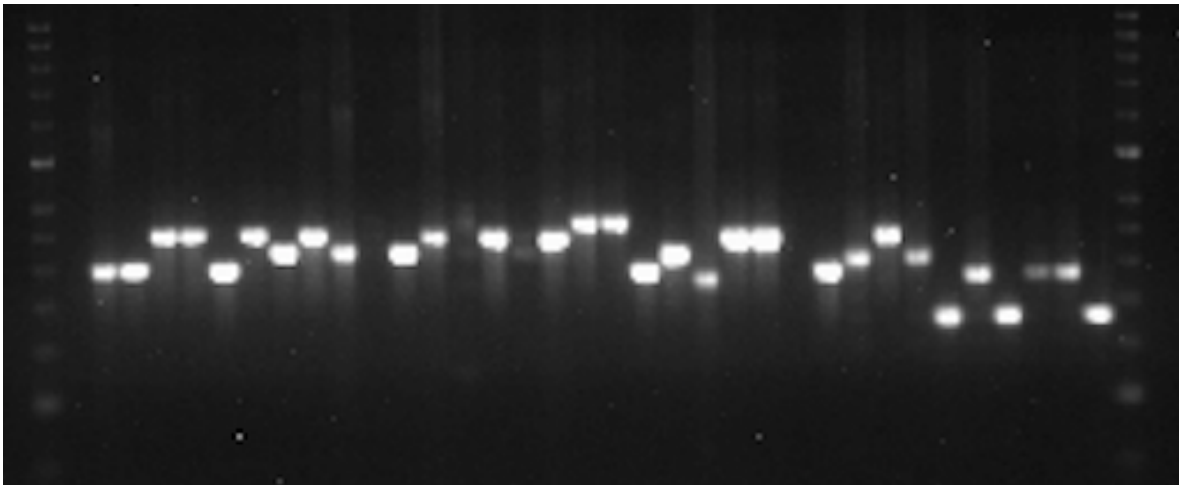


Fig. 33. MIRU 26 en muestras MDR. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1 y 37: Marcador Hypperladder 50 pb, carril 2: Control negativo, carril 3 – 36: Muestras clínicas.

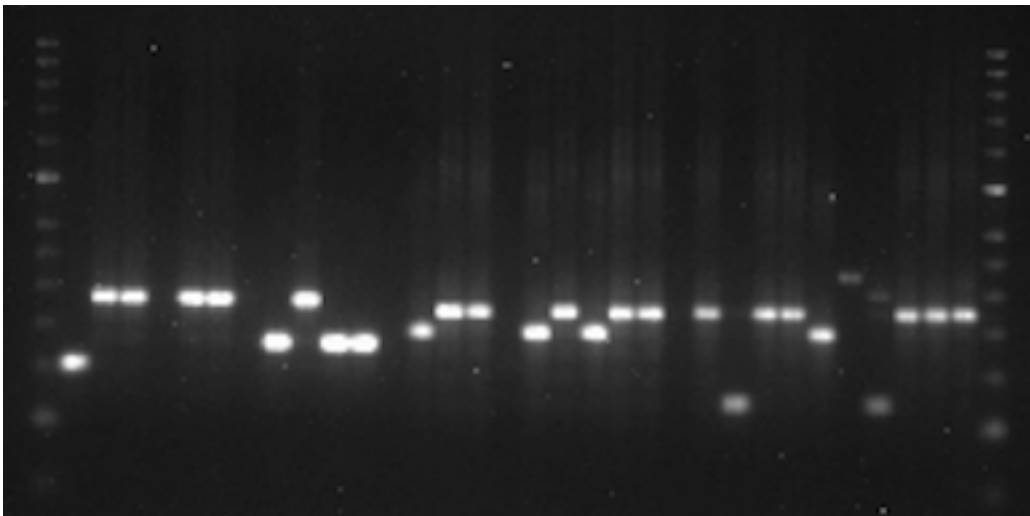


Fig. 34. MIRU 52 en muestras MDR. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1 y 34: Marcador Hypperlader 50 pb, carril 2 – 33: Muestras clínicas

