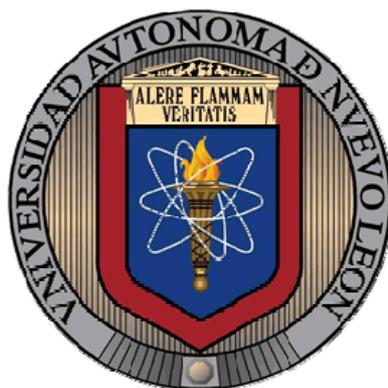


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS COMO
MÉTODO DE GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
*Mycobacterium tuberculosis***

Por

M en C. JUAN FLORES GRACIA

Como Requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
con Especialidad en Biotecnología

Octubre 2009

POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS
COMO MÉTODO DE GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium tuberculosis



Comité de Tesis

DR. JOSÉ MARÍA VIADER SALVADÓ
Director de la Tesis

DRA. MARTHA GUERRERO OLAZARÁN
Secretario

DR. LUIS J. GALÁN WONG
Vocal 1

DRA. LILIA H. MORALES RAMOS
Vocal 2

DRA. MA. DEL SOCORRO FLORES GONZÁLEZ
Vocal 3

Dra. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ
Subdirectora de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. José María Viader Salvadó y a la Dra. Martha Guerrero Olazarán por permitir compartir con ellos una gran amistad y unos cuantos pasos en este gran camino del conocimiento.

A la Dra. Carmen Amelia Molina Torres por su amistad y especial colaboración durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Lucio Vera Cabrera por haberme permitido realizar parte del trabajo en su Laboratorio.

A las Dras. Isela Quintero Zapata y Miriam Elías Santos por sus valiosas aportaciones como tutoras durante este tiempo.

Un sincero y especial agradecimiento al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña por su amistad y gran atención de siempre.

Al CONACYT y a la Dirección General de Educación Superior Tecnológica por todos los apoyos otorgados durante el presente trabajo.

A la Administración del ITCV por todas las facilidades que se me proporcionaron para la obtención de este grado.

DEDICATORIA

A Dios por concederme la vida.

A mis padres por la oportunidad de vivir y de enseñarme el valor de la responsabilidad.

A mi esposa Alma Luz y mis hijos María Fernanda y Juan Ricardo por su total apoyo y comprensión durante el tiempo dedicado a este trabajo.

A mis hermanos por su total apoyo e interés durante todo el trayecto de mis estudios.

Área de Trabajo

El presente trabajo titulado ‘‘POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS COMO MÉTODO DE GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis*’’ se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (L5) del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., bajo la dirección del Dr. José María Viader Salvadó y la Co-Dirección de la Dra. Martha Guerrero Olazarán, en el Área de Diagnóstico Molecular del Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Tamaulipas, en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, Monterrey, N.L. y en el Área de Micobacterias del Laboratorios Estatal de Salud Pública de Tamaulipas.

Parte del presente trabajo ha sido presentado en forma de cartel en el siguiente congreso

- **XXXII Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología clínica**

‘‘Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados como método de genotipificación de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*’’
(Flores-Gracia J; Molina-Torres C. A.; Vera-Cabrera L.; Guerrero-Olazarán M.; Viader-Salvadó J. M.) Marzo 2007.

Además ha sido publicado en el **Journal of Microbiological Methods** (José M. Viader-Salvadó, Juan Flores-Gracia, Agustina S. Vega-Alonso, Víctor M. Treviño-Alvarado, Carmen A. Molina-Torres, Lucio Vera-Cabrera, Martha Guerrero-Olazarán. 2009. Simplified amplified-fragment length polymorphism method for genotyping *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Microbiological Methods* 78: 331–338

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
ÁREA DE TRABAJO.....	v
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
NOMENCLATURA.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS.....	3
3.1 Objetivo General.....	3
3.2 Objetivos específicos.....	3
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 Taxonomía y características generales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
4.2 La Tuberculosis y la problemática de salud mundial.....	6
4.3 Diagnóstico.....	8
4.4 Caracterización de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
4.5 Análisis de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
4.6 Características del elemento IS6110.....	15
4.7 Limitaciones del método de RFLP–IS6110.....	15
4.8 Marcadores genéticos alternativos para la tipificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
4.9 Métodos moleculares para la tipificación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ...17	
4.10 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados o AFLP.....	19
4.10.1 Características del método de AFLP.....	19
4.10.2 El método de AFLP y su apoyo en la tipificación molecular.....	21
4.10.3 El método de AFLP y su comparación con otros métodos de tipificación molecular.....	21
4.10.4 Aplicación del método de AFLP.....	23
4.10.5 AFLP como método de genotipificación de <i>M. tuberculosis</i>	24

5 MÉTODOS.....	25
5.1 Reactivos y material biológico.....	25
5.2 Equipos.....	27
5.3 Estrategia general.....	28
5.4 Aislamiento del ADN.....	29
5.5 AFLP simplificado.....	31
5.5.1 Digestión del ADN.....	31
5.5.2 Preparación del adaptador XA.....	31
5.5.3 Ligación del adaptador a los fragmentos de restricción.....	31
5.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa.....	32
5.5.5 Reproducibilidad del método de AFLP simplificado.....	33
5.6 Análisis del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción de IS6110 (RFLP-IS6110).....	33
5.6.1 Digestión del ADN, gel de agarosa y transferencia a la membrana.....	33
5.6.2 Obtención de la sonda para IS6110.....	35
5.6.2.1 Síntesis de la sonda para IS6110.....	35
5.6.2.2 Purificación de la sonda para IS6110.....	36
5.6.3 Marcaje de las sondas para IS6110 y marcador de tamaño molecular.....	37
5.6.4 Revelado de la membrana.....	37
5.7 Análisis de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i> mediante el método de AFLP simplificado y RFLP-IS6110.....	38
5.8 Análisis numérico para la comparación de los métodos de genotipificación.....	39
5.9 Índices de similitud de los dos métodos de genotipificación.....	39
5.10 Análisis de agrupamiento de muestras.....	40
5.11 Grupos de muestras, información de los pacientes y susceptibilidad a drogas antituberculosas.....	40
5.12 Distribución de bandas teóricas de AFLP y RFLP-IS6110 en el genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	41
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Banco de ADN de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i> del Estado de Tamaulipas.....	42
6.2 Implementación de los métodos de AFLP simplificado y RFLP-IS6110.....	43
6.3 AFLP simplificado y RFLP-IS6110 de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i> del Estado de Tamaulipas.....	45
6.4 Poder de discriminación de muestras y tipos de patrones de AFLP y RFLP.....	52
6.5 Índices de similitud de pares de muestras obtenidos a partir de los patrones de AFLP y RFLP-IS6110.....	52
6.6 Análisis de agrupamiento de muestras de los aislamientos clínicos en base a los patrones de bandas de AFLP y RFLP-IS6110.....	57
6.7 Correlación de los grupos de muestras de los tipos de patrones de AFLP y RFLP con la información de los pacientes estudiados.....	61
6.8 Comparación de la distribución de bandas teóricas de AFLP y RFLP-IS6110 en el genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	63
7 DISCUSIÓN.....	65
8 CONCLUSIONES.....	75

APÉNDICE.....	77
LITERATURA CITADA.....	82
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	103

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
I	Tamaños moleculares de las bandas obtenidas por AFLP simplificado a partir de la cepa de referencia <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	46
II	Vectores binarios de 24 dimensiones obtenidos para el patrón de bandas de 52 aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i> por AFLP simplificados	49
III	Vectores binarios de 32 dimensiones obtenidos para el patrón de bandas de 52 aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i> por el método de RFLP-IS6110	52
IV	Matriz de similitud con índices de Jaccard entre pares de muestras obtenidos a partir de los patrones de AFLP simplificado en 52 aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	54
V	Matriz de similitud con índices de Jaccard entre pares de muestras obtenidos a partir de los patrones de RFLP-IS6110 para 52 aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	55
VI	Comparación de los dos análisis de agrupamiento de muestras obtenidos por AFLP simplificado y RFLP-IS6110	62

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Representación esquemática de la estrategia general	29
2	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE del ADN genómico obtenido de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	44
3	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE de los ensayos de AFLP simplificado en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	45
4	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE de los ensayos de AFLP simplificado de <i>P. aeruginosa</i> y de <i>E. coli</i>	47
5	Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en TBE de 30 ensayos de AFLP simplificado de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	48
6	Tipificación molecular mediante RFLP-IS6110 a partir de muestras de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	51
7	Histograma de frecuencias de los 1326 índices de similitud entre pares de muestras obtenidos por el método de AFLP y RFLP-IS6110	56
8	Correlación entre los índices de similitud de los dos métodos de genotipificación	57
9	Comportamiento de los índices de similitud al cambiar el criterio de igualdad de similitud	58
10	Dendrograma de los agrupamientos de cepas obtenidos por el método de AFLP simplificado en 52 muestras de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	60
11	Dendrograma de los agrupamientos de cepas obtenidos por el método de RFLP-IS6110 en 52 muestras de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	61
12	Histograma de porcentaje de frecuencias de la secuencia de inserción IS6110 y porcentaje de los fragmentos teóricos de tamaño molecular entre 100 y 1500 pb obtenidos mediante AFLP	65

NOMENCLATURA

%	Porcentaje
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
°C	Grados Celsius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
et al.	Et alii (y otros)
g	Gramos
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
IS6110	Secuencia de inserción 6110
kpb	Kilo pares de bases = mil pares de bases
L	Litro
LUV	Luz ultravioleta
M	Concentración molar
mg	Miligramos
µg	Microgramo
min	Minutos
mL	Mililitros
µL	Microlitro
mM	Concentración Milimolar
µM	Micromolar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de iones hidrógeno
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SSC	Amortiguador de cloruro de sodio y citrato de sodio
TAE	Tris-HCl, Ácido acético, EDTA
Taq-polimerasa	DNA polimerasa obtenida de <i>Thermophilus aquaticus</i> . Enzima encargada de construir nuevas cadenas de ADN
TE	Regulador Tris-HCl, EDTA
Tris	Trizma ó tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades
v/v	Mezcla volumen sobre volumen
X	Número de veces la concentración
X g	Número de veces la fuerza gravitacional

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el método simplificado del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y se comparó con el método de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de la secuencia de inserción IS6110 (RFLP-IS6110) empleando 52 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos en Tamaulipas. El análisis por AFLP generó un total de 24 bandas de tamaños comprendidos entre 1537 a 121 pb, y 52 diferentes patrones de bandas, con un mínimo de 2 y un máximo de 13 bandas. El análisis por RFLP-IS6110 generó 32 bandas de tamaños comprendidos entre 1 y 12 kpb, y 52 diferentes patrones de bandas con un mínimo de 3 y un máximo de 15 bandas. Por lo tanto, ambos métodos de genotipificación mostraron un poder de discriminación de muestras del 100%. Una comparación de los 1326 índices de similitud de pares de muestras calculados para cada método de genotipificación mostró una total ausencia de correlación entre los índices de similitud de los dos métodos. El método simplificado de AFLP se espera que sea de mayor utilidad para genotipificar aislamientos de *M. tuberculosis* que el método de RFLP-IS6110, ya que el primero evalúa variaciones genéticas a través de todo el genoma de *M. tuberculosis*. Además, la relativa rapidez, bajo costo, reducción de tiempo debido a la pequeña cantidad de ADN necesario y el uso de sólo una enzima de restricción, un adaptador de doble cadena, un iniciador de PCR, y un sistema sencillo de detección, demuestran cómo este método de AFLP simplificado compite favorablemente con el método de RFLP-IS6110 o métodos convencionales AFLP. El método simplificado de AFLP, por tanto, resulta como una muy buena opción en la genotipificación de aislamientos de *M. tuberculosis*, especialmente en los países en desarrollo o cuando es usado como método de tamizaje inicial.

ABSTRACT

A simplified amplified-fragment length polymorphism (AFLP) method was developed and applied to genotype 52 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. This method can be carried out using only one restriction enzyme (*Xho*I), one double strand adapter, and one PCR primer. AFLP analysis of the isolates generated a total of 24 differently sized bands ranging from 1537 to 121 bp, and 52 different band patterns, with a minimum of 2 and a maximum of 13 bands. The results were compared with the well-established IS6110 restriction fragment length polymorphism (IS6110-RFLP) typing method, which rendered a total of 32 differently sized bands from 1 to 12 kbp, and 52 different band patterns, with a minimum of 3 and a maximum of 15 bands. Therefore, both genotyping methods showed a discriminatory power of samples of 100%. Nevertheless, pairwise comparisons of the 1326 similarity indexes calculated for both typing methods showed a total absence of correlation between the similarity indexes of the two methods. The simplified AFLP method is expected to be more useful for genotyping *M. tuberculosis* isolates compared to the IS6110-RFLP method, since the former evaluates genetic variations throughout the *M. tuberculosis* genome. Furthermore, the relatively rapid and low-cost simplified AFLP method compares favorably to the IS6110-RFLP or conventional AFLP methods, and shows great promise for genotyping *M. tuberculosis* isolates, especially in developing countries or for preliminary screening.

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico causante de la tuberculosis, y que aproximadamente 9 millones de personas desarrollan la enfermedad cada año, siendo la mortalidad mundial por tuberculosis de 3 millones de personas al año (OMS, 1996; Raviglione, 2001). Se considera que una cuarta parte de las defunciones por tuberculosis pueden llegar a ser evitadas en Países en desarrollo, que es donde se presenta el 95% de los casos. El 75% de los casos de tuberculosis se sitúan dentro de la edad económicamente productiva; o sea entre los 15-50 años (OMS, 1996).

En la década de los 80's se observó un notable incremento en la incidencia de la tuberculosis sin importar el desarrollo económico de casa País, por lo que la OMS declaró por primera vez a la tuberculosis como un problema de salud global emergente (Suffys *et al.*, 1997).

El estudio del agente causante de la tuberculosis a partir de técnicas moleculares ha permitido la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis*. Uno de los métodos moleculares más aceptados internacionalmente se basa en el estudio de las repeticiones de la secuencia de inserción IS6110 en el genoma de *M. tuberculosis*, lo cual ha permitido el desarrollo de un método de tipificación molecular llamado polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción para IS6110 (RFLP-IS6110) (Van Embden *et al.*, 1993). Este método de tipificación molecular ha sido utilizado ampliamente en estudios de infecciones intrahospitalarias, detección de cepas multiresistentes a drogas (MDR), infecciones cruzadas y falsos positivos, y en epidemiología molecular (Martín, 1996; Van Soolingen y Hermans, 1995). En los

últimos años se han desarrollado nuevos métodos para la tipificación molecular de *Mycobacterium tuberculosis* con el fin de suplir algunos de los inconvenientes que resultan al aplicar el método de RFLP-IS6110, como son: la gran cantidad de tiempo necesario para llevar a cabo el procedimiento de RFLP-IS6110, la alta cantidad de ADN requerida para el mismo, lo cual es difícil debido al lento crecimiento del microorganismo, y el alto costo del procedimiento debido fundamentalmente a la técnica de hibridación aplicada. Estos nuevos métodos moleculares tienen como base la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, la cual requiere de una menor cantidad de ADN y permite emplear métodos de detección sencillos (Kremer, 1999, Supply, 2001).

Al comparar el método de RFLP-IS6110 contra los métodos basados en PCR, en general se demostró que en el método de RFLP existen problemas importantes de reproducibilidad y/o poder de discriminación, resultando mejores los métodos que utilizan PCR. Los métodos desarrollados de tipificación molecular basados en la PCR son el PCR con mezclas de adaptadores (Mixed-Linker PCR), la tipificación a través de las unidades repetitivas intraespaciadas de micobacterias (MIRU) y elementos repetitivos en tándem de número variable (VNTR), llamado también MIRU/VNTR typing, y la tipificación con oligonucleótidos espaciadores del elemento de inserción DR (Spoligotyping). Estos tres métodos son los más recomendados para una tipificación molecular reproducible y con alto poder de discriminación. Sin embargo, todos ellos son métodos laboriosos y difíciles de implementar como método de rutina en un laboratorio de micobacteriología.

2. HIPÓTESIS

El método de AFLP simplificado presenta un mayor poder de discriminación para realizar genotipificaciones en *M. tuberculosis* que el método de RFLP de IS6110.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la aplicación de un método de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) simplificado como método de genotipificación de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras del Estado de Tamaulipas.