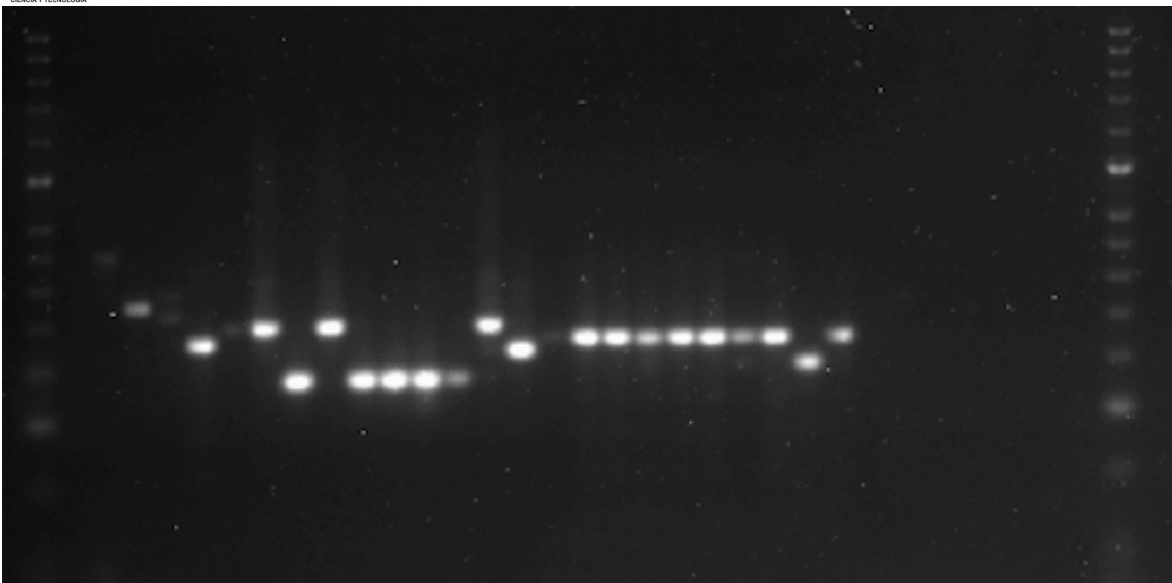


Fig. 35. . MIRU 53 en muestras MDR. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1 y 35: Marcador Hyperladder 50 pb, carril 2: Control negativo, carril 3 – 28: Muestras clínicas.

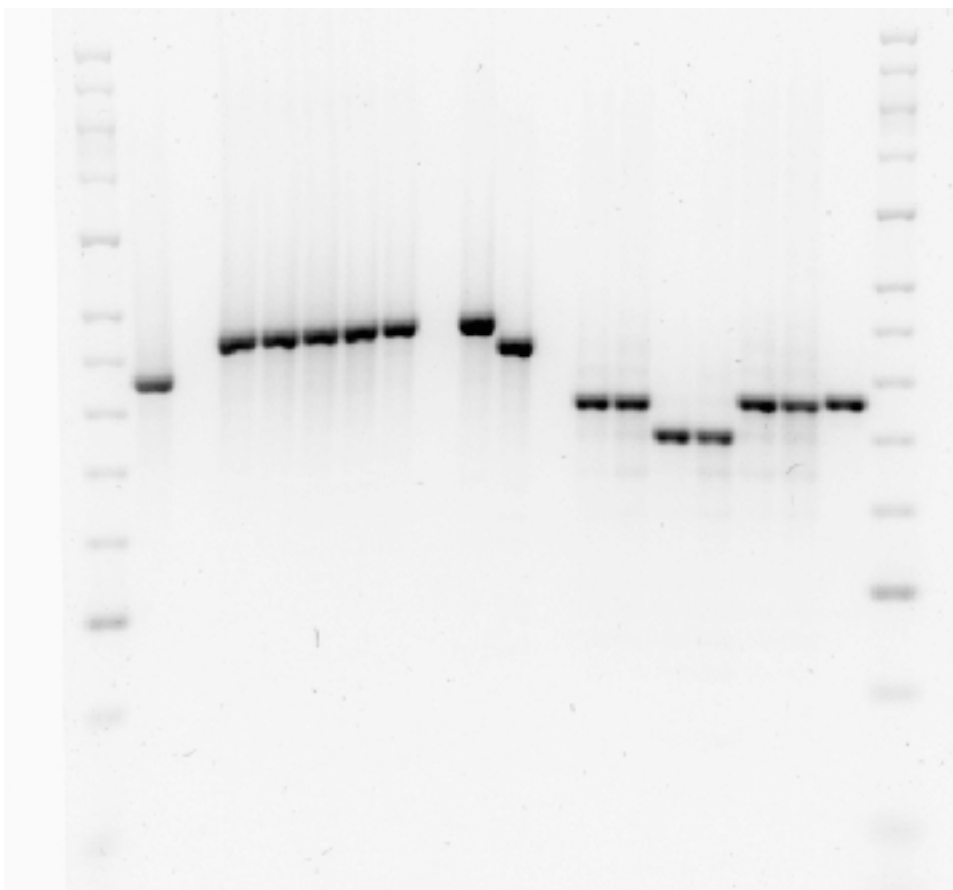


Fig. 36. MIRU 16 y MIRU 29 en muestras MDR. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Carril 1 y 20: Marcador Hypperladder 50 pb, carril 2 – 19: Muestras clínicas.

Una vez que se obtuvieron todos los pesos de las muestras analizadas se realizó el análisis de la información.

Se realizó un dendograma para analizar la dispersión de las cepas con ambas técnicas; *Spoligotyping* y MIRU-VNTR. En la figura 35 se muestra en el inciso a) el dendograma obtenido al analizar las muestras con ambas técnicas, *spoligotyping* y miru de 15 locis y la figura 35 b) es el dendograma con ambas técnicas pero esta vez con el miru de 24 locis

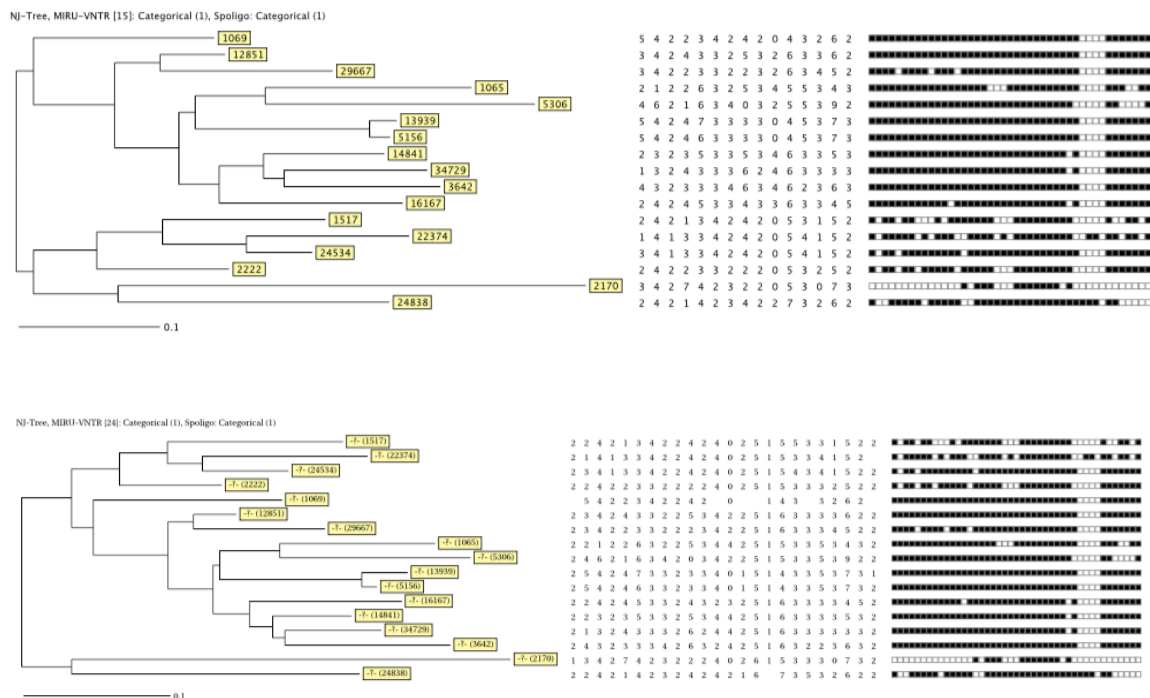


Fig. 37 Dendograma del análisis MIRU – VNTR de los 3 grupos de estudio MDR, Reincidentes y polirresistentes a) MIRU 15 locis y *Spoligotyping* b) MIRU 24 locis y *Spoligotyping*.

Se realizó el set de 24 locus, esto debido a que se ha reportado previamente que el método de *Spoligotyping* solo tiene la tasa de *clusters* alta (76.3%) y un bajo poder de discriminación (HG 0.814), sin embargo para verificar el tipo de cepa encontrada si se realiza un segundo análisis utilizando la identificación mediante MIRU-VNTR de 24 locis se tiene una tasa de formación de *clusters* de 15.5% y un poder de discriminación de 0.999 pero al utilizarse juntos tiene una tasa de formación de *clusters* del 8.3% y un poder de discriminación de 0.999 (Pitondo-Silva A y cols 2013; Huang S y cols 2012) lo que significa que el análisis se hace más sensible para poder formar *clusters* con una mayor especificidad.

Se observa en el dendograma la variación de la formación de *clusters*, en los anteriores se formaban *clusters* más grandes y con el análisis de los 24 marcadores los *clusters* se hacen más específicos, debido a esta especificidad se observa que no existe la formación de *clusters* una vez que se analizaron las muestras con ambos métodos, lo cual indica una baja transmisión de las muestras como ya había sido reportado previamente (Flores-Treviño S y cols 2015)

En un trabajo realizado anteriormente (López-Alvarez R y cols 2010) en la ciudad de México analizaron un set de 12 MIRUS y similar a nuestro trabajo encontraron la presencia de 5 *clusters* y las demás cepas mostraron patrones únicos lo que sugiere que fueran cepas endémicas de la localidad.

En otro estudio realizado con muestras de todo México evaluaron las muestras con el set de 12 locis y mostraron que 96 muestras de los 168 analizadas no fueron encontradas en la base de datos (Martínez-Guarneros A y cols 2013).

Hasta el momento no existe un estudio previo en el que se utilizara la técnica de MIRU de 24 locis y la técnica de *Spoligotyping*.