3.2 Objetivos específicos

1. Establecer un banco de ADN de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* del Estado de Tamaulipas.
2. Implementar un método de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) simplificado y el método de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de la secuencia de inserción IS6110.
3. Aplicar el método de AFLP simplificado y RFLP-IS6110 a aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* del Estado de Tamaulipas.
4. Comparar el poder de discriminación de los dos métodos de genotipificación y definir los tipos de patrones de AFLP y RFLP obtenidos.

5. Comparar los índices de similitud de pares de muestras obtenidos a partir de los patrones de AFLP con los de RFLP.
6. Clasificar y comparar los aislamientos clínicos en base a los patrones de AFLP y RFLP agrupados en grupos de muestras con patrones similares.
7. Correlacionar los grupos de muestras con la información de los pacientes estudiados.
8. Comparar la distribución de bandas teóricas de AFLP y RFLP-IS6110 en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

4. ANTECEDENTES

4.1 Taxonomía y características generales de *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis pertenece al género *Mycobacterium*, de la familia *Mycobacteriaceae* y del orden Actinomycetales. *M. tuberculosis* también pertenece al complejo tuberculosis, donde además se encuentran *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti* (Grange, 1996).

Los bacilos tuberculosos presentan generalmente forma filamentosa que varían en ancho de 0.2 a 0.5 μm y de longitud de 1 a 4 μm . Estos bacilos son inmóviles, aerobios estrictos, no esporulan, ni forman cápsulas, y son resistentes a la decoloración alcohol-ácido cuando son teñidos con fucsina básica fenicada (tinción de Ziehl-Neelsen), apreciándose un color rojo sobre un fondo azul (Britton *et al.*, 1994).

Una de las características en *Mycobacterium tuberculosis* es su lento desarrollo, ya que presenta un tiempo de duplicación de 18 horas. Esta es la razón por la cual los cultivos de *M. tuberculosis* en muestras biológicas deben llevarse a cabo durante 7 a 8 semanas de incubación antes de considerarlos como negativos.

En la pared celular de las micobacterias se encuentra una macromolécula rica en complejos lipídicos, siendo los componentes más importantes los ácidos micólicos, ceras y fosfátidos (García-Rodríguez, 1987). Estos lípidos pueden alcanzar hasta el 60% del peso seco de la pared celular siendo una característica distintiva de las micobacterias que determina la gran resistencia a la coloración y a la digestión intracelular por macrófagos. Además el carácter hidrofóbico de estos lípidos genera una tendencia a la aglutinación durante su el crecimiento celular y proporciona a la micobacteria una resistencia a la desecación, la cual es una

condición muy importante para la transmisión de la tuberculosis, ya que permite la sobrevivencia de la micobacteria en expectoraciones secas.

4.2 La Tuberculosis y la problemática de salud mundial

Durante mucho tiempo la tuberculosis ha sido uno de los principales problemas de salud en los Países subdesarrollados en donde se llegan a presentar el 95% de los casos y el 98% de las muertes. Recientemente la tuberculosis se ha asociado a un deterioro en los programas de salud social y a los movimientos migratorios. Además, la tuberculosis se presenta mayoritariamente en regiones y poblaciones de un bajo nivel socioeconómico y en general ésta persiste y se incrementa entre algunos grupos sociales como ancianos, personas desamparadas sin hogar, personas retenidas en correccionales y en infectados con VIH (Jereb *et al.*, 1993; Rabiglione *et al.*, 1996; WHO, 1994). Todas estas condiciones han permitido un marcado incremento en el número y gravedad de los casos de tuberculosis alrededor del mundo (Cole y Telenti, 1995).

La OMS ha reportado que en 1990 aproximadamente un tercio de la población mundial se encontraba infectada con *Mycobacterium tuberculosis* presentándose en ese mismo año unos 8 millones de nuevos casos y estimando que para finales del siglo XX, la mortalidad relacionada con la tuberculosis podría alcanzar a 3.5 millones de personas. (OMS, 1996; Raviglione, 2001; WHO, 1992).

La aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a las drogas ha resultado uno de los problemas más relevantes. La continua dispersión de cepas de *M. tuberculosis* multidrogoresistentes (MDR) ha limitado el tratamiento eficaz en muchos países subdesarrollados debido a un tratamiento inadecuado de la enfermedad. Esto incluye problemas en los procedimientos para controlar la

infección y pruebas diagnósticas y de susceptibilidad acertadas, las cuales requieren de mucho tiempo para llevarse a cabo, además de ser costosas.

Al realizar un estudio sobre la presencia cepas MDR en pacientes con tuberculosis, en 1997 la OMS junto con la unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades respiratorias (UICTER) demostró que éstas se presentaban en el 2 al 14% de los casos estudiados, y se delimitaron áreas geográficas en donde la resistencia era tanto a isoniacida como a rifampicina, que son los antimicrobianos más eficientes en el tratamiento contra la tuberculosis (Drobniewski y Wilson, 1998; Pablos-Méndez *et al.*, 1998; Sheldon *et al.*, 1995 WHO, 1997). La presencia de cepas MDR ha sido demostrada en Estados Unidos de Norte América, al aislar una cepa llamada “W” que presentó resistencia a 7 antimicrobianos (Dooley *et al.*, 1992; Frieden *et al.*, 1996).

La epidemia causada por el VIH ha resultado el factor más importante de riesgo para los pacientes infectados con *M. tuberculosis* (Styblo y Enarson, 1991). Esta correlación podría ser determinante para la epidemiología a largo plazo (Leowski y Miller, 1992; Selwyn *et al.*, 1989). Además, esta condición ha facilitado que la tuberculosis pase a una forma activa, pero no se ha demostrado que se incremente la susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis* (Jereb *et al.*, 1993). Así mismo la infección causada por VIH puede incrementar el riesgo de que una persona pueda contraer tuberculosis primaria y que presente tuberculosis activa o bien una tuberculosis latente. El 10% de casos de tuberculosis latente con VIH pueden desarrollar una tuberculosis activa, mientras que el 5% de casos de tuberculosis latente de personas con un sistema inmune normal desarrollan tuberculosis activa (Selwyn *et al.*, 1989; Smith y Moss, 1994). *Mycobacterium tuberculosis* es probablemente el patógeno oportunista más común en personas con

SIDA, aunque las micobacterias no tuberculosas también se presentan con alta frecuencia (Horsburgh y Pozniak, 1993).

4.3 Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis

El diagnóstico microbiológico de *Mycobacterium tuberculosis* se basa en la detección del microorganismo por microscopía mediante la tinción de Ziehl Neelsen o la técnica de Truant y por el cultivo de muestras clínicas. Para el cultivo es necesario llevar a cabo una descontaminación de las muestras ya que su cultivo requiere de varias semanas. Para la descontaminación se puede utilizar el método de Petroff que utiliza hidróxido de sodio como descontaminante y homogeneizante.

El cultivo o aislamiento de las micobacterias se realiza principalmente en medios sólidos como son el medio Lowestein-Jensen y los medios de Middlebrook 7H10 y 7H11, todos con agar como soporte. Se requiere de un proceso de incubación largo para demostrar la presencia o ausencia de colonias (Heifets, 1997; Fadda y Sanguinetti, 1998).

Para la identificación de *M. tuberculosis* se realiza una observación de las colonias, y se determina la velocidad de crecimiento y pruebas bioquímicas. Debido al incremento de micobacterias-MDR, se hace cada vez más necesario llevar a cabo pruebas de susceptibilidad a las drogas, aunque los métodos tradicionales son muy tardados.

Considerando la gran problemática relacionada con el cultivo e identificación de las micobacterias, se han desarrollado una serie de métodos alternativos para el diagnóstico a partir de muestras clínicas, siendo el método radiométrico una opción importante. Este método consiste en el cultivo del microorganismo en un medio líquido que contiene un sustrato (ácido palmítico C¹⁴) con carbono radioactivo y la

micobacteria al metabolizarlo produce dióxido de carbono radioactivo, el cual se mide con un contador de radiaciones (BACTEC 460 Tb) (Shinnick y Good, 1994; Siddiqui *et al.*, 1981). Con este método la detección del crecimiento micobacteriano se puede realizar en 7 a 14 días. Otra opción es realizar un procedimiento de hibridación de ácidos nucleicos empleando un sistema comercial llamado AccuProbe (GenProbe, EE.U.) (Shinnick y Good, 1995).

Actualmente existen una gran variedad de metodologías para el diagnóstico de *M. tuberculosis* basadas en la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos como lo son la PCR (Clarridge *et al.*, 1993; Eisenach *et al.*, 1990), amplificación de ARN (Jonas *et al.*, 1993), y la amplificación por reacción en cadena de la ligasa (Ausina *et al.*, 1997; Iovannisci *et al.*, 1993). Dos ejemplos de estos sistemas son Amplicor MTB de Roche Molecular Systems, Estados Unidos, y E-MTD Test de Gen-Probe, Estados Unidos, en los cuales a partir de muestras de expectoración se pueden tener resultados en horas.

Para la determinación de la susceptibilidad a drogas se han desarrollado métodos rápidos como el sistema radiométrico BACTEC 460 Tb (Fadda y Sanguinetti, 1998), métodos que detectan el consumo de oxígeno en presencia de reactivos fluorescentes, y el sistema MGIT (Badak *et al.*, 1996; Hanna *et al.*, 1999; Palomino *et al.*, 1999; Pfyffer *et al.*, 1997; Reisner *et al.*, 1995; Walters y Hanna, 1996), entre otros. También se ha utilizado la reacción en cadena de la polimerasa unido al polimorfismo conformacional de cadena simple o PCR-SSP (siglas en inglés) (Felmlee *et al.*, 1995; Predorius *et al.*, 1996; Scarpellini *et al.*, 1997; Sreevatsan *et al.*, 1998; Telenti *et al.*, 1993); la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (Plikaytis *et al.*, 1994); la hibridación en fase sólida INNOLiPA de Innogenetics NV, Bélgica (Cooksey *et al.*, 1997; de Beenhouwer *et al.*, 1999;

Gamboa *et al.*, 1998; Rossau *et al.*, 1997); y ensayos de microarreglos de ADN (Troesch *et al.*, 1999).

4.4 Caracterización de *Mycobacterium tuberculosis*

La caracterización de *Mycobacterium tuberculosis* ha constituido durante mucho tiempo un gran problema, por lo que se han estado desarrollando métodos que permiten diferenciar cepas de los pacientes enfermos.

Un primer método molecular para la caracterización de *M. tuberculosis* fue el análisis de restricción de ADN, que permitió comparar los fragmentos del cromosoma bacteriano de *M. tuberculosis* separados por electroforesis. Este procedimiento fue aplicado en la diferenciación de cepas nativas y de referencia (Collins y de Lisle, 1984), así como también para diferenciar los miembros del complejo tuberculosis. Así surgió la aplicación de la técnica de electroforesis en campo pulsante que permite una mejor interpretación de los resultados pero con la limitante de generar pocos patrones y el alto costo de los equipos empleados (Varnerot *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1992).

El estudio de la secuencia del ADN del cromosoma de *M. tuberculosis* ha permitido generar información muy valiosa, ya que se ha logrado detectar una serie de elementos repetitivos específicos que han ayudado a desarrollar métodos para la caracterización molecular y epidemiológica de *M. tuberculosis*. A partir de esto, surge el método de análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de la secuencia IS6110 o RFLP-IS6110 (por sus siglas en inglés). Este método se basa en el principio de análisis de fragmentos restricción que hibridan con una sonda de ADN específica para la secuencia de inserción IS6110, generando un

patrón de bandas característico para una cepa de *M. tuberculosis* determinada (van Embden *et al.*, 1993).

4.5 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción de *Mycobacterium tuberculosis*

El desarrollo del método de RFLP-IS6110 se llevó a cabo por Dick Van Soolingen quien al descubrir una secuencia repetitiva en el ADN de *M. tuberculosis* la utilizó como una sonda para realizar un análisis de RFLP de cepas de *M. tuberculosis* obtenidas en Holanda. En este estudio se obtuvieron por primera vez patrones de bandas idénticos a partir de cepas de diferentes pacientes (Sebec, 2000). Estos resultados fueron de gran relevancia para el estudio de la epidemiología de *M. tuberculosis* tanto en brotes locales como en estudios globales (Hermans *et al.*, 1990; Kiers *et al.*, 1997; Van Soolingen *et al.*, 1991).

El método de RFLP-IS6110 consiste en el aislamiento de las micobacterias de un cultivo puro, extracción del ADN cromosomal de alta pureza, y digestión del ADN con una enzima de restricción que presenta un sitio de corte único dentro de la secuencia de inserción IS6110, por ejemplo *PvuII*. Los fragmentos obtenidos son separados mediante electroforesis para posteriormente ser transferidos a una membrana de hibridación, la cual se hibrida con una sonda específica para la región IS6110 marcada por quimioluminiscencia. El revelado por autoradiografía muestra un patrón de bandas característico para una cepa determinada (Chevrel-Dellagi *et al.*, 1993; Hayward, 1995; Van Embden *et al.*, 1993). Este método de RFLP-IS6110 ha sido utilizado para llevar a cabo una tipificación molecular de *M. tuberculosis* en estudios intrahospitalarios, epidemiológicos y para detectar contaminación cruzada en un laboratorio (Martín, 1996; Van Soolingen y Hermans, 1995).

El método de RFLP-IS6110 ha sido utilizado ampliamente para tratar de comprender la transmisión de la tuberculosis en procesos de epidemiología molecular, convirtiéndose en una herramienta muy valiosa. De entre sus aplicaciones se incluyen:

- El seguimiento de cepas individuales de alto interés por ser multidrogo resistentes o por su inefectividad, las cuales adquieren una mayor importancia debido a la asociación con la pandemia del VIH (Bifani *et al.*, 1996; de Boer y Van Soolingen, 2000; Fletcher, 2001; Yang *et al.*, 1994, 1995, Raviglione, 1996).
- Estudios de epidemiología en áreas urbanas para monitorear la importancia de los programas de prevención y control para la disminución de la transmisión de la tuberculosis en la sociedad (Genewein *et al.*, 1993; Suffys *et al.*, 1997). Esta aplicación ha permitido correlacionar y evaluar factores de riesgo como la edad, raza y clase social, entre otros (Alland *et al.*, 1994; Borgdorff *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 1998; Samper *et al.*, 1998; Small *et al.*, 1994; Van Deutekom *et al.*, 1997).
- Análisis de primo infecciones o infecciones recurrentes, lo cual ha permitido comprender mejor el fenómeno de la transmisión de la tuberculosis, así como ubicar en forma más acertada las fuentes de infección (Caminero *et al.*, 2001; Niemann *et al.*, 1997; Stead and Bates, 2000; Strassle *et al.*, 1997).

Estas aplicaciones han permitido mejorar el control de la enfermedad en diferentes áreas poblacionales, y también han permitido demostrar cómo personas infectadas con VIH presentan un alto riesgo para desarrollar la enfermedad en forma

activa (Smith y Moss 1994; Suffys *et al.*, 1997, Portugal *et al.*, 1999, Strassle *et al.*, 1997).

Se ha podido determinar el origen geográfico de muchas cepas mediante el estudio del movimiento migratorio y transcontinental de un gran número de personas (Hermans *et al.*; 1995; Samper *et al.*; 1997; Spidola de Miranda *et al.*; 1996; Sterling *et al.*, 2000). El análisis epidemiológico molecular también se ha aplicado en áreas cerradas como pueden ser escuelas, hospitales a través del seguimiento de infecciones nosocomiales, laboratorios para evaluar casos de contaminación cruzada (Hannan *et al.*, 2001; Van Soolingen y Hermans 1995; Mazurek *et al.*, 1991, Bauer *et al.*, 1997; Braden *et al.*, 1997a, b; Small *et al.*, 1993; Trakas *et al.*, 2000), y en prisiones y hogares para indigentes (Ridzon *et al.*, 1997; Cleveland *et al.*, 1995; Lemaitre *et al.*, 1996; Curtis *et al.*, 2000; Kearns *et al.*, 2000; Bergmire-Sweart *et al.*, 1996; Chávez *et al.*, 1997, Holton *et al.*, 1996). La combinación de la epidemiología molecular con la epidemiología tradicional ha aportado información para establecer la ubicación de enfermos como centros de brotes de infección (Small y Van Embden, 1994; Suffys *et al.*, 1997).