7.6.- Localización geográfica de las cepas

En el mapa se observa la incidencia de las cepas de *M. tuberculosis* en el estado de Jalisco, en los municipios del centro es donde se encontró la incidencia de una diversidad mayor de familias lo cual es algo esperado ya que se conoce que hay una intensa migración entre ellos debido a su cercanía, además, en estos municipios se podría hablar de una presunta diseminación de estas cepas entre estos estados; el municipio en el que se observa una alta incidencia es Puerto Vallarta el cual es un estado turístico con alto flujo migratorio por lo que es algo esperado la incidencia alta de *M. tuberculosis* en este municipio así como la presencia de 3 diferentes familias T, H3 y huérfanos.

 Familia T

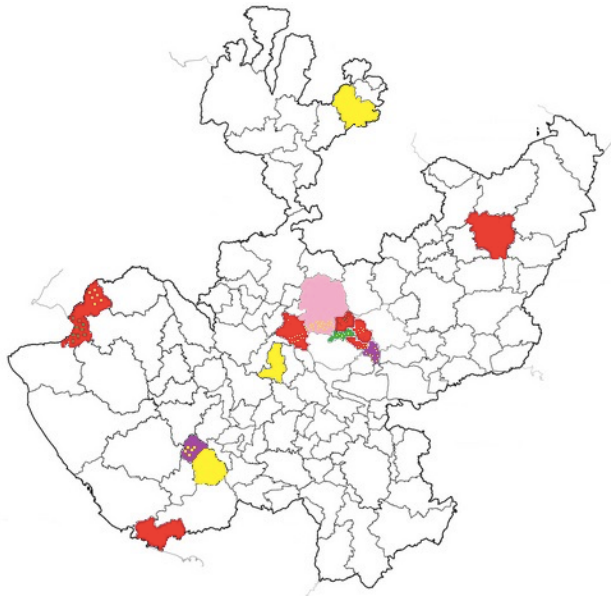


Fig 38. Análisis geográfico de linajes de las cepas presentes en el estado de Jalisco

8. Correlación de características clínicas y de resistencia a antibióticos

En los estudios epidemiológicos de diseño transversal la medida de asociación clásicamente descrita es la razón de momios, la cual muestra el grado de asociación que existe entre una enfermedad o condición de interés y cierta exposición, o dicho de otra manera se define como el exceso o defecto de ventaja (odds) que tienen los individuos expuestos de presentar la enfermedad o condición frente a no padecerla respecto a la ventaja de los individuos no expuestos de presentar la condición frente a no presentarla, Un odds de 1 – 1.2 demuestra que no existe ninguna asociación, 1.2-1.5 una asociación débil, 1.5-3 asociación moderada, 3-10 una asociación fuerte y >10 la asociación se aproxima al infinito (Schiaffino, A y cols 2002). En este estudio se realizó este análisis para evaluar si existía una correlación entre las diferentes características clínicas observadas en los pacientes (diabetes, VIH, asma,

desnutrición, alcoholismo) así como la familia obtenida (T1, X1, MANU, H3, Huerfanos) con la resistencia a antibióticos de la *M.tuberculosis* (Monorresistencia, polirresistencia, sensibles, multidrogorresistencia o reincidentes). Los resultados se observan en la tabla 12 resaltándose en color morado aquellos que mostraron una correlación significativa:

Tabla 13. Razón de momios de los factores de riesgo y linajes respecto a la resistencia de las muestras

Condición evaluada	OR	Margen menor	Margen mayor
Diabetes/ Monorresistencia	0.4706	0.0915	2.4191
Diabetes/ Polirresistencia	0.0571	0.0725	5.9551
Diabetes/ Multidrogorresistencia	1.0625	0.1086	10.3855
Diabetes/ Sensibilidad	0.4706	0.0915	2.4191
Diabetes/ Reincidencia	6.900	1.6941	28.10
VIH/ Monorresistencia	2.4444	0.1449	41.2398
VIH/ Polirresistencia	7.8571	0.4405	140.1503
VIH/ Multidrogorresistencia	5	0.4190	59.6601
VIH/ Sensibilidad	0.7333	0.0717	7.4929
VIH/ Reincidencia	1.1111	0.1075	11.4841
Asma/ Monorresistencia	0.7333	0.0717	7.4929
Asma/ Polirresistencia	2.2916	0.2117	24.8017
Asma/ Multidrogorresistencia	5	0.4190	59.6601
Asma/ Sensibilidad	7.6666	0.7475	78.6314
Asma/ Reincidencia	1.1111	0.1075	11.4841
Alcoholismo/ Monorresistencia	2.5294	0.3293	19.4304
Alcoholismo/ Polirresistencia	2.3555	0.3950	14.0468
Alcoholismo/ Multidrogorresistencia	2.9	0.2699	31.1512
Alcoholismo/ Sensibilidad	0.7778	0.0757	7.9907
Alcoholismo/ Reincidencia	1.2308	0.1180	12.8373
Desnutrición/ Monorresistencia	0.5375	0.0563	5.1233

Desnutrición/ Polirresistencia	1.5	0.1500	14.9937
Desnutrición/ Multidrogorresistencia	0.7375	0.077	6.9920
Desnutrición/ Sensibilidad	0.5375	0.056	5.1239
Desnutrición/ Reincidencia	17.3333	1.7738	169.3736
Huerfano/ Monorresistencia	1.6398	0.5457	4.9274
Huerfano/ Polirresistencia	0.0924	0.0106	0.8038
Huerfano/ Multidrogorresistencia	1.6970	0.1460	19.7193
Huerfano/ Sensibilidad	0.3542	0.1167	1.0747
Huerfano/ Reincidencia	17.1364	2.0815	141.0802
T1/ Monorresistencia	0.7333	0.2027	2.6526
T1/ Polirresistencia	3.6667	0.7973	16.8633
T1/ Multidrogorresistencia	1.5333	0.1297	18.1319
T1/ Sensibilidad	1.6154	0.4886	5.3402
T1/ Reincidencia	0.1846	0.0221	1.5401
MANU/ Monorresistencia	1.9944	0.1018	14.0193
MANU/ Polirresistencia	1.5	0.1500	14.9937
MANU/ Multidrogorresistencia	3.68	0.3296	41.2202
MANU/ Sensibilidad	5.1765	0.4401	60.8867
MANU/ Reincidencia	SD	SD	SD
X1/ Monorresistencia	0.7333	0.0717	7.4929
X1/ Polirresistencia	2.0370	0.1903	21.7998
X1/ Multidrogorresistencia	5	0.4190	59.6601
X1/ Sensibilidad	12	1.1520	124.9989
X1/ Reincidencia	SD	SD	SD
H3/ Monorresistencia	0.5694	0.0594	5.4589
H3/ Polirresistencia	16.200	2.1709	120.9266
H3/ Multidrogorresistencia	2.37	0.2271	24.8352
H3/ Sensibilidad	0.5694	0.0594	5.4589
H3/ Reincidencia	SD	SD	SD

Se observó que en varios de los análisis se determinaron correlaciones entre los factores evaluados; comenzemos con la comorbilidad de diabetes en la que se determinó un riesgo aumentado de 6.9 veces más de que esos pacientes tengan fallo al tratamiento es decir sean reincidentes y esto puede ser de 1.6 veces más hasta 28.10 veces más. Existen varios reportes en los que se asoció la presencia de diabetes-TB con fallo al tratamiento y aumento en la mortalidad, esto debido a que esta enfermedad crónica contribuye a un incremento de la susceptibilidad del hospedero alterando la vía del complemento, incrementando las citocinas de tipo 1, reduciendo la activación de macrófagos alveolares e incrementando la habilidad de producir citocinas (Delgado-Sánchez G 2015). En un trabajo realizado en el suroeste de México encontraron que existía una relación también de 4.7 veces más riesgo de adquirir tuberculosis MDR cuando se tiene la diabetes mellitus tipo 2 (Pérez-Navarro L 2015)

En relación con el VIH se determinaron 3 correlaciones sin embargo la más destacada fue la de que los pacientes con VIH adquieran polirresistencia es 7.8 veces más comparada con aquellos que no tienen VIH, lo alarmante de esto es que la probabilidad puede aumentar hasta 140.15 veces, cabe mencionar que las correlaciones para esta comorbilidad son siempre con resistencia a antibióticos (monorresistencia, polirresistencia y Multidrogorresistencia). En un estudio realizado en China (Gao y cols 2015) encontraron de igual manera que los pacientes que estaban enfermos de VIH y Tb al mismo tiempo tenían tasas de droga resistencia del 90% comparado con aquellos pacientes que no tenían VIH.

Se evaluó también la presencia de asma en los pacientes y al igual que el factor anterior tuvo 3 correlaciones destacándose la presencia de cepas sensibles en aquellos pacientes asmáticos en los cuales el factor de riesgo es de 7.6 veces más pero puede ser hasta 78.63 veces más según la población estudiada; aun y cuando la correlación más alta se observó con cepas sensibles también se determinó con multidrogorresistencia y polirresistencia. Ya había sido reportado previamente (Matera M y cols 2015) que en pacientes asmáticos es común el uso de esteroides para abrir las vías respiratorias en caso de crisis, esto puede afectar la respuesta inmune sobre todo a las células T y predispone a los pacientes a la infección con Tb,

considerando que las células T son cruciales para los mecanismos de defensa contra la *M.tuberculosis*.

Al evaluar si los pacientes sufrían algún tipo de alcoholismo se encontraron asociaciones moderadas con resistencia a los antibióticos (monorresistencia, polirresistencia y multidrogorresistencia) la asociación mayor fue con multidrogorresistencia ya que se observó el riesgo de sufrirla 2.9 veces más que en aquellos pacientes que no padecían de alcoholismo. En un reporte previo (Volkman y cols 2015) se realizó un análisis de artículos publicados de 1997 . 2012 en el que observaron que aquellos pacientes que consumían alcohol estaba asociado con el desarrollo de desarrollar Tb activa, se a asociado a un mayor índice de transmisión y a desenlaces adversos en el tratamiento es decir que no responden o que tienen una mayor mortalidad esto es debido a que estos pacientes son incapaces de atender las ordenes del tratamiento debido a factores relacionados con el uso de sustancias además la falla en la medicación es posible debido a inmunosupresión y cambios en la farmacocinética causado por el consumo de alcohol.