Uno de los factores de riesgo que más se ha asociado al incremento de la tuberculosis en Países con un alto nivel de vida ha sido el aumento de la inmigración hacia ellos, donde personas que provienen de Países con alta incidencia de tuberculosis llegan y se establecen en lugares que pueden presentar bajas condiciones socioeconómicas, hacinamiento y con una baja atención médica, siendo todos estos factores de riesgo para la transmisión activa de la tuberculosis (Gutiérrez *et al.*, 1998).

El incremento de casos de tuberculosis en los últimos años en algunas ciudades norte americanas ha captado la atención de grupos de investigación para

analizar este fenómeno. En ciudades como San Francisco, New York y los Ángeles (Small *et al.*, 1994; Alland *et al.*, 1994 y Barnes *et al.*, 1997), el objetivo de estos estudios de epidemiología molecular ha sido investigar los factores de riesgo, así como la posible transmisión reciente de la enfermedad. Con el apoyo del método de RFLP-IS6110 para la tipificación de cepas en combinación con la epidemiología tradicional se llegó a entender la transmisión en el área urbana (Alland *et al.*, 1994; Small *et al.*, 1994).

Es claro que esta infección es casi exclusiva de las personas y su propagación puede llegar a reducirse si se identifican claramente los casos contagiosos, y si se les da un tratamiento adecuado y un seguimiento que permita controlar la aparición de cepas MDR, esto último se realiza con una supervisión muy estrecha para la toma de medicamentos y un control clínico que permita dar un seguimiento acertado a la enfermedad. Esta estrategia se llamada DOTS (TAES en México). Se puede romper la línea de transmisión al realizar un adecuado control de la fuente de infección (Enarson *et al.*, 2000). Adicionalmente se requerirá de alguna estrategia eficaz, barata, sencilla y que se encuentre estandarizada para su aplicación por personal capacitado y aplicable en las instituciones de salud (OMS, 1996). Al utilizar esta estrategia DOTS es posible alcanzar un 85% de curación de los casos, pero si se presentan fallas como el inadecuado seguimiento de la infección, así como un tratamiento erróneo por la presencia de cepas resistentes, se podría llegar a una recaída e incluso la muerte del paciente (WHO 1992). Así mismo, es de gran importancia que las instituciones de salud cumplan con lineamientos generales en las instituciones cerradas como las casas de indigentes, así como cárceles o centros penitenciarios que permitan un control de la enfermedad.

4.6 Características del elemento IS6110

El elemento IS6110 fue aislado del cromosoma de *M. tuberculosis* por Thierry y colaboradores, posteriormente se observó su presencia en todos los miembros del complejo de tuberculosis (Hermans *et al.*, 1990). Esta secuencia de inserción es de 1355 pb y presenta varios sitios únicos de restricción, por ejemplo *PvuII*. El número de copias de IS6110 así como su posición dentro del cromosoma de *M. tuberculosis* es muy variable, llegando a presentarse hasta 20 ó más copias (Van Soolingen *et al.*, 1994, Van Soolingen y Hermans, 1995), aunque también se han identificado cepas de *M. tuberculosis* con muy pocas copias de IS6110 o ninguna (Fang y Forves; 1997; Radhakrishnan *et al.*, 2001).

La obtención de patrones de bandas simples y estables en la tipificación de *M. tuberculosis* mediante RFLP-IS6110 se debe básicamente a la amplia distribución de la secuencia de inserción IS6110 en su genoma, así como a su relativa baja frecuencia de transposición, lo cual ha permitido que este elemento sea preferentemente usado en estudios de epidemiología molecular (Cave *et al.*, 1994, Van Soolingen *et al.*, 1995).

La evidente presencia de cepas de *M. tuberculosis* con pocas o ninguna copia de IS6110 ha llevado al desarrollo de otros métodos de tipificación molecular de *M. tuberculosis* que utilizan otros tipos de marcadores genéticos alternativos (Van Soolingen *et al.*, 1993; Warren *et al.*, 1996).

4.7 Limitaciones del método de RFLP-IS6110

Una de las limitaciones más importantes del método de RFLP-IS6110 es que se requiere de una alta cantidad de ADN, lo cual se traduce en el requerimiento de un abundante crecimiento de las cepas de *M. tuberculosis* a analizar (Otal *et al.*, 1997;

Suffys *et al.*, 1997) y que junto con su lento crecimiento, la obtención de la suficiente cantidad ADN implica un largo tiempo. Adicionalmente, el ADN obtenido debe ser de una muy buena calidad, ya que la degradación del mismo implicaría la posible pérdida de bandas de alto tamaño molecular durante la digestión con la enzima de restricción. El protocolo por sí mismo resulta laborioso y se requiere de tres a cuatro días para realizarlo y junto con la técnica de marcaje empleado, hace al método de RFLP-IS6110 moderadamente caro (Hayward, 1995; Suffys *et al.*, 1997).

Otra limitante muy importante es que se han identificado cepas de *M. tuberculosis* que presentan muy pocas copias o ninguna del elemento IS6110 en su genoma (Hermans *et al.*, 1995; Van Soolingen y Hermans 1995, Radhakrishnan *et al.*, 2001). Este tipo de cepas no pueden ser tipificadas mediante el método de genotipificación de RFLP-IS6110.

4.8 Marcadores genéticos alternativos para la tipificación de *Mycobacterium tuberculosis*

La secuencia de inserción IS1081 presenta 1324 pb y fue descubierta por Collins y Stephen en 1991 (Collins y Stephen 1991). Esta secuencia está relacionada con la familia del IS256 de *Staphylococcus aureus* y presenta un bajo polimorfismo, por lo que tiene un uso limitado en análisis de epidemiología molecular, pero puede diferenciar cepas de *M. bovis* de otros miembros del complejo de tuberculosis (Van Soolingen *et al.*, 1992, 1993).

Las llamadas secuencias repetitivas directas o DR (por sus siglas en inglés) pueden variar en número de 10 a 50 copias en cepas del complejo de tuberculosis. Además resultan ser la región preferencial para la integración del elemento IS6110

en el cromosoma micobacteriano (Beggs *et al.*, 1996, Fang y Forbes, 1997; Hermans *et al.*, 1991).

Las secuencias polimórficas repetitivas ricas en guanina-citosina, llamadas PGRS (por sus siglas en inglés), son secuencias cortas formadas por muchas repeticiones y están presentes en múltiples agrupaciones cromosomales; estas secuencias no sólo se encuentran en el complejo tuberculosis sino que también están presentes en *M. kansasii*, *M. szulgae* y *M. malmoeense* (Suffys *et al.*, 1997).

4.9 Otros métodos moleculares para la tipificación de *Mycobacterium tuberculosis*

Como resultado de las limitaciones del método de RFLP-IS6110, se han desarrollado otras estrategias o métodos de tipificación que han permitido eliminar o reducir las dificultades del método de RFLP-IS6110. La intención de estos nuevos métodos de tipificación es fundamentalmente acortar el tiempo para su realización al no requerir de un crecimiento abundante de las micobacterias en estudio. Además, al emplear métodos de amplificación de ADN como la PCR, se pueden utilizar directamente muestras clínicas sin necesidad de la obtención de cultivos puros abundantes (Cousins *et al.*, 1992, Goyal *et al.*, 1997; Hass *et al.*, 1993; Patel *et al.*, 1996; Samper *et al.*, 1997).

Uno de estos métodos es la llamada PCR inversa de IS6110 la cual emplea cebadores exteriores al IS6110 (Samper *et al.*, 1997). Sin embargo, este método tiene la desventaja de que es poco reproducible, poco específico y genera pocas bandas (Kremer *et al.*, 1999).

Otro método basado en la PCR es el llamado ampliprintin-IS6110 que utiliza cebadores dirigidos a las secuencias MPTR e IS6110. Este método se puede aplicar a

partir de muestras clínicas, pero tiene la desventaja de obtenerse un bajo número de fragmentos y además es poco reproducible (Plikaytis *et al.*, 1993; Suffys *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 1999).

Otro método que utiliza la PCR es la PCR-DER o DRE-PCR (por sus siglas en inglés), el cual se basa en la amplificación de las secuencias IS6110 y PGRS generando polimorfismos, por lo que la discriminación es aceptable, pero presenta una baja reproducibilidad (Friednan *et al.*, 1995; Kremer *et al.*, 1999).

El uso de cebadores arbitrarios (PCR-CA o Arbitrarily primer PCR, en inglés) ha llevado a la obtención de patrones polimórficos y a mejorar la reproducibilidad respecto a los métodos de tipificación anteriores. Su principal desventaja es la necesidad de emplear varios juegos de oligonucleótidos cebadores. Con este método se ha logrado un alto poder de discriminación entre cepas de *M. tuberculosis* (Kremer *et al.*, 1999).

Otro método es el llamado PCR con mezclas de adaptadores (Mixed-Linker PCR, en inglés), donde se usa un cebador dirigido a IS6110 y un segundo cebador dirigido al adaptador. En este método se generan más bandas que en el RFLP-IS6110 y presenta una alta reproducibilidad y poder de discriminación, por lo que se considera una alternativa para estudios de epidemiología (Haas *et al.*, 1993).

También se cuenta con el polimorfismo cromosomal de secuencias repetidas en tándem de número variable VNTR (Variable Number of Tandem Repeats en inglés). Con este método se ha podido clasificar en perfiles alélicos diferentes a diferentes cepas de *M. tuberculosis*. Una variante es el método llamado de tipificación MIRU/VNTR que utiliza secuencias de VNTR presentes en doce *loci* diferentes, el cual presenta una excelente reproducibilidad, sensibilidad y alto poder de discriminación (Supply *et al.*, 2001).

Por último, la tipificación con oligonucleótidos espaciadores o Spoligotyping (en inglés), la cual se basa en amplificar una región cercana a los DR para posteriormente realizar una hibridación diferencial de los productos amplificados en una membrana que presenta oligonucleótidos como sondas específicas (Van Soolingen y Hermans, 1995; Suffys *et al.*, 1997). Este método presenta una excelente reproducibilidad y la comparación visual entre cepas de *M. tuberculosis* es sencilla, pero para cepas con un alto número de copias de IS6110 presenta un poder de discriminación menor al método de RFLP-IS6110, aunque en cepas con bajo número de copias de IS6110 se obtienen excelentes resultados (Kamerbeek *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 1999).

Actualmente, se considera que los métodos de tipificación molecular de *M. tuberculosis* de Spoligotyping y MIRU/VNTR son los más recomendables a emplear debido a su alta reproducibilidad y poder de discriminación, y adicionalmente porque sus resultados pueden ser expresados en un formato digital simple (Kremer *et al.*, 1999; Supply *et al.*, 2001). El uso del método de RFLP-IS6110 se recomienda principalmente en cepas con un mediano ó alto número de copias de la secuencia IS6110 (Kremer *et al.*, 1999).

4.10 Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados o AFLP

4.10.1 Características del método de AFLP

En años recientes se han desarrollado varios métodos para la tipificación e identificación de organismos en base al análisis de ADN. Estos se diferencian entre sí por su poder de discriminación y reproducibilidad, así como de su estandarización e interpretación (Maslow *et al.*, 1993; Morel; 1997; Reineke *et al.*, 1998; Replogle *et*

al., 1994; Tenover *et al.*, 1994; Van Belkum; 1994; Vaneechoutte; 1996; Versalovic *et al.*, 1993). Un método ideal de tipificación molecular sería aquel cuyos resultados puedan ser reproducibles independientemente del laboratorio en que se trabaje y que permita además un análisis comparativo entre las cepas estudiadas, así como que permitiera establecer una base de datos sencilla. Uno de los métodos de tipificación molecular más prometedor es el análisis por AFLP, desarrollado por Keygene B.V., Wageningen. Este método de tipificación puede ser aplicado a cualquier muestra de DNA con un alto poder de discriminación y reproducibilidad. El método de AFLP ha sido aplicado tanto en plantas como en animales, así como en mapeo genético de diagnóstico, estudios de filogenia y tipificación microbiana (Blears *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 1995; Zabeau y Vos, 1993).

Los patrones de bandas que se logran obtener entre las diferentes cepas estudiadas por AFLP presentan un alto polimorfismo debido a varias razones: mutaciones en los sitios de restricción analizados, mutaciones en las secuencias adyacentes al sitio de restricción y por inserciones o deleciones en los productos amplificados (Vos *et al.*, 1995). La mayoría de los ensayos de AFLP se han realizado mediante la combinación de varias enzimas de restricción dependiendo del genoma estudiado (Ajmone *et al.*, 1997), aunque se han descrito algunas alternativas en AFLP basadas en el uso de una sola enzima, un solo adaptador y el análisis en geles de agarosa (Gibson *et al.*, 1998; Valsangiacomo *et al.*, 1995, Viader-Salvadó *et al.*, 2002).

El método de AFLP al ser comparado con otros métodos de tipificación presenta algunas ventajas como son la reproducibilidad, el alto poder de discriminación, y los aspectos operacionales o de detección. Este método de tipificación requiere relativamente pequeñas cantidades de ADN, que se digiere con

enzimas de restricción. Los fragmentos de AFLP obtenidos no dependen de técnicas de hibridación para su detección. Empleando el método de AFLP es difícil que se presenten resultados con patrones de bandas incorrectos, mientras que por RFLP esto puede ser más frecuente (Vaneechoutte, 1996).

4.10.2 El método de AFLP y su apoyo en la tipificación molecular

Los métodos de genotipificación difieren en su poder de discriminación dependiendo de la complejidad del genoma estudiado. El método de AFLP ha permitido en bacteriología llegar a identificar y tipificar microorganismos (Janssen *et al.*, 1997; Rademaker *et al.*, 2000). De los diferentes métodos de tipificación, el AFLP presenta varias ventajas resultando principalmente un alto poder de discriminación (Desai *et al.*, 1998; Dijkshoorn *et al.*, 1996; Duim *et al.*, 1997; Janssen y Dijkshoorn, 1996; Koeleman *et al.*, 1997; Koeleman *et al.*; 1998; Picardeau *et al.*; 1997; Rademaker *et al.*; 2000); Valsangiacomo *et al.*, 1995); esto se da gracias a que el análisis por AFLP se basa en la presencia de mutaciones en sitios de restricción que generan una variación en la longitud de los fragmentos obtenidos y que junto con variaciones en los nucleótido selectivos del extremo 3' de los iniciadores de PCR, permiten generar una alta cantidad de fragmentos detectables en sistemas de electroforesis (Vaneechoutte, 1996).

4.10.3 El método de AFLP y su comparación con otros métodos de tipificación molecular

Se ha demostrado que el análisis mediante RAPD de cepas de *Acinetobacter baumannii* requirió del uso de cinco diferentes oligonucleótidos iniciadores y técnicas de hibridación de ADN para poder lograr el mismo nivel de significancia

que el método de AFLP (Koeleman *et al.*, 1998). Al comparar los análisis por RAPD, PFGE y AFLP en *Pseudomonas* se concluyó que el método de AFLP presenta un mayor poder de discriminación que los otros métodos evaluados (Speijer *et al.*, 1999; Tenover *et al.*, 1995). Sin embargo, el método de PFGE al utilizar nucleótidos selectivos en ambos iniciadores fue mejor que el método de AFLP. En estudios para diferenciar cepas de *Streptococcus pyogenes* del grupo A se demostró que el método de AFLP fue superior al de PFGE (Desai *et al.*, 1998).

La tipificación molecular de *M. tuberculosis* mediante el método de RFLP-IS6110 (Van Embden *et al.*, 1993) así como el análisis por VNTR (Kamerbeek *et al.*, 1997), han demostrado un alto poder de discriminación entre las cepas de *M. tuberculosis* estudiadas, pero ambas son dependientes del número de secuencias repetidas de IS6110 o VNTR's presentes en el genoma de las cepas analizadas, siendo esto una limitante importante (Kamberbeek *et al.*, 1997).

El método de AFLP ha permitido generar un análisis más informativo en plantas, comparado con el análisis realizado por RFLP (Hill *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1997) o bien por RAPD (Blears *et al.*, 1998; Daly, 1998; Maslow *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1997), logrando obtener una mayor información acerca de la diversidad genética (Greef *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1996; Sensi *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1996; Travis *et al.*, 1996).

Una limitación básica del análisis por AFLP así como de otros procedimientos para tipificación molecular, es que el organismo bajo estudio debe encontrarse aislado para que el ADN obtenido a partir de él no presente patrones erróneos durante su tipificación. Así mismo para el AFLP se requiere de una cantidad muy pequeña de ADN, el cual puede ser obtenido de unas pocas colonias bacterianas.