En nuestra población encontramos también pacientes desnutridos y al realizarles el estudio de riesgo relativo se observó correlación débil con polirresistencia y una relación muy fuerte con los pacientes reincidentes ya que la probabilidad que tengan fallo al tratamiento es de 17.3 veces más pero esta puede aumentar hasta 169.37 veces más comparado con aquellos pacientes que no están desnutridos. Kant y cols en el 2013 realizaron un reporte sobre el significado de la nutrición en la tuberculosis pulmonar demostrando que la tuberculosis puede llevar a una mala nutrición y una mala nutrición puede predisponer a desarrollar tuberculosis ya que la desnutrición lleva a una deficiencia de proteínas y micronutrientes lo cual produce una inmunodeficiencia. Esta inmunodeficiencia secundaria incrementa la susceptibilidad del hospedeiro a la infección y por ende incrementa el riesgo de desarrollar tuberculosis.

Con estos datos se concluyó los factores de riesgo están relacionados con un tipo de resistencia a antibióticos, por lo que se debe de tener especial cuidado y un mayor seguimiento con aquellos que posean estas comorbilidades.

El análisis también se desarrolló para determinar si existía una correlación entre la familia encontrada en el estudio y la resistencia a los antibióticos. La familia con una mayor incidencia fue la de las cepas huérfanas y se determinó que tenía 3 correlaciones: moderada con la monorresistencia y multidrogorresistencia así como una asociación extremadamente fuerte con las muestras reincidentes, siendo que aquellas cepas con este linaje tienen 17.13 veces más de tener fallo al tratamiento el cual puede aumentar hasta 141.08 veces más con respecto a aquellos con un linaje diferente. Un linaje diferente encontrado de igual manera en nuestra población fue el T1 se encontró una relación débil con la multidrogorresistencia y moderada con cepas sensibles, sin embargo la polirresistencia tuvo una asociación fuerte con esta familia de 3.6 veces más riesgo. En la familia MANU se obtuvo una asociación débil con cepas polirresistentes y dos asociaciones fuertes con las muestras multidrogorresistentes con 3.68 veces más riesgo y cepas sensibles con 5.17. Respecto a la familia X1 se obtuvo una relación moderada con las muestras polirresistentes y una relación fuerte con multidrogorresistencia pero la mayor correlación se observó con las muestras sensibles, ya que el que las cepas pertenecientes a esta familia sean sensibles es 12 veces más probable en comparación con aquellas pertenecientes a otra familia. La última familia analizada fue la H3 en ella se observó una correlación moderada con las cepas multidrogorresistencias y una muy fuerte correlación con las muestras polirresistentes ya que el riesgo de tener resistencia a más de un antibiótico se aumenta 16.2 veces y puede ser hasta 120.92 veces más con respecto a otras familias presentes en nuestro estudio

Al analizar los datos cabe resaltar la relación de las cepas huérfanas con el fallo al tratamiento y los T1 y H3 con muestras que tienen resistencia a más de un antibiótico por lo que el determinar el linaje de las cepas es de vital importancia para el seguimiento del tratamiento y probablemente también para la decisión de la antibioticoterapia a seguir para no perder tiempo en tratamientos erróneos.

9.- CONCLUSIONES

- Las muestras del estudio no están relacionadas entre sí ya que al realizar el estudio con ambas técnicas no nos dieron genotipificaciones idénticas en ningún caso.
- Las familias con mayor prevalencia en nuestro estudio fueron los huérfanos y la familia T denominadas nuevas cepas
- En el estudio de correlación se observó la importancia de conocer las comorbilidades y los linajes de las muestras presentes en el estudio ya que los pacientes diabeticos, con VIH, alcoholicos o desnutridos tienen un mayor riesgo de tener fallo al tratamiento o de ser resistentes a más de un antibiótico; de igual manera los linajes huerfanos, T1 y H3.

10.- Perspectivas

- Una vez que ya se estandarizaron las técnicas se podría analizar el occidente del país para obtener más datos sobre las cepas circulantes en el país.
- Realizar seguimiento de contacto de los pacientes para evaluar los casos de contagio entre familias así como en centros de trabajo para llevar un control epidemiológico y dar tratamiento oportuno a este tipo de nuevos pacientes
- Concientizar a la secretaria de salud sobre la importancia de realizar análisis de resistencia a antibióticos a pacientes reincidentes ya que son los que se demostró que tenían mayor resistencia a antibióticos y que eran los que tenían la mayoría de las cepas huerfanas; además de que se observó que en algunas ocasiones la cepa original era diferente a la cepa que se proporcionaba en la segunda ocasión de la visita del paciente pudiendo ser la causa de que la antibioticoterapia no funcione.

11.- BIBLIOGRAFIA



- * Aguilar, C. (2005), “Diabetes y tuberculosis: En el laberinto del subdesarrollo”, Rev Invest Clin, 57 (1): 82-84.

- * Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, et al. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiological methods. N Engl J Med. 1994; 330: 1710-6.

- * Baker, M.A., et al., The impact of diabetes on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review. BMC Med, 2011. 9: p. 81.

- * Bifani, P., et al., *Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis H37Rv/Ra variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain.* J Clin Microbiol, 2000. 38(9): p. 3200-4.

- * Cancino., I. (2013). "Caracterización genotípica (espoligotipado y MIRU-VNTR) de aislados de micobacteria del estado de México y Veracruz" (Tesis de pregrado). Universidad Veracruzana, Xalapa Veracruz.

- * Cardoso Oelemann, M., et al., *The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant Mycobacterium tuberculosis strain lineage from a high tuberculosis burden country.* PLoS One, 2011. 6(3): p. e18256.

- * CDC. *Tuberculosis.* Available from: <http://www.cdc.gov/tb/>.

- * CENAVECE. *Guia para la atención de personas con tuberculosis resistente a fármacos.* 2010.

- * Coros A, DeConno E, Derbyshire K. IS6110, a *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Insertion Sequence, Is Also Present in the Genome of *Mycobacterium smegmatis*. Suggestive of Lateral Gene Transfer among Mycobacterial Species. J Bacteriol.2008, 190(9):3408-3410.



- *Delgado-Sánchez G, et al. "Association of pulmonary tuberculosis and diabetes in México: Analysis of the national tuberculosis registry 2000-2012".Plos One, 2015; 10 (6): 1-14.
- * Elvira-Balcells M, García P, Meza P, Peña C, Cifuentes M, Couvin D, Rastogi N. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by *spoligotyping* and MIRU-VNTRs in Santiago, Chile. Plos One. 2015, 10 (1371), 2-16.
- * Flores-Treviño, S., Morfín-Otero, R., Rodríguez- Noriega, E., González-Díaz, E., Pérez-Gómez, H., Bocanegra- García, V., Vera- Cabrera, L., Garza- González, E. (2015). " Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* from Guadalajara, México and identification of a rare multidrug resistant Beijing genotype". Plos One, 10 (2): 1-11.
- * Gao G y cols. "Drug resistance characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to four first-line antituberculosis drugs from tuberculosis patients with AIDS in Beijing, China". Science direct, 45 (2): 124-129.
- * García-García ML, Ponce de León A, Jimenez-Corona ME, Jiménez-Corona A, Palacios-Martínez M, Balandrano-Campos S, et al. Clinical consequences and transmissibility of tuberculosis in southern Mexico. Arch Intern Med 2000; 160:630-6.
- * García-Pachón E., and Rodríguez J.C. Epidemiología molecular de la tuberculosis: principales hallazgos y su aplicación en España. Arch Bronconeumol, 2005, 41(11): p. 618 - 624.
- * Green, E., et al., *IS6110* restriction fragment length polymorphism typing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from northeast South Africa. J Health Popul Nutr, 2013. 31(1): p. 1-10.
- * Hu, Y., et al., Extensive transmission of isoniazid resistant *M. tuberculosis* and its association with increased multidrug-resistant TB in two rural counties of eastern China: a molecular epidemiological study. BMC Infect Dis, 2010. 10: p. 43.

- * Huang, S.F., et al., Association of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes and clinical and epidemiological features - a multi-center study in Taiwan. *Infect Genet Evol*, 2012. **12**(1): p. 28-37.

- * Kant, S., Gupta, H. and Ahluwalia, S. "Significance of nutrition in pulmonary tuberculosis". *Critical reviews in food science and nutrition*, (2015). 55 (7): 955-963.

- * Kennedy, B., et al., Multi-drug resistant tuberculosis: experiences of two tertiary referral centres. *Ir Med J*, 2011. **104**(6): p. 182-5.

- * Kremer, K., et al., Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(8): p. 2607-18.

- * Kumar, A., Jain, D., Satyanarayana, S., Zachariah, R., Harries, A. (2013), "Screening of patients with tuberculosis for diabetes mellitus in India", *TM y IH*, 0 (0): 1-9.

- * López-Alvarez, R., Badillo-López, C., Cerna-Cortes, J., Castillo-Ramirez, I., Rivera-Gutierrez, S., Helguera-Repetto, A., Aguilar, D., Hernández-Pando, R., Samper, S., Gonzalez y Merchand, J. (2010). "First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance", *10* (82): 1-12.

- * López- Rocha, E., Juárez-Alvarez, J., Riego-Ruiz, L., Enciso-Moreno, L., Ortega- Aguilar, F., Hernández-Nieto, J., Enciso-Moreno, J., López-Revilla, R. (2013). "Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in San Luis Potosí, México", *6* (172): 1-11.

- * Luciani, F., A.R. Francis, and M.M. Tanaka, Interpreting genotype cluster sizes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates typed with IS6110 and spoligotyping. *Infect Genet Evol*, 2008. **8**(2): p. 182-90.