4.10.4 Aplicación del método de AFLP

El análisis por AFLP en genomas bacterianos ha resultado de gran apoyo en la epidemiología y estudios de evolución, esto gracias a los resultados obtenidos al combinar diferentes enzimas de restricción así como por el uso de la combinación de varios iniciadores de PCR y nucleótidos selectivos, los cuales han generado un mayor poder informativo y de discriminación (Huys *et al.*; 1993, 1996^a, 1996^b, 1996^c, 1997^a, 1997^b; Janssen *et al.*, 1996). La tipificación molecular juega un papel muy importante en los procesos epidemiológicos, ya que estos pueden generar un alto poder de discriminación y reproducibilidad. El análisis de secuencias específicas como los fragmentos móviles o secuencias de inserción así como mutaciones genómicas ha ayudado mucho a cumplir con estos requisitos.

Se han descrito variaciones al protocolo original de AFLP, digestión del ADN con *Bam*HI y *Bgl*III, ligación con un simple adaptador que ha generado patrones de tipificación útiles en micobacterias (Palittapongarnpim *et al.*, 1993), y análisis de polimorfismos de secuencias específicas amplificadas en donde se utiliza una PCR con un adaptador y un oligonucleótido iniciador marcado específico para un retrotransposón (Ellis *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1996; Waugh *et al.*, 1997) o para el elemento IS6110 de *M. tuberculosis* (Hass *et al.*, 1993). También se ha descrito la recuperación y clonación de productos amplificados por AFLP con el fin de determinar su secuencia e identificar nuevos marcadores genéticos (Chalhoub *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 1996). Además, se ha descrito el análisis por AFLP de cDNA como una alternativa muy poderosa en el análisis sistemático de la expresión diferencial de genes (Bachem *et al.*, 1996; Habu *et al.*, 1997; Jones y Harrower, 1998; Money *et al.*, 1996).

4.10.5 AFLP como método de genotipificación de *M. tuberculosis*

Algunos autores han comparado el método convencional de AFLP y el método de RFLP-IS6110 empleando aislamientos de *M. tuberculosis* (Ahmed *et al.*, 2004, Goulding *et al.*, 2000; Huys *et al.*, 2000, Kassama *et al.*, 2006; Krishnan *et al.*, 2007, Ruiz *et al.*, 2003, Sims *et al.*, 2002; van den Braak *et al.*, 2004) y han hecho referencia sobre los avances del AFLP sobre el RFLP-IS6110. Las principales ventajas que han observado han sido sobre la reproducibilidad del método de AFLP, la menor cantidad de ADN requerido así como la facilidad técnica. Estos autores intentaron buscar una correlación entre los agrupamientos de los dendrogramas obtenidos en los dos métodos de genotipificación sin considerar un análisis mediante índices de similitud el cual resulta más exacto que una inspección visual de los dendrogramas obtenidos mediante AFLP y RFLP-IS6110.

Recientemente, se diseñó y evaluó una simplificación del método de AFLP en cepas de *M. tuberculosis* basándose en la secuencia reportada del genoma de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv. Con ayuda del programa computacional SitesFinder que predice el número de sitios de restricción de una enzima de restricción determinada presentes en el genoma de *M. tuberculosis* así como el número bandas que generaría un iniciadores de PCR con determinados nucleótidos de selección, se seleccionó una sola enzima de restricción (*XhoI*) y un iniciador con una G como nucleótido de selección ya que generaría 11 bandas en un gel de agarosa al 2.5% evaluado con una tinción simple con bromuro de etidio. El análisis obtenido por este método simplificado de AFLP de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* y de la cepa control mostraron patrones de bandas diferentes considerando a este método simplificado de AFLP como una buena opción para diferenciar aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (Viader-Salvadó *et al.*, 2002).

5 MÉTODOS

5.1 Reactivos y material biológico

Los reactivos utilizados en las diferentes soluciones para el aislamiento del ADN geonómico se adquirieron de Molecular Research Center (Cincinnati, OH, USA), Research Organics, (Cleveland, OH, USA), US Biological, (Massachusetts, MA, USA). El ADN de Lambda de alta pureza utilizado en densitometría comparativa en BioGene US Biological, (Marblehead, MA, USA). Las enzimas de restricción fueron adquiridas de Chimerx (CHIMERx Milwaukee, WI), Bionline, (Bionline Luckenwalde, Germany), New England Biolabs, (New England Biolabs, Beverly, MA). Los marcadores de peso molecular fueron adquiridos de Invitrogen (Invitrogen Cat. No. 15622-012) y Gibco BRL (Gibco BRL Cat. No.15611-015), la membrana de hibridación Hybond N+, de Amersham, (Amersham, Inglaterra). La purificación de la sonda se realizó utilizando un sistema de purificación Wizard Plus SV PCR Prep. Amersham, (Amersham, Inglaterra), marcador de masa y peso molecular de 100 pb Invitrogen (Cat. 10496-016). La enzima *Taq* DNA polimerasa se adquirió de Promega Corporation (Promega, Madison, WI), bromuro de etidio de Sigma-Aldrich Co., (St. Louis, MO) y el SYBR Gold de Invitrogen (San Diego California). El análisis de las bandas obtenidas se realizó utilizando el programa UVIttec Gel Documentation system y el programa UVIMap (UVIttec Limited, Cambridge, UK) y fueron analizadas mediante el paquete estadístico multi variado MVSP (Kovach Computing Services, Anglesey, UK). Se utilizó el sistema de marcaje de ácidos nucleicos Streptavidin Peroxidasa ECL de Amersham, (Amersham, Inglaterra). Los oligonucleotidos XA-1, XA-2 y el XP-G fueron

sintetizados libres de DMT de Bio-Synthesis, Inc., (Lewisville, TX), se disolvieron en agua ultra pura y fueron almacenados a -20°C hasta su posterior uso.

Se utilizaron un total de 52 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* del Estado de Tamaulipas, los cuales fueron obtenidos durante un periodo de 2 años (2002-2003) y proporcionados por el Laboratorio Estatal de Salud Pública en Cd. Victoria, Tamaulipas, México. La inactivación de las cepas así como la extracción del ADN se realizó en el Área de Diagnóstico Molecular del Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria. El método de AFLP simplificado se realizó en el Área de Diagnóstico Molecular del Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria y en el Laboratorio No 5 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Biología de la U.A.N.L. El análisis por RFLP IS6110 se realizó en el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario, Monterrey, N.L. y en Área de Diagnóstico Molecular del Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Tamaulipas.

Las muestras se seleccionaron a partir de pacientes en los que se tenía una alta sospecha de presentar tuberculosis pulmonar, con baciloscopía positiva y crecimiento en el medio de cultivo de Lowestein-Jensen. Las muestras se concentraron y separaron en 4 fracciones para su tinción directa por Ziehl-Neelsen, inoculadas en Lowestein-Jensen, así como en placas conteniendo el medio Middlebrook 7H10 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) el cual contenía el suplemento OADC (ácido oleico-albúmina-destroxa-catalasa) y adicionado con una mezcla de antibióticos PANTA (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) e incubadas a 37°C por 10 días. Todos los aislamientos fueron obtenidos a partir de muestras de esputo, uno por paciente y

caracterizados mediante pruebas bioquímicas convencionales (Kent and Kubica; 1985), la característica de resistencia se determinó mediante el método de indirecto de proporción.

Se utilizó la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC27294) como cepa control en los análisis genéticos.

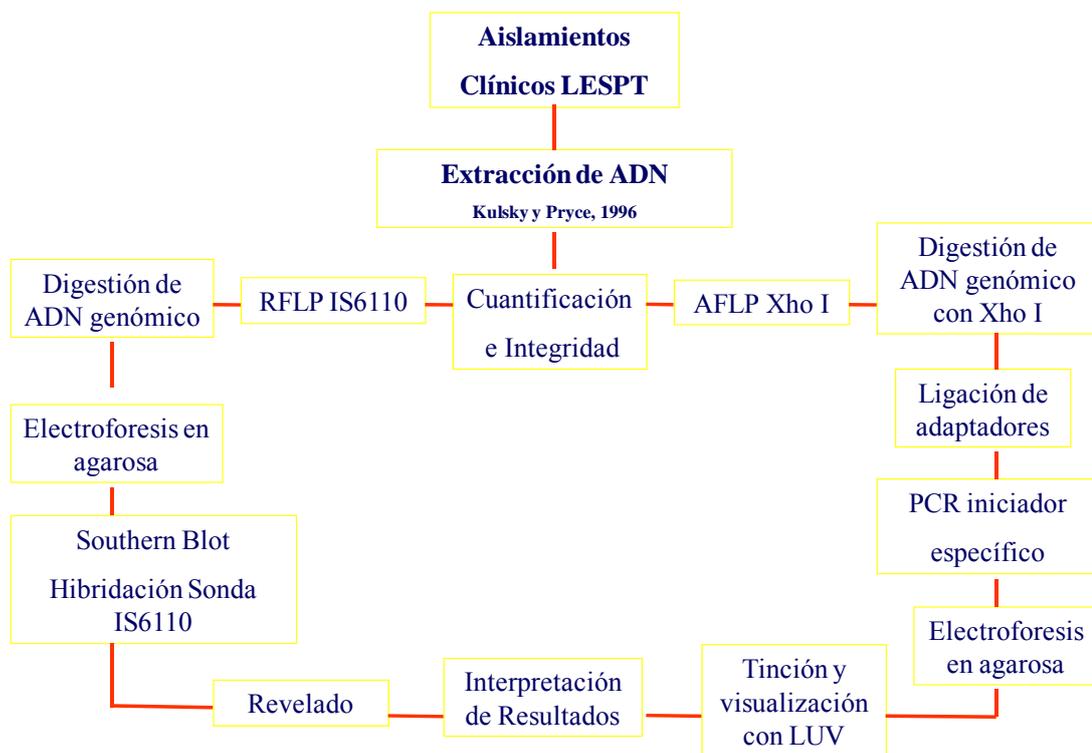
5.2 Equipos

Los equipos utilizados en el presente trabajo se mencionan a continuación: Termociclador (Thermo-Hybaid PCR-express), bloque-calentamiento (Lab line-2000), microcentrífuga mini spin plus (Eppendorf), vortex (Heidolph), bloque-calentamiento (Fisher Scientific), sistemas de electroforesis horizontal (OWL), fuente de poder eléctrica para electroforesis (Labnet-Power station- 300), transiluminador de luz ultravioleta (UVP), baño de agua con agitador (Lab Care America), microcentrífuga (Eppendorf-5414C), incubadora (Lab-line- 100), micropipetas (Labnet Biopette, Alfapette y VWRbrand) incubadora de hibridación (Fisher-Biotech), placa para agitación (Corning PC420), balanza electrónica (Fischer), autoclave (Yamato- SM510), centrífuga (Sol-bat -C-300), contador de colonias (Relasa-6025), congelador – 20 (Lab-line), contador de colonias (Cisa-23618), pHmetro (ORION-230A), refrigerador (AMERICAN), incubadora (JM ORTIZ), estufa de Calentamiento (Backel), campana de flujo laminar.

El procesamiento de datos así como el análisis de imágenes digitales se realizó utilizando una computadora Sony Vaio PCG fx 340 (Sony), se utilizó el procesador de textos Microsoft Office Word 2003 (Microsoft Corporation, 2003), procesador de gráficos Microsoft Office Power Point 2003 (Microsoft Corporation, 2003), y la hoja de cálculo Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation,

2003). El análisis de datos se realizó utilizando el paquete estadístico multi variado MVSP (Kovach Computing Services, Anglesey, UK).

5.3 Estrategia general



La estrategia general que se aplicó para cubrir los objetivos establecidos se describe en la figura 1. Primeramente se realizó la extracción del ADN geonómico a partir de los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos en el Estado de Tamaulipas lo cual permitió establecer una genoteca que servirían para el desarrollo del trabajo. Apartir del ADN obtenido el cual fue cuantificado, se realizaron los métodos de AFLP simplificado y RFLP-IS6110 para obtener los patrones de bandas en cada método y en cada aislamiento clínico, los patrones de bandas obtenidos nos permitieron definir el poder de discriminación en cada método y los índices de similitud de pares de muestras obtenidos en cada caso, generando así un histograma

de frecuencias de índices de similitud entre pares de muestras para ambos métodos. El análisis de los patrones de bandas obtenidos nos permitieron agrupar a las muestras en grupos similares generando dos dendrogramas uno para cada método. Así mismo se comparó la distribución de las bandas teóricas para el AFLP y el RFLP-IS6110 a partir de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv lo cual nos permitió generar un histograma de porcentaje de frecuencias para ambos casos.

5.4 Aislamiento del ADN

A las colonias de las micobacterias obtenidas en el medio Middlebrook 7H10, se añadieron 3 ml de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) y se disgregaron con un hisopo estéril, se inactivaron térmicamente a 80°C por una hora en baño de agua y se centrifugaron a 13000g por 5 mín. Posteriormente, al paquete celular obtenido, se le realizó la extracción del ADN empleando el método de CTAB/NaCl (van Embden *et al.*, 1993). A 500 µl de la suspensión celular se añadieron 50 µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente, se añadieron 70 µl de SDS al 10% y 5 µl de Proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 65°C por 10 min. Posterior a la incubación, se añadieron 100 µl de NaCl 5 M y 100 µl de CTAB/NaCl precalentado a 65°C. Se agitó al vortex hasta tomar un color blanco y se incubó a 65°C por 10 min. Se añadió 1 volumen de Sevag (Cloroformo–Alcohol isoamilico 24:1) y se agitó al vortex durante 10 seg. Se centrifugó a 13000 g por 5 min y se rescató la fase acuosa, la cual se transfirió a un microtubo nuevo de 1.5 ml. Se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN y se colocó a -20°C por 10 min. El microtubo se centrifugó a 13000 g por 15 min y se eliminó el sobrenadante. El ADN obtenido se lavó añadiendo 1 ml de etanol al 70% frío y se agitó suavemente al vortex. Se centrifugó

de nuevo el tubo, se eliminó el sobrenadante, y la pastilla obtenida se dejó secar al aire durante 15-30 min. Posteriormente, se añadieron 40 μ l de agua ultrapura para la disolución del ADN.

El ADN obtenido se evaluó en su concentración, calidad e integridad mediante espectrofotometría y la relación 260/280, así como por densitometría comparativa en electroforesis en geles de agarosa al 1%, solución amortiguadora TBE y utilizando un sistema horizontal OWL, de 7 x 9 cm a 90 volts por 45 minutos. Se empleó como estándar el ADN de Lambda de alta pureza (BioGene, US Biological, Marblehead, MA. USA). El gel fue teñido con bromuro de etidio (2 μ g/ μ l) y se visualizó en un transiluminador de LUV de longitud de onda corta. La imagen se capturó utilizando una cámara digital y se analizó en el programa UVIMap (UVItec Gel Documentation, Cambridge, UK). Se estimó la concentración de ácidos nucleicos de cada extracción y se ajustó a 0.2 μ g/ μ l para posteriormente almacenar los ADN's a -20°C hasta su posterior uso.

5.5 AFLP simplificado

5.5.1 Digestión del ADN

Se digirieron 200 ng de ADN genómico con 10 U de la enzima *XhoI* (CHIMERx Milwaukee, WI), en un volumen de reacción de 25 µl, el cual contenía 2.5 µl de la solución amortiguadora 10X No 1 CHIMERx y agua ultra pura, y se incubó a 37°C por 2 h.

5.5.2 Preparación del adaptador XA

El adaptador de doble cadena fue preparado mezclando los oligonucleótidos XA-1 (GTAGACTGCGTACATGCA) y XA-2 (TCGATGCATGTACGCAGT) a una concentración de 25 µM cada uno en una solución conteniendo 90 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, y 0.1 mM EDTA (pH 8.0). La mezcla se calentó en baño de agua a 90°C por 5 min, se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente y posteriormente se colocó a -20°C hasta su posterior uso en el paso de ligación.

5.5.3 Ligación del adaptador a los fragmentos de restricción

A partir del ADN digerido con *XhoI*, se tomaron 15 µl y se ligaron con el adaptador a una concentración final de 2.5 µM. La reacción de ligación contenía 1 U de T4 ligasa (CHIMERx Milwaukee, WI), 2.5 µl de la solución amortiguadora de reacción 10X (CHIMERx Milwaukee, WI) en un volumen total de 25 µl. La mezcla se incubó a 12°C por 17 h y se inactivó térmicamente a 65°C por 10 min. A cada tubo de ligación se añadieron 14 µl de agua ultrapura, 50 µl de acetato de amonio 7.5 M y 300 µl de etanol al 95% (v/v), se centrifugó a 10,000 rpm por 8 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado obtenido se lavó añadiendo 250 µl de etanol al 75%

(v/v) y se dejó secar al aire por 10 min. Se disolvió el precipitado añadiendo 25 μ l de una solución amortiguadora TE 0.1 (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8) y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

5.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción de PCR se realizó en un termociclador PCR Express (Thermo Hybaid, Middlesex, UK), en un volumen total de reacción de 25 μ l el cual contenía, 4.2 μ l de la mezcla de ligación, 2.5 μ l del solución amortiguadora de PCR 10X, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 6.0 μ M del iniciador XP-G (TGCGTACATGCATCGAGG), agua ultra pura y 2 U de *Taq* DNA polimerasa (Bioline Luckenwalde, Germany). Se empleó la técnica de PCR touchdown (Hecker and Roux, 1996) en un programa térmico de tres etapas: 72°C por 2 min; 16 ciclos de amplificación, 94°C por 20 s, 65°C por 30 s, disminuyendo 1°C en cada ciclo, y 72°C por 2 min, con un paso inicial de desnaturalización de 94°C por 2 min; y 19 ciclos de amplificación de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s, y 72°C por 2 min, con un paso de extensión final de 60°C por 30 min. Al finalizar la PCR se tomaron 4 μ l de la mezcla de reacción y se analizaron en electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% en solución amortiguadora TBE (w/v) y teñido con SYBR GOLD al 1x. Se utilizó una cámara de electroforesis de 9 x 10 cm (C.B.S., California, USA) y un voltaje de 100 volts durante 60 a 70 min. Posteriormente, el gel se visualizó en un transiluminador de LUV de longitud de onda corta, la imagen se capturó utilizando una cámara digital y se analizó con el programa UVIMap (UVItec Gel Documentation, Cambridge, UK) para determinar el número de bandas y el tamaño molecular de cada banda. Siguiendo las recomendaciones para los ensayos de AFLP (Suazo and Hall, 1999), se realizaron dos controles negativos utilizando el ADN de la cepa de referencia

H37Rv. Los controles fueron el ADN genómico no digerido o bien agua en lugar del ADN blanco junto con los reactivos de la reacción de PCR en ambos casos. Estos controles fueron utilizados para evaluar la posible hibridación de los iniciadores al ADN genómico y no al adaptador XA en el primer caso, y para detectar la posible contaminación en los reactivos en la reacción de PCR en el segundo caso.

5.5.5 Reproducibilidad del método de AFLP simplificado

La reproducibilidad del método de AFLP simplificado se evaluó aplicándolo a siete extracciones de ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv.

5.6 Análisis del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción de IS6110 (RFLP-IS6110)

Los análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de IS6110 se llevaron a cabo mediante el protocolo estandarizado descrito en la literatura (van Embden *et al.*, 1993; Crawford *et al.*, 2002), digiriendo las muestras de ADN con la enzima de restricción *PvuII* y realizando una hibridación con una sonda quimioluminiscente del extremo derecho de la secuencia IS6110.

5.6.1 Digestión del ADN, gel de agarosa y transferencia a la membrana

Se digirieron de 3-4 µg de ADN genómico utilizando 8 U de la enzima de restricción *PvuII* (New England Biolabs, Beverly, MA) en un volumen de reacción de 30 µl, el cual contenía 3.0 µl de la solución amortiguadora 10X No 2 (New England Biolabs) y agua ultrapura, e incubando a 37°C por 4 h en baño de agua. Posteriormente, al ADN digerido se añadieron 5 µl de solución amortiguadora de

corrida (50% glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA y 0.05% de azul de bromofenol).

Se preparó un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE 1x (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico y 2.5 mM EDTA), se calentó hasta disolución total en un horno de microondas y se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0.05 µg/ml. La agarosa fundida se vació a un sistema de electroforesis de 20x25 cm (Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus 20.25 Life Technologies Gibco BRL) perfectamente nivelado y hasta alcanzar un grosor de 8-9 mm aproximadamente. Se colocó el peine para 20 espacios y se dejó enfriar completamente. El gel fue colocado en el sistema de electroforesis el cual contenía solución amortiguadora TBE 1x. Las muestras digeridas y con la solución amortiguadora de corrida se colocaron en el gel. Se añadieron tres carriles para el marcador de tamaño molecular de ADN super coiled 0.25 µg/µl (Invitrogen Cat. No. 15622-012) y PhiX174-*Hae*III 0.5 µg/µl (Gibco BRL Cat. No.15611-015) de un intervalo de 16.2 a 0.603 kpb.

Se colocó el sistema de electroforesis a 100 Volts por 10 minutos y posteriormente se disminuyó a 40 Volts durante toda la noche. Después de un corrimiento de $\frac{3}{4}$ partes del gel, éste se depositó en un recipiente de plástico de tamaño adecuado, y se añadieron 300 ml de la solución amortiguadora desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) dejándolo durante 20 min a temperatura ambiente y en agitación suave. La solución amortiguadora se eliminó y el gel se lavó utilizando 300 ml de agua destilada, eliminándola posteriormente. Se añadieron 300 ml de solución amortiguadora de neutralización (NaCl 1.5 M, Tris 0.5 M, pH 7.5) dejando en agitación suave durante 20 min y a temperatura ambiente. El gel se colocó en el sistema de transferencia por capilaridad utilizando una membrana de hibridación Hybond N+ (Amersham, Inglaterra) y la solución amortiguadora para

transferencia SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M, pH 7.0), permitiendo la transferencia en el sistema durante 4 horas a temperatura ambiente.

Terminada la transferencia, la membrana de hibridación se retiró utilizando guantes y se colocó en un recipiente de plástico limpio y seco, el cual contenía 80 ml de solución amortiguadora de neutralización SSC 2X, y se dejó actuar durante 30 min en agitación suave. La membrana de hibridación se retiró del lavado y se dejó secar completamente colocándola en un pliego de papel filtro. Se anotó con lápiz los datos correspondientes en el extremo superior derecho y respetando la posición de los carriles de la transferencia. Ya seca la membrana, se realizó una unión de entrecruzamiento del ADN a la membrana mediante irradiación a 1200 Jouls durante 1 min o bien se colocó en un transiluminador de LUV de longitud de onda corta durante 2-3 min.

5.6.2 Obtención de la sonda para IS6110

5.6.2.1 Síntesis de la sonda para IS6110

La sonda para la secuencia IS6110 se sintetizó mediante PCR, la cual contenía 5 µl de solución amortiguadora 10x, 5 µl de MgCl₂ 25 mM, 5 µl de dNTPs 2.5 mM cada uno, los iniciadores INS-1 (5'-CGTGAGGGGCATCGAGGTGGC) e INS-2 (5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA) a una concentración de 50 ng/µl cada uno, Taq DNA polimerasa (5 U/µl) 0.1 µl y agua ultra pura a un volumen final de 50 µl. Se utilizaron 5 µl de ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, a una concentración de 20 ng/µl en la reacción.

El programa del termociclador en la reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: Primer paso, desnaturalización inicial a 96°C por 3 min; segundo

paso, 30 ciclos de 1 min a 96°C, 1 min a 65°C y 2 min a 72°C; tercer paso, extensión final a 72°C por 6 minutos. El producto amplificado obtenido de 245 pb se evaluó en un sistema de electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE y utilizando un marcador de tamaño molecular de 100 pb.

5.6.2.2 Purificación de la sonda para IS6110

Confirmada la amplificación del producto de PCR, se preparó un gel preparativo utilizando agarosa de bajo punto de fusión al 0.8% en solución amortiguadora TBE 1x (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico y 2.5 mM EDTA). Se calentó en un horno de microondas hasta disolución total, se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0.05 µg/ml y se transfirió a un sistema de electroforesis de 7 x 9 cm junto con un marcador de tamaño molecular de 100 pb. Se corrió el sistema a 100 Volts durante 45 minutos, se recuperó el producto amplificado de 245 pb cortando el fragmento del gel con la banda de interés con un bisturí nuevo, y se colocó en un microtubo de 1.5 ml para su purificación.

Se utilizó un sistema de purificación Wizard Plus SV PCR Preps, se transfirieron 300 µl (300 ng) de agarosa a un microtubo de 1.5 ml y se calentó a 70°C en baño de agua hasta la disolución total. Se añadió 1 ml de la resina de captura y se mezcló durante 20 s por inversión. Se armó la columna de purificación en una jeringa y se pipeteó la resina con el ADN dentro de la jeringa. Se colocó el émbolo y se hizo pasar el contenido por la membrana de captura. La agarosa se retiró y se añadieron 2 ml de isopropanol al 80%. La columna se colocó en un microtubo de 1.5 ml, se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min y se eliminó el isopropanol. La columna se colocó en un microtubo nuevo de 1.5 ml, se añadieron 50 µl de solución

amortiguadora TE 1x, se dejó en reposo durante 1 min, se centrifugó a 10,000 rpm por 20 s y se recuperó el ADN.

La concentración del producto purificado se estimó mediante electroforesis en agarosa al 0.8% en solución amortiguadora TBE, utilizando un marcador de masa y tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen Cat. 10496-016) y se ajustó a 100 ng/μl.

5.6.3 Marcaje de las sondas para IS6110 y marcador de tamaño molecular

Se colocaron 50 μl de la sonda para IS6110 purificada (entre 600-800 ng) en un micro tubo de 1.5 ml, y en otro micro tubo de 1.5 ml se agregó la sonda que se utilizó para el marcador de tamaño molecular super coiled 0.25 μg/μl (Invitrogen Cat. No. 15622-012) y PhiX174-*Hae*III 0.5 μg/μl (Gibco BRL Cat. No.15611-015). Ambos microtubos se colocaron en baño de agua a 97°C durante 5 min y se pasaron inmediatamente a hielo durante 5 min. Los microtubos se centrifugaron durante 30 s, se agregaron a cada uno 50 μl del reactivo de marcaje de peroxidasa y 50 μl de glutaraldehído, se mezclaron muy bien, se centrifugaron por 30 s y se incubaron a 37°C por 15 min. Ambas sondas marcadas se vaciaron en un tubo Falcon de 15 ml conteniendo 1 ml de la solución amortiguadora de hibridación.

5.6.4 Revelado de la membrana

La membrana de hibridación se colocó sobre una malla de tela limpia, ambas se enrollaron y fueron depositadas dentro del tubo de hibridación conteniendo 80 ml de la solución amortiguadora SSC 2X para su adherencia. Se retiró la totalidad de la solución amortiguadora y se añadieron 10 ml de solución amortiguadora de hibridación precalentada a 42°C durante 1 hora y conteniendo las sondas de hibridación marcadas. Se dejó incubar durante toda la noche en el horno de

hibridación a 42°C y en rotación constante. Al día siguiente, se retiró la solución amortiguadora de hibridación conteniendo las sondas, se colocó en un tubo Falcon de 15 ml y se almacenó a -20°C. Al tubo de hibridación conteniendo la membrana de hibridación se le realizaron 2 lavados de 10 min cada uno utilizando 80 ml de solución amortiguadora de lavado primario (25 ml de SSC 20X más 4 g de SDS y aforado a 1 l con agua destilada), precalentado a 55°C. Se recuperó la membrana de hibridación junto con la malla, se lavó 2 veces con solución amortiguadora de lavado secundario (100 ml de solución amortiguadora SSC 20X más 900 ml de agua destilada) por 5 min cada uno y se eliminó el exceso de solución amortiguadora.

En un recipiente limpio y seco se agregó la membrana de hibridación junto con 10 ml del reactivo de detección 1 y 10 ml del reactivo de detección 2, cubriéndola completamente y dejando actuar por 2 min. La membrana se secó perfectamente con un papel de filtro y se envolvió en papel plastificado. Inmediatamente y bajo obscuridad total, se colocó la membrana en un cassette de radiografía junto con una placa de auto radiografía dejándola en exposición durante 5 minutos, pasado el tiempo se realizó el revelado.

5.7 Análisis de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* mediante el método de AFLP simplificado y RFLP-IS6110

Validados ambos métodos de tipificación, éstos fueron aplicados a 52 muestras de ADN genómico obtenido a partir de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* del Estado de Tamaulipas.

5.8 Análisis numérico para la comparación de los métodos de genotipificación

Se empleó el índice de Hunter-Gaston (Hunter y Gaston, 1998) para evaluar el poder de discriminación entre ambos métodos de genotipificación. Este índice se calcula con la siguiente ecuación:

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

Donde N es el número total de cepas en la población muestra, s es el número total de tipos descritos y n_j es el número total de cepas relacionadas al tipo j . Se compararon los pares de patrones de bandas obtenidos por los métodos de AFLP ó RFLP-IS6110 para localizar bandas coincidentes con una desviación de ± 5.0 ó 2.5% de su tamaño molecular, respectivamente. Los patrones de bandas obtenidos para AFLP y RFLP fueron manualmente capturados como datos binarios en donde la presencia de banda fue indicada como 1 y la ausencia como 0 y expresados como un vector de 24 y 32 dimensiones que corresponden al número total de bandas diferentes obtenidas en cada prueba.

5.9 Índices de similitud de los dos métodos de genotipificación

Para los dos métodos de genotificación, se calcularon los índices de similitud de todas las posibles combinaciones de pares de muestras, aislamientos de *M. tuberculosis* (1326 pares), mediante el índice de similitud de Jaccard entre dos vectores con la información binaria del patrón de bandas de cada muestra. El índice de Jaccard se calculó mediante la relación entre el número de bandas coincidentes en las dos muestras y la suma del número de bandas no coincidentes en una muestra, más el número de bandas no coincidentes en la otra muestra, más el número de bandas coincidentes en ambas muestras.

Se comparó la frecuencia de índices de similitud de ambos métodos de genotipificación y los valores de los índices de similitud de uno de los métodos con el correspondiente del otro método mediante un gráfico con escalas continuas en ambos ejes.

5.10 Análisis de agrupamiento de muestras

Se realizó un análisis de agrupamiento de muestras (cluster analysis) empleando una matriz de similitud con los índices de similitud de Jaccard de pares de muestras, el programa Multi-Variate Statistical Package (Kovach Computing Services, An glesey, UK) y el método de agrupación de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) (Sneath et al., 1973). El resultado del análisis de agrupamiento de muestras se expresó en forma de dendrograma. Se consideraron muestras en el mismo grupo (cluster) las que tuvieron entre sí un índice de Jaccard superior a 0.3.

5.11 Grupos de muestras, información de los pacientes y susceptibilidad a drogas antituberculosas

Con el fin de correlacionar los grupos de muestras de los dos métodos de genotipificación con la información de los pacientes (procedencia, edad y sexo) y la susceptibilidad o resistencia a drogas antituberculosas, se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo de cada una de las variables anteriores en los diversos grupos de muestras.

5.12 Distribución de bandas teóricas de AFLP y RFLP-IS6110 en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv

Para evaluar y comparar la distribución de bandas teóricas de AFLP y RFLP-IS6110 en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, se realizaron dos histogramas de porcentaje de frecuencias de la secuencia de inserción IS6110 y frecuencias de los fragmentos teóricos de tamaño molecular entre 100 y 1500 pb obtenidos mediante AFLP utilizando la enzima *Xho*I, el adaptador XA y el iniciador XP-G, ambos respecto a la ubicación dentro del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. El primer histograma fue obtenido del mapa geonómico de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv descrito en la literatura (Philipp *et al.*, 1996) que indica las posiciones de las secuencias IS6110 en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. El segundo histograma se obtuvo utilizando un simulador para AFLP (Bikandi *et al.*, 2004) que se encuentra disponible en internet (<http://insilico.ehu.es/AFLP>).

6. RESULTADOS

6.1 Banco de ADN de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* del Estado de Tamaulipas

De los 52 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, 28 (53.85%) pertenecieron a pacientes del género femenino y 24 (46.15%) al masculino. Las edades de los pacientes fluctuaron entre 17 a 89 años, estando distribuidas de la siguiente manera: entre 10-20 años el 5.76%, de 21-30 años el 28.84%, de 31-40 años 17.30%, de 41-50 años 19.23% y mayores de 50 años el 28.84%.