* Martínez- Guarneros, A., Rastogi, N., Escobar-Gutierrez, A., Goncalves, L., Vazquez-Chacón, C., Rivera-Gutierrez, S., Lozano, D., Vergara-Castañeda, A., Gonzalez y Merchand, J., Vaughan, g. (2013). "Genetic diversity among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in México", 14 (2013): 434-443.

* Matera, M.G., Cardaci, V., Cazzola, M and Rogliani, P. "Safety of inhaled corticosteroids for treatin chronic obstructive pulmonary disease". (2015). 14 (4) : 533-541.

* Merza, M.A., et al., The most predominant spoligopatterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates among Iranian, Afghan-immigrant, Pakistani and Turkish tuberculosis patients: a comparative analysis. *Chemotherapy*, 2010. **56**(3): p. 248-57.

* Molina-Torres, C.A., et al., *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *J Clin Microbiol*, 2010. **48**(2): p. 448-55.

* Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis. Achievemens and challenges to current knowledge. *Bull World Health Organ*. 2002;80:477-82.

* Nava-Aguilera E, López-Vidal Y, Harris E, Morales-Pérez A, et al. Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* Cases in Acapulco *Spoligotyping* and Risk Factors. *Clinical and Developmental Immunology*.2011, 2011: 1-12.

* Nava-Aguilera, E., López-Vidal, Y., Harris, E., Morales-Pérez, A., Mitchell, S., Flores-Moreno, M., Villegas-Arrizón, A., Legorreta-Soberanis, J., Ledogar, R., Anderson, N. (2010). "Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* cases in Acapulco: *Spoligotyping* and risk factors", *Clinical and Developmental Immunology*, 2011: 1-12.

* Orduz, M., Ribón, W. (2015)9. "Molecular epidemiology of tuberculosis". *INTECH*, 10: 43-64.

* Osorio, N.S., et al., Evidence for Diversifying Selection in a Set of *Mycobacterium tuberculosis* Genes in Response to Antibiotic- and Nonantibiotic-Related Pressure. *Mol Biol Evol*, 2013. **30**(6): p. 1326-36.



- * Palmer A, Kishony R. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Genet.* 2013, 14: 243-248.
- * Pérez-Navarro L., et al. "Type 2 diabetes mellitus and its influence in the development of multidrug resistance tuberculosis in patients from southeastern México. *Journal of diabetes and its complications.* 2015, 29: 77-82.
- * Petroff S.A. A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. 1915 From the Adirondack Cottage Sanitarium, Trudeau.
- * Pitondo-Silva, A., et al., Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*, 2013. **93**(1): p. 42-8.
- * Reporte anual de CENAPRECE, consultado el 17 de mar. de 2015 en la página www.cenaprece.salud.gob.mx.
- * Ruiz M, Navarro JF, Rodríguez JC, Larrosa JA, Royo G. Effect of clinical and socio-economic factor on the rate of clustering of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Elche (Spain). *Epidemiol Infect.* 2003; 131: 1077-83.
- * Said, H.M., et al., Molecular characterization and second-line antituberculosis drug resistance patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis isolates* from the northern region of South Africa. *J Clin Microbiol*, 2012. **50**(9): p. 2857-62.
- * Schiaffino, A., et al. ¿Odds ratio o razón de proporciones? Su utilización en estudios transversales. *Gac Sanit*, 2003; 17 (1): 70-4.
- * Small, P.M., et al., *The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods.* *N Engl J Med*, 1994. **330**(24): p. 1703-9.

- * Spicknall, I.H., et al., *A Modeling Framework for the Evolution and Spread of Antibiotic Resistance: Literature Review and Model Categorization*. Am J Epidemiol, 2013.
- * Stoffels, K., et al., *From multidrug- to extensively drug-resistant tuberculosis: upward trends as seen from a 15-year nationwide study*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63128.
- * Supply, P., et al., Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(12): p. 4498-510.
- * Thierry, D., Brisson-Noel, A., Lévy-Frebault, V., Nguyen, S., Luc, J., Gicquel, B. (1990). "Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis", J. Clin. Microbiol, 28 (12): 2668 - 2673.
- * Van Embden J, Cave M.D, Crawford J., et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendation for a Standardized Methodology. J Clin Microbiol. 1993, 31(2):406-409.
- * Van Soolingen D, Borgdorff MW, De Haas PE, Sebek MM, Veen J, Dessens M, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in The Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. J Infect Dis. 1999; 18:726-36.
- * Varma-Basil, M., et al., "Comparison of spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive units typing and IS6110-RFLP in a study of genotypic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Delhi, North India". Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011. **106**(5): p. 524-35.
- * Volkmann, T., Moonan, P.K., Miramontes, R and Oeltmann, J.E. "Tuberculosis and excess alcohol use in the United States 1997-2012".(2015), The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 19 (1): 111-119.
- * WHO, *Tuberculosis new and relapse cases*. 2011.