La procedencia de las muestras se distribuyó de la siguiente manera: Cd. Victoria 77%, Cd. Mante 12%, Madero 3.8%, Reynosa 3.8%, Llera 1.9% y Matamoros 1.9%.

La resistencia o susceptibilidad a drogas se distribuyó de la siguiente manera: resistencia a estreptomicina 1 (1.96%), resistencia a estreptomicina e isoniacida 2 (3.92%), resistencia a isoniacida y rifampicina 1 (1.96%), resistencia a estreptomicina, isoniacida y rifampicina 1 (1.96%), resistencia a estreptomicina, isoniacida, rifampicina, etambutanol y pirazinamida 3 (5.88%), y susceptibles 44 (84.61%).

Se estableció un banco de ADN a partir de los 52 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. En la figura 2 se muestra el análisis de integridad de 24 muestras de ADN, realizado en geles de agarosa al 0.8% en solución amortiguadora TBE. Los carriles 15 y 17 mostraron claramente una buena integridad del ADN comparado con los carriles 1, 2, 5, 7-14, 16, 18-24 que presentaron un barrido parcial o total en los carriles 3, 4 y 6. Las posteriores reextracciones de todos los cultivos permitieron obtener una buena integridad y calidad del ADN. Una buena integridad del ADN

estuvo indicada por la presencia de ADN de alto peso molecular el cual es el adecuado para realizar los ensayos de RFLP. Las concentraciones de los ADN's geonómicos obtenidos de las diferentes muestras y evaluadas por espectrofotometría estuvieron entre 6 a 9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, con una relación de pureza de 260/280 entre 1.7 a 1.9.



Figura 2.- Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en solución amortiguadora TBE, de los ADN's geonómicos obtenidos a partir de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* mediante el protocolo de CTAB-NaCl. Se observa una buena integridad del ADN al presentarse una banda bien definida, en los carriles 15 y 17, los carriles 1, 2, 5, 7-14, 16, 18-24 presentaron un barrido parcial y los carriles 3, 4 y 6 un barrido total.

6.2 Implementación de los métodos de AFLP simplificado y RFLP-IS6110

Como primer paso en las reacciones de AFLP se seleccionó la enzima de restricción *XhoI* para realizar el corte del AND genómico, esto considerando que dentro de la secuencia IS6110 (GenBank No. X17348) se presenta este sitio de corte. Una idea similar fue la base en la implementación del método de genotipificación RFLP-IS6110 en *M. tuberculosis*, al utilizar la enzima *PvuII*, donde la secuencia IS6110 presenta un sitio de restricción para esta enzima.

En los ensayos de AFLP se emplearon los oligonucleótidos XA-1 y XA-2 para generar el adaptador sintético XA que presenta un extremo cohesivo al fragmento generado por *XhoI* y un extremo complementario al oligonucleótido XP-G empleado como único iniciador en la PCR, el cual tiene una G adicional en su extremo 3'. En un trabajo anterior, el programa SitesFinder permitió predecir la presencia de 11 posibles bandas de AFLP para la secuencia de ADN de la cepa de

referencia *M. tuberculosis* H37Rv resueltas bajo las condiciones de una electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y de 7.0 x 9.5 cm de longitud. El análisis de reproducibilidad para el método de AFLP simplificado se realizó utilizando ADN geonómico de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, a partir de siete diferentes extracciones y siete diferentes cultivos. En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos mediante el método de AFLP simplificado para tres ensayos. En todos los ensayos se obtuvieron 11 bandas de diferentes tamaños, donde 10 de ellas coincidieron con el patrón teórico obtenido con el programa computacional SitesFinder, y cuyos tamaños moleculares se muestran en la tabla I.

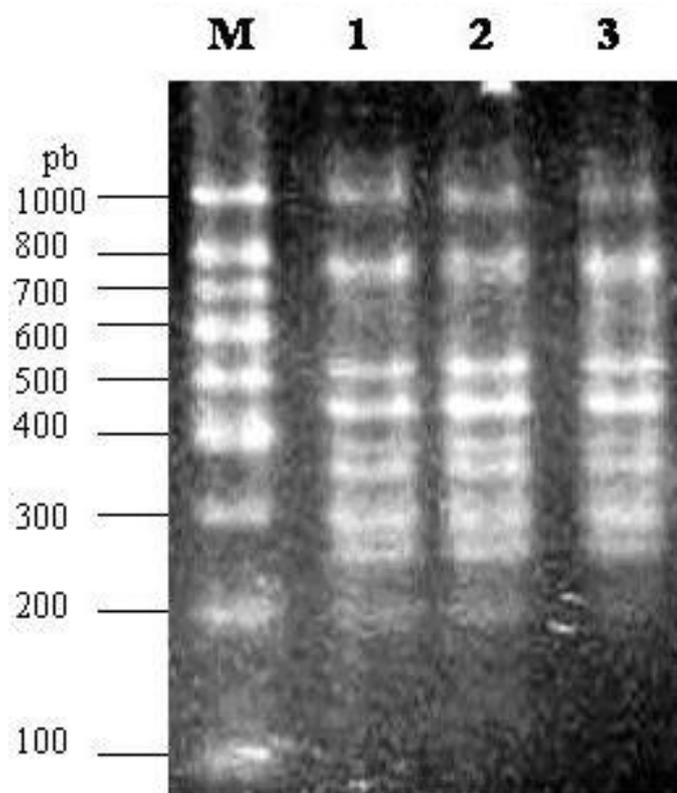


Figura 3.- Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en solución amortiguadora TBE, de tres ensayos de AFLP utilizando ADN genómico de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv. M: Marcador de tamaño molecular (Hyperladder IV); carriles 1-3: Productos amplificados mediante el método de AFLP simplificado. Tinción con SYBR GOLD y visualización con luz UV.

TABLA I

Valores del tamaño molecular en pares de bases de las bandas obtenidas por AFLP a partir de diferentes extractos de ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv. Se muestra el tamaño molecular promedio obtenido en los ensayos y el tamaño molecular teórico según el programa computacional SitesFinder.

No. de Banda	1er. AFLP (pb)	2do. AFLP (pb)	3er. AFLP (pb)	4o. AFLP (pb)	5o. AFLP (pb)	6o. AFLP (pb)	7o. AFLP (pb)	Promedio (pb)	Teórico* (pb)
1									1273
2	1010	1000	1000	1010	1000	1000	1010	1004	1041
3	814	814	814	814	814	814	814	814	879
4	747	747	695	747	747	695	747	732	721
5	525	525	521	525	525	521	525	524	591
6	450	450	450	450	450	450	450	450	471
7	388	388	388	388	388	388	388	388	382
8	356	356	354	356	356	354	356	355	
9	302	302	310	302	302	310	302	304	332
10	286	286	286	286	286	286	286	286	265
11	250	259	257	250	259	257	250	255	226
12	194	194	199	194	194	199	194	195	187

*Realizado con el programa SitesFinder.

Los patrones de bandas obtenidos con el método de AFLP simplificado también fueron reproducibles al utilizar ADN de tres aislamientos clínicos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Escherichia coli*. En la figura 4 se muestran los productos amplificados obtenidos mediante AFLP y donde se presentaron 4 (387, 289, 242 y 120 pb) y 6 (483, 403, 415, 271, 225 y 163 pb) bandas, respectivamente.

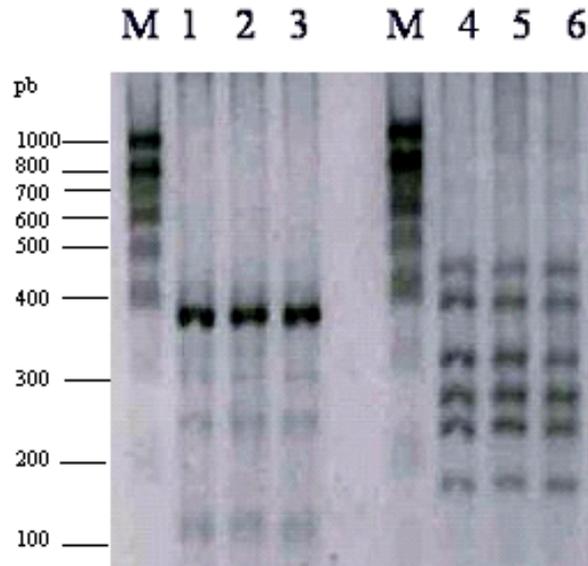


Figura 4.- Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en solución amortiguadora TBE de tres ensayos de AFLP obtenidos a partir del ADN de muestras de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* y *E. coli*. M: Marcador de tamaño molecular (Hyperladder IV); Carriles 1-3: AFLPs de *Pseudomonas aeruginosa*; Carriles 4-6: AFLP's de *Escherichia coli*. Tinción con SYBR GOLD y visualizado con luz UV.

Para el método de tipificación molecular mediante RFLP-IS6110 de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, se realizó un ensayo en donde se obtuvieron 16 bandas con un tamaño molecular entre 0.9 a 5.0 kpb que corresponden a las bandas esperadas para esta cepa.

6.3 AFLP simplificado y RFLP-IS6110 de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* del Estado de Tamaulipas

Posterior a la evaluación y confirmación de la reproducibilidad del método de AFLP simplificado y el método de RFLP-IS6110, se realizó el análisis de las 52 muestras de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. En la figura 5 se muestra un gel de agarosa al 2.5% de los productos amplificados obtenidos mediante el método de AFLP simplificado. Dicho análisis mostró un total de 24 bandas diferentes, de

tamaños moleculares entre 1537 y 122 pb mostrados en la tabla II, presentándose como mínimo 2 y un máximo de 13 bandas para una muestra determinada. Los vectores binarios de 24 dimensiones que describen el patrón de bandas de cada muestra analizada obtenidos mediante AFLP simplificado se presentan en la tabla II, en donde además se indica el número de cepa en forma ascendente, el número de identificación y tamaño de cada banda, el número de bandas encontrado para cada cepa y la frecuencia de aparición de cada banda en el global de las muestras analizadas. Las bandas que se presentaron con mayor frecuencia fueron las bandas 13 y 15 con un 50% y un tamaño molecular de 453 y 370 pb, seguido de la banda 17 con un 48% de frecuencia y un tamaño molecular de 300 pb.

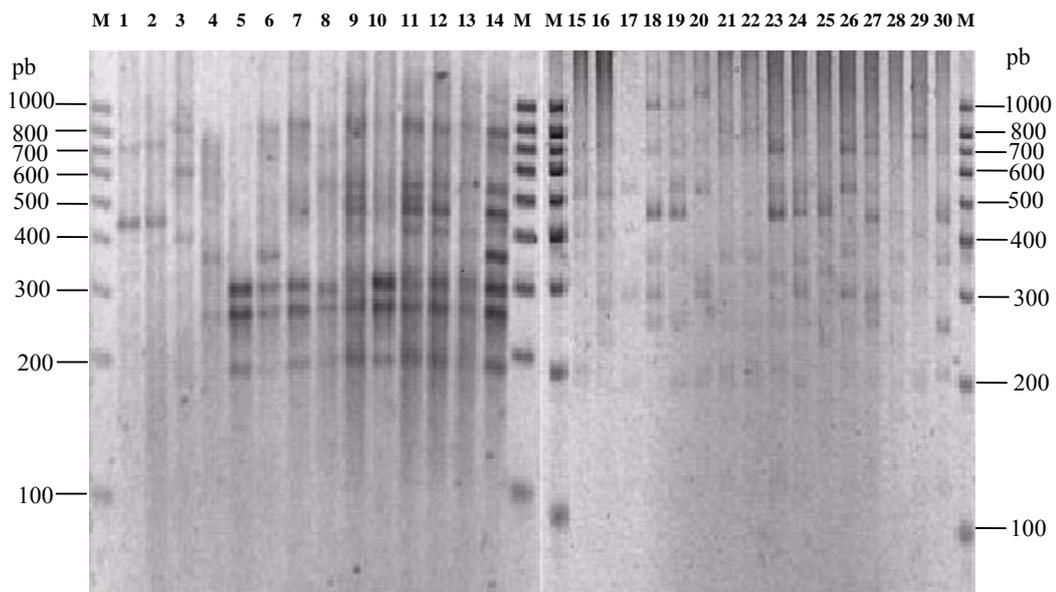


Figura 5.- Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% en solución amortiguadora TBE de 30 ensayos de AFLP obtenidos a partir del ADN de muestras de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. M: Marcador de tamaño molecular (Hiperladder IV), Carriles 1-30: AFLPs de *M. tuberculosis*. Tinción con SYBR GOLD y visualizado con Luz UV.

En la figura 6 se muestra la tipificación molecular obtenida para la detección de IS6110 a partir del ADN de 15 muestras de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. El análisis por RFLP para las 52 muestras de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* mostró un total de 32 bandas diferentes con un tamaño molecular comprendido entre 12.14 y 1.06 kpb. Se observó la presencia como mínimo de 3 bandas y como máximo de 15. El número de bandas que se presentaron con mayor frecuencia fue de 7 y 9 bandas, en 9 de las cepas; el tamaño molecular de las bandas que se presentaron con mayor frecuencia fue de 2.97 y 2.9 kpb en un 65% de los casos, tabla III. Los vectores binarios de 32 dimensiones que describen el patrón de bandas de cada muestra analizada obtenidos mediante RFLP se muestra en la tabla III, en donde además se indica el número de cepa en forma ascendente, el número de identificación y tamaño de cada banda, el número de bandas encontrado para cada cepa y la frecuencia de aparición de cada banda en el global de las muestras analizadas. La banda que se presentó con mayor frecuencia fue la número 18 con un 69.2 % y un tamaño molecular de 2.97 kpb seguido de la banda número 19 con un tamaño molecular de 2.9 kpb.

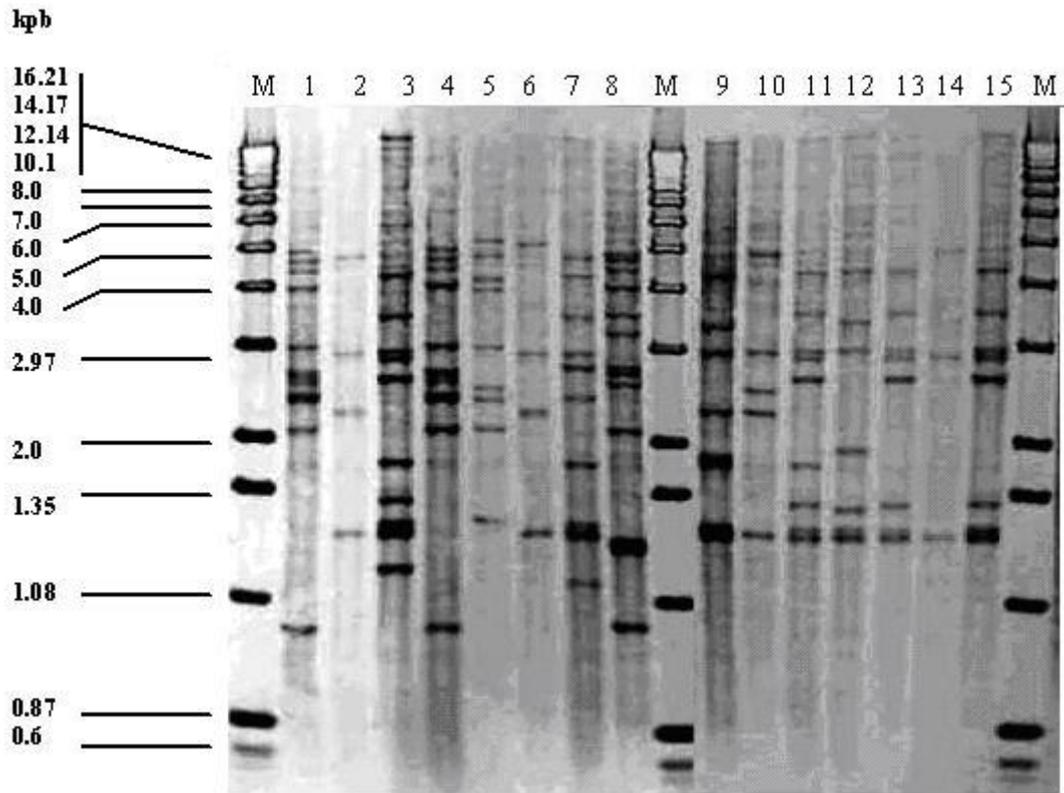


Figura 6.- Tipificación molecular obtenida a partir del ADN de muestras de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. M: Marcador de tamaño molecular de 1 kpb; Carriles 1-15, RFLP's de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

6.4 Poder de discriminación de muestras y tipos de patrones de AFLP y RFLP

Todas las muestras analizadas mostraron un patrón diferente entre sí tanto por AFLP como por RFLP, por lo tanto en ambos métodos de genotipificación se obtuvieron 52 patrones de bandas diferentes con un índice de discriminación de muestras del 100%.

6.5 Índices de similitud de pares de muestras obtenidos a partir de los patrones de AFLP y RFLP-IS6110

Las tablas IV y V muestran la matriz de índices de similitud del coeficiente de Jaccard entre pares de muestras a partir de los patrones de genotipificación obtenidos mediante el método de AFLP simplificado y de RFLP para IS6110 en los 52 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. La figura 7 muestra un histograma de frecuencias de los índices de similitud obtenidos para ambos métodos de genotipificación. Se calcularon un total de 1326 índices de similitud de pares de muestras mediante el método de AFLP y el mismo número de índices de similitud de pares de muestras mediante el método de RFLP-IS6110. Ambos métodos de genotipificación presentaron un patrón de distribución de frecuencias de índices de similitud semejante. El 45 y 44% de los índices de similitud de AFLP y RFLP-IS6110, respectivamente, fueron menores de 0.2. En el intervalo de 0.21 a 0.80 se encontraron el 55 y 56% de los índices de similitud de AFLP y RFLP-IS6110, respectivamente, indicando así que las cepas resultaron ser muy diferentes entre sí.

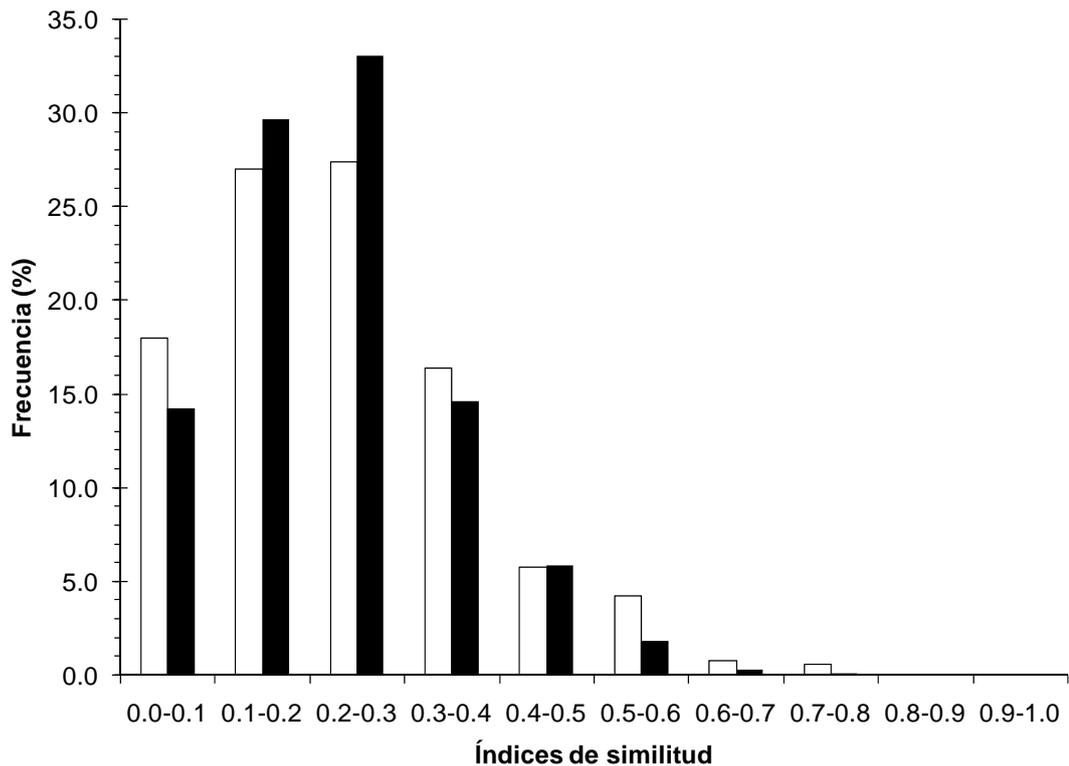


Figura 7.- Histograma de frecuencias de los 1326 índices de similitud entre pares de muestras agrupados en intervalos de 0.1 y obtenidos por el método de AFLP (□) y RFLP-IS6110 (■) a partir de 52 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

La figura 8 muestra la correlación entre los índices de similitud obtenidos por el método de AFLP y RFLP para IS6110. Cada punto representa la correlación del índice de similitud de AFLP y el correspondiente índice de similitud del método de RFLP-IS6110 para un determinado par de muestras. Los puntos sobre la diagonal representan valores iguales de ambos índices de similitud. Los puntos por encima de la diagonal son valores de índices de similitud de AFLP (IS_{AFLP}) menores que su correspondiente índice de similitud de RFLP-IS6110 (IS_{RFLP}), y los puntos por debajo de la diagonal indican lo opuesto. Este análisis de correlación entre los índices de similitud de ambos métodos de genotipificación mostró una distribución homogénea de puntos en todo el gráfico siendo los índices de similitud de AFLP menores que los de RFLP-IS6110 en un 49.1% de los casos y los índices de similitud

de AFLP mayores que los de RFLP en un 50.2% de los casos y sólo el 0.7% de los índices de similitud fueron iguales en ambos métodos de genotipificación.

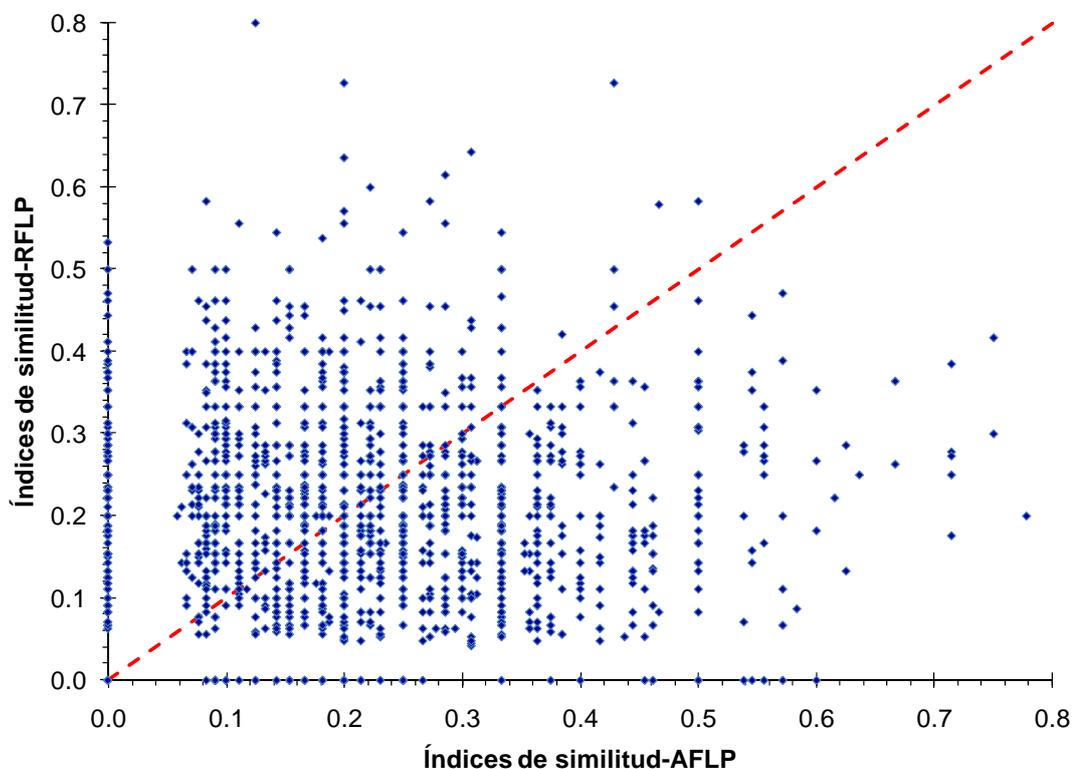


Figura 8.- Correlación entre los índices de similitud de los dos métodos de genotipificación (AFLP y RFLP-IS6110).

La figura 9 muestra el comportamiento de los índices de similitud al cambiar el criterio de igualdad de índices de similitud (diferencia máxima permitida entre 2 índices para considerarlos iguales). Al aumentar el criterio de igualdad de índices de similitud, el porcentaje de índices de similitud de AFLP menores que los índices de RFLP y de índices de similitud de AFLP mayores que los índices de RFLP es prácticamente el mismo.

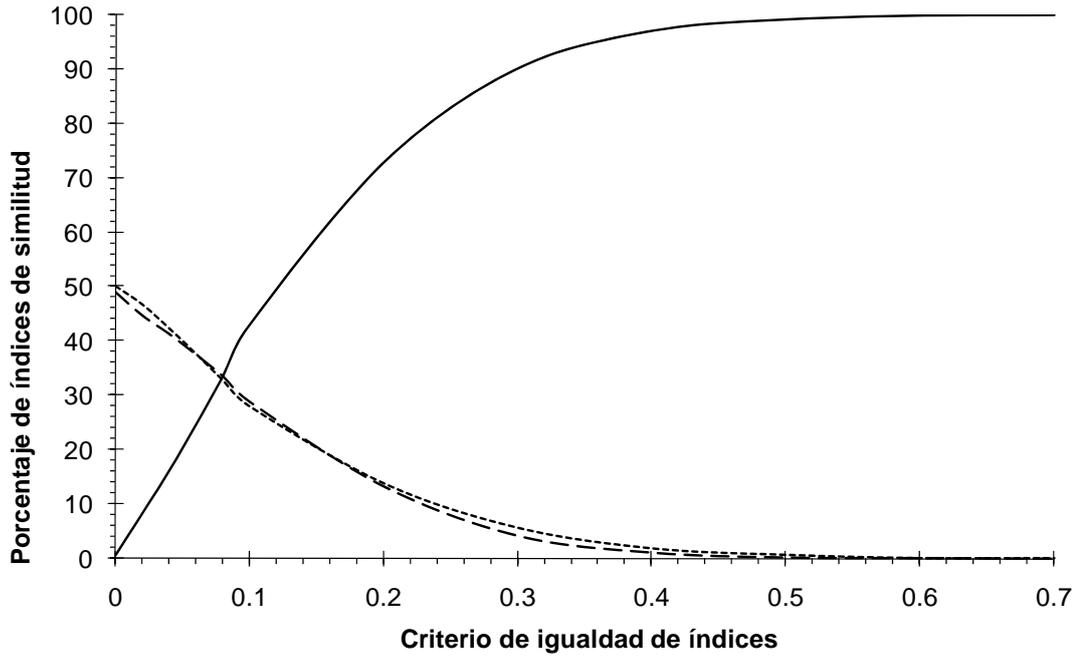


Figura 9.- Porcentaje de $IS_{AFLP} < IS_{RFLP}$ (---), $IS_{AFLP} = IS_{RFLP}$ (—) e $IS_{AFLP} > IS_{RFLP}$ (···), al cambiar el criterio de igualdad de índices de similitud.

Como que el número de índices de similitud comparados es alto (1326), este resultado indica una distribución aleatoria en el gráfico de la figura 9, sin una aparente distribución sesgada hacia algún grupo de comparación de pares de índices ($IS_{AFLP} < IS_{RFLP}$, $IS_{AFLP} = IS_{RFLP}$, $IS_{AFLP} > IS_{RFLP}$). Por lo tanto, existe una total ausencia de correlación entre los índices de similitud de los dos métodos de genotipificación evaluados.

6.6 Análisis de agrupamiento de muestras de los aislamientos clínicos en base a los patrones de bandas de AFLP y RFLP-IS6110

Los análisis de agrupamiento de muestras expresados en forma de dendrograma permitieron generar siete grupos de muestras mediante el método de

AFLP simplificado y siete grupos mediante el método de RFLP-IS6110, que se denominaron con las letras A a la G (figura 10 y 11).

Los grupos de muestras generados mediante el método de AFLP presentaron cada uno de ellos diferente número de cepas, agrupándose en 1, 3, 8, 2, 20, 8 y 10 muestras (figura 10). En el caso de los grupos de muestras obtenidos mediante el método de RFLP, presentaron 3, 8, 3, 13, 20, 1 y 4 muestras (figura 11).

La tabla VI muestra una comparación de los dos análisis de agrupamiento de muestras. Excepto para el grupo A y F de los métodos de AFLP y RFLP-IS6110, respectivamente, todos los grupos de muestras de AFLP incluyeron muestras de diferente grupo de RFLP-IS6110 y *vice versa*, indicando así una ausencia de correlación entre los dos análisis de agrupación de muestras.

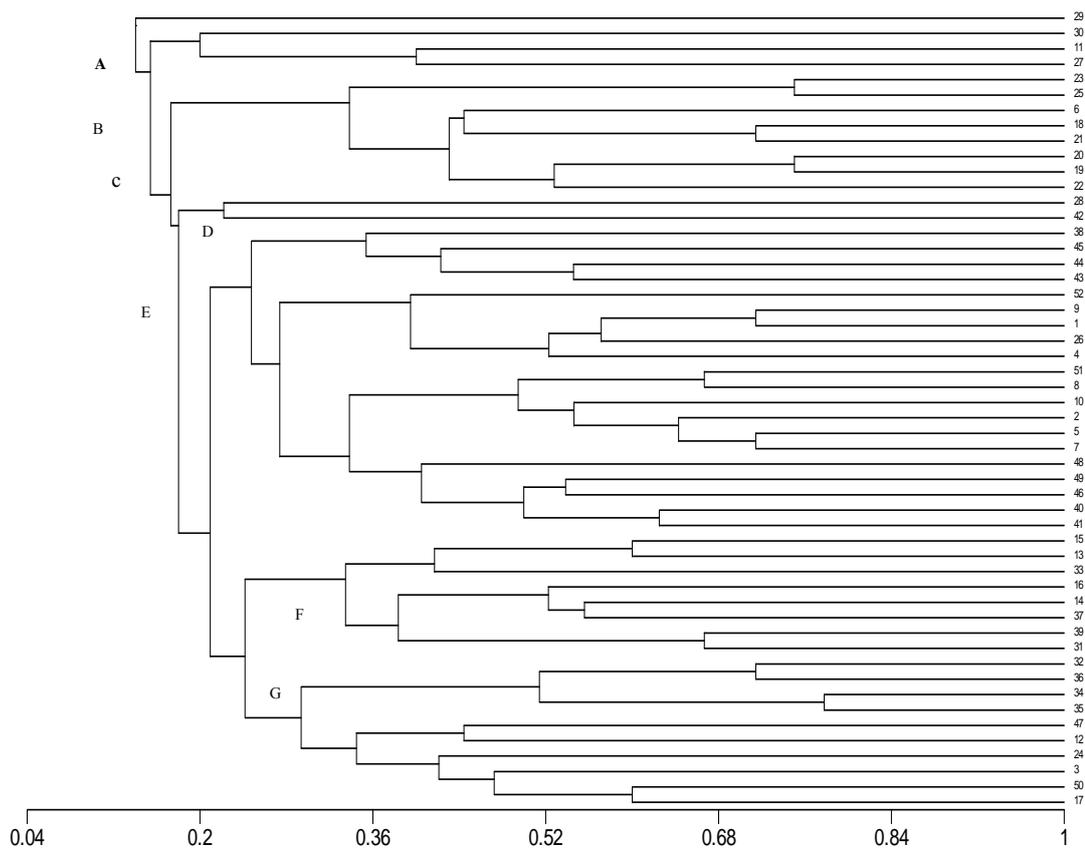


Figura 10.- Dendrograma que muestra los grupos de cepas obtenidos en base al patrón de bandas generado mediante el método de AFLP simplificado en 52 muestras de ADN de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

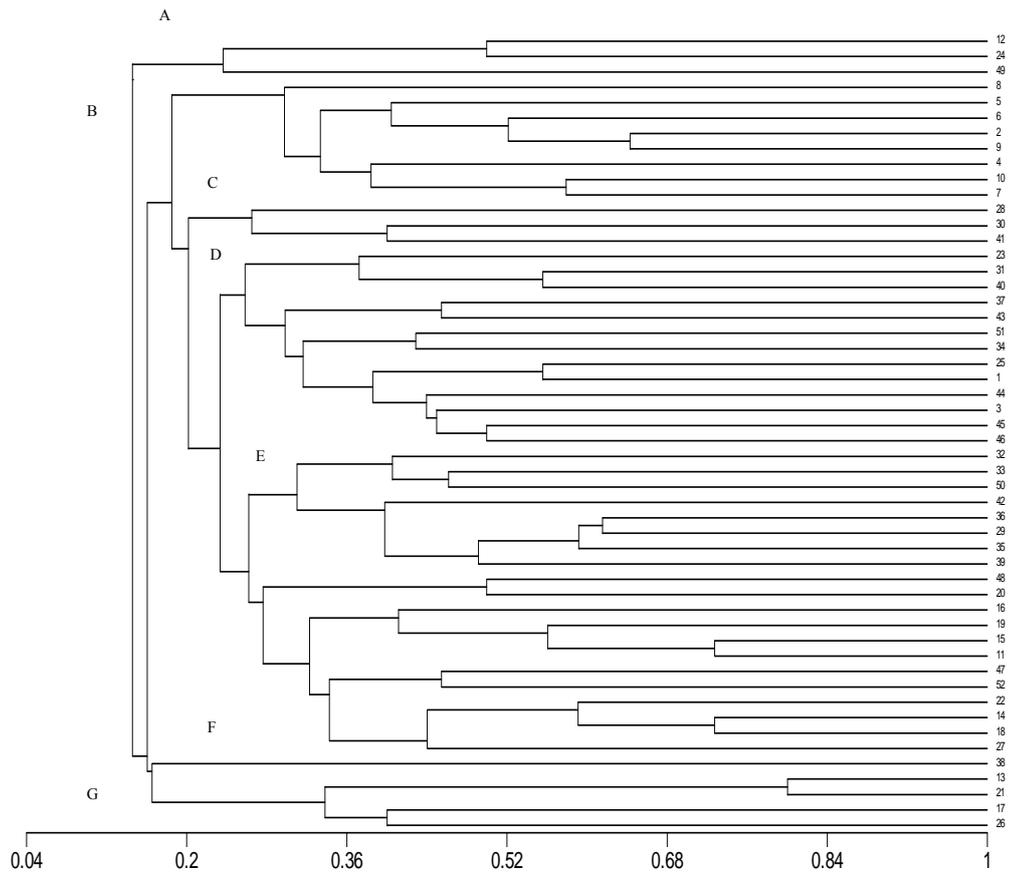


Figura 11.- Dendrograma que muestra los grupos de cepas obtenidos en base al patrón de bandas generado mediante el método de RFLP para IS6110 en 52 muestras de ADN de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*.

La tabla VI muestra la comparación entre el análisis de los clusters de ambos métodos, a excepción de los clousters obtenidos para el grupo A de AFLP y el grupo F de IS6110, todos los agrupamientos obtenidos por IS6110 y AFLP incluyen aislamientos de diferentes grupos indicando de esta manera una ausencia de correlación entre ambos resultados.

Tabla VI. Comparación de los dos análisis de agrupamiento de muestras.

Grupos de AFLP	Grupos de RFLP-IS6110	No. de muestras en un grupo de AFLP y RFLP-IS6110
A	E	1
B	C	1
	E	2
C	B	1
	D	2
	E	4
	G	1
D	C	1
	E	1
E	A	1
	B	7
	C	1
	D	7
	E	2
	F	1
	G	1
F	D	2
	E	5
	G	1
G	A	2
	D	2
	E	5
	G	1

6.7 Correlación de los grupos de muestras de los tipos de patrones de AFLP y RFLP con la información de los pacientes estudiados

El 95 y el 5% de las muestras agrupadas mediante el método de AFLP en el grupo E (grupo con mayor número de muestras, 20 cepas) provinieron de la localidad de Ciudad Victoria (19 cepas) y del Municipio de Llera (1 cepa), respectivamente.

Por otro lado, el 90% de las muestras agrupadas mediante el método de RFLP-IS6110 en el grupo E (grupo con mayor número de muestras, 20 cepas) fueron de Ciudad Victoria (18 cepas). El 5% restante provinieron de los Municipios de Madero y de Mante, Tamaulipas (1 cepa en cada caso).

En el análisis de agrupamiento mediante el método de AFLP, 3 de las 8 cepas que presentaron resistencia a algún agente antituberculoso se agruparon en el grupo E, 1 resistente a estreptomycin, 1 resistente a estreptomycin e isoniazida y 1 resistente a estreptomycin, isoniazida, etambutol, rifampicina y pirazinamida. En el grupo G se agruparon otras 3 de las 7 cepas resistentes, 1 resistente a estreptomycin e isoniazida, otra resistente a estreptomycin, isoniazida y rifampicina y 1 resistente a estreptomycin, isoniazida, etambutol, rifampicina y pirazinamida. En el grupo B se presentó 1 cepa resistente a estreptomycin, isoniazida, etambutol, rifampicina y pirazinamida. Por último en el grupo F se presentó 1 cepa resistente a isoniazida y rifampicina.

En el análisis de agrupamiento mediante el método de RFLP-IS6110, la distribución de las cepas resistentes fue de la siguiente manera: en el grupo con el mayor número de muestras (grupo E, 20 cepas) se presentaron 3 cepas resistentes a estreptomycin, isoniazida, etambutol, rifampicina y pirazinamida, una cepa resistente a isoniazida y rifampicina; en el grupo D se presentó 1 cepa resistente a estreptomycin, isoniazida y rifampicina; en el grupo B se presentaron 2 cepas resistentes, una cepa resistente a estreptomycin y otra resistente a estreptomycin e isoniazida; en el grupo A se presentó 1 cepa resistente a estreptomycin e isoniazida.

La distribución de las cepas en los grupos de muestras de ambos métodos de genotipificación no mostró una correlación para los datos de género, edad o procedencia de los pacientes, ni de la resistencia a agentes antituberculosos de cada una de las cepas estudiadas.

6.8 Comparación de la distribución de bandas teóricas de AFLP y RFLP-IS6110 en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv

La figura 12 muestra una comparación de un histograma de porcentaje de frecuencias de la secuencia de inserción IS6110 dentro del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, descrito en la literatura (Philipp *et al.*, 1996) y que indica las posiciones de las secuencias IS6110 y frecuencias de los fragmentos teóricos de tamaño molecular entre 100 y 1500 pb obtenidos mediante AFLP utilizando la enzima *Xho*I, el adaptador XA y el iniciador XP-G, utilizando un simulador para AFLP (Bikandi *et al.*, 2004).

El 93% de las 16 repeticiones de la secuencia IS6110 se encuentra entre los 1500 a 4000 kpb del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Por el contrario, el simulador de AFLP predijo 32 bandas teóricas mediante el método de AFLP simplificado distribuidas uniformemente a lo largo de todo el genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

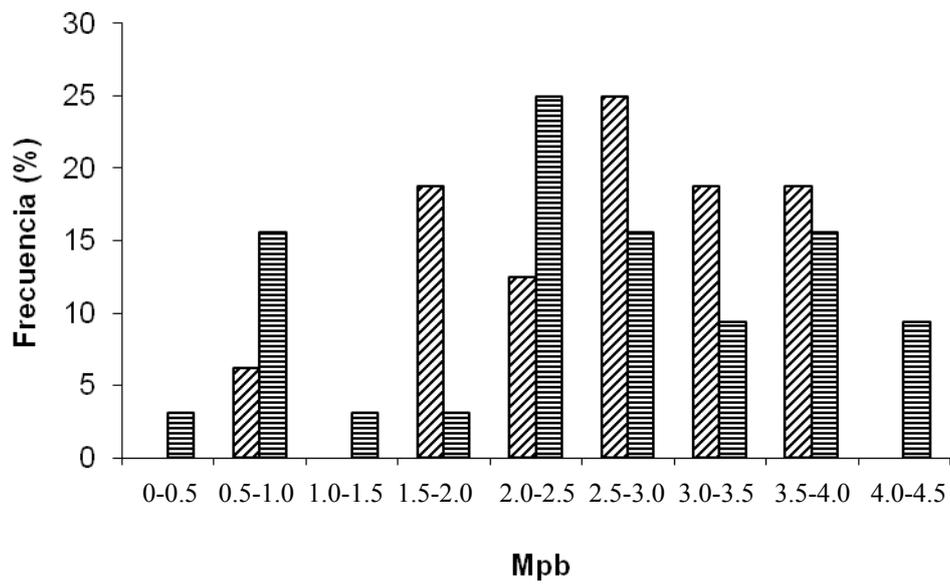


Figura 12.- Histograma de porcentaje de frecuencias de la secuencia de inserción IS6110 (▨) y frecuencias de los fragmentos teóricos de tamaño molecular entre 100 y 1500 pb obtenidos mediante AFLP (▨).

7 DISCUSIÓN

El polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) fue propuesto como un nuevo método de tipificación molecular utilizando ADN genómico (Vos *et al.*, 1995; Lyn y Kuo, 1995). Este método ha mostrado una alta reproducibilidad y se basa en la amplificación selectiva mediante PCR de los fragmentos de restricción obtenidos en la digestión del ADN genómico al utilizar dos enzimas de restricción, ligación de adaptadores específicos al sitio de restricción y amplificación por PCR con iniciadores dirigidos hacia los adaptadores y con uno o más nucleótidos selectivos. Los productos amplificados obtenidos son evaluados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida similares a los utilizados en secuenciación de ADN. Los fragmentos obtenidos pueden ser analizados simultáneamente y su número es dependiente de la resolución y detección del sistema, el cual permite obtener de 50 a 100 bandas. Al incrementar el número de nucleótidos selectivos en los iniciadores utilizados en el PCR, se disminuye el número de bandas obtenidas y junto con la complejidad del genoma estudiado son determinantes para obtener el polimorfismo por AFLP.

Generalmente el método de AFLP se realiza con dos enzimas de restricción, dos o más adaptadores, varios iniciadores de PCR, geles de poliacrilamida y detección por radioactividad o fluorescencia (Vos *et al.*, 1995). Un método de AFLP simplificado fue propuesto por primera vez para la tipificación de abejas melíferas (Suazo and Hall, 1999). De forma similar, para el diseño del método de AFLP simplificado aplicable a *M. tuberculosis* se pensó en emplear una sola enzima de restricción, que cortara una sola vez dentro de la secuencia IS6110, un adaptador y un iniciador de PCR de tal forma que a partir del ADN genómico de la cepa de

referencia *M. tuberculosis* H37Rv se generaran entre 10 y 15 bandas en un gel de agarosa al 2.5% de 7.0 x 9.5cm. Así, con ayuda del programa SitesFinder, se decidió usar la enzima *XhoI* y un iniciador de PCR con sólo una G como oligonucleótido de selección (Viader-Salvadó *et al.*, 2002). El método de AFLP simplificado desarrollado y evaluado en el presente trabajo emplea solo una enzima de restricción, un adaptador de doble cadena, un iniciador de PCR, electroforesis en geles de agarosa y una técnica de tinción simple utilizando bromuro de etidio o SYBR Gold.

Recientemente ha sido reportado un programa similar a SitesFinder que permite realizar un análisis de AFLP *in silicio* de genomas bacterianos completos (Bikandi *et al.*, 2004) y se encuentra disponible en Internet (<http://insilicio.ehu.es/AFLP's>).

El método de tipificación de *M. tuberculosis* empleando RFLP-IS6110 permite la detección de variaciones en el número de repeticiones de la secuencia IS6110 en el genoma de *M. tuberculosis* (van Embden, 1993). Para llevar a cabo este método de genotipificación se realiza una digestión del ADN genómico de *M. tuberculosis* con una enzima de restricción *PvuII*, los fragmentos obtenidos son separados mediante electroforesis en un gel de agarosa y posteriormente transferidos a una membrana de hibridación, la cual en presencia de una sonda específica para la secuencia IS6110 marcada con quimioluminiscencia permite generar una imagen en una película radiográfica. Cada copia de la secuencia IS6110 produce una banda generando un patrón, el cual si presenta más de 7 copias o bandas permite una buena discriminación entre aislamientos clínicos, no así con 6 ó menos copias (Radhakrishnan *et al.*, 2001). Este método ha resultado ser muy laborioso y complicado comparado con el método de AFLP simplificado, además de que la cantidad requerida de ADN es mucho mayor (3-4 µg), por lo que se requiere un

cultivo abundante de micobacterias, lo cual resulta difícil de obtener en aislamientos clínicos. El método de RFLP-IS6110 ha sido reportado como un método con baja reproducibilidad en algunos laboratorios (Kremer *et al.*, 1999), haciendo que la tipificación no sea 100% reproducible. Este método ha permitido evaluar eventos de transmisión así como confirmar la contaminación cruzada en laboratorios (Blanc *et al.*, 1998), pero se ha reportado que cepas de *M. tuberculosis* con ninguna ó muy pocas copias del IS6110 el método es no adecuado (Radhakrishnan *et al.*, 2001). En la India se ha demostrado la presencia de cepas con ninguna o muy bajo número copias de la secuencia IS6110 (Radhakrishnan *et al.*, 2001).

En los 52 aislamientos clínicos analizados, ambos métodos de genotipificación (AFLP simplificado y RFLP-IS6110) mostraron un poder de discriminación del 100%. Sin embargo, los índices de similitud y los dendrogramas de agrupamiento de cepas obtenidos del análisis de los patrones de bandas generados por los dos métodos de genotipificación resultaron ser diferentes. Este resultado es debido probablemente a que el análisis por AFLP evalúa variaciones en todo el genoma de *M. tuberculosis*, tal como lo mostró el simulador de productos amplificados por AFLP del genoma de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv utilizando la enzima *XhoI*, el adaptador XA y el iniciador XP-G, mientras que por RFLP-IS6110 sólo se evalúa la presencia o ausencia de copias de la secuencia IS6110, las cuales no se encuentran distribuidas homogéneamente en el genoma de la cepa de referencia H37Rv (Philipp *et al.*, 1996).

El método de genotipificación de RFLP-IS6110 resultó ser mucho más laborioso y complicado que el método de AFLP simplificado. La cantidad de ADN requerida para llevar acabo el método de RFLP-IS6110 es alta (3-4 µg), para lo cual se requiere de un cultivo de micobacterias abundante. Este punto fue difícil de

conseguir para muchos de los aislamientos clínicos. Además de la cantidad del ADN, su integridad es esencial para la obtención de buenos resultados en la tipificación. La presencia de ADN íntegro está relacionada con la presencia de bandas de alto peso molecular. La ausencia de bandas de alto peso molecular en el análisis de RFLP-IS6110 puede también ser debido a una pobre transferencia del ADN a la membrana. En nuestro caso, se verificó la transferencia del ADN del gel de agarosa a la membrana utilizando la luz UV después de la transferencia y siempre se procuró que el ADN utilizado se encontrara íntegro.

Braden *et al.* (Braden *et al.*, 2002) sugirieron que se puede presentar la replicación o delección de la secuencia IS6110 en subcultivos de las micobacterias durante períodos cortos de tiempo. En nuestro caso, los subcultivos de micobacterias se realizaron principalmente por problemas de contaminación con hongos debido a los tiempos prolongados de crecimiento e incubación. Al tener de cada muestra varios subcultivos se garantizaba al final una buena cantidad de ADN.

La variabilidad en la identificación de las bandas se puede presentar debido a la intensidad o ancho de la banda de tal manera que una banda pudiera en realidad estar compuesta por dos o más bandas muy cercanas. Los tiempos de exposición de las autoradiografías y las intensidades de las bandas están estrechamente relacionadas generando una alta subjetividad al tener bandas de baja intensidad ausentes, o bien de alta intensidad y que representan en realidad a más de una banda. En estos casos la experiencia y capacidad técnica del personal son muy importantes y trascendentes en los resultados finales. La temperatura generada durante el corrimiento electroforético puede afectar la movilidad de los fragmentos del ADN resultando la estimación de diferentes tamaños moleculares. Esto se pudiera minimizar al incluir estándares internos, como muestras de ADN de cepas cuyo

patrón de bandas sea bien conocido, aunque se ha demostrado que el análisis por RFLP-IS6110 para una misma cepa o incluso para una misma muestra de ADN realizado por diferentes laboratorios puede generar patrones diferentes (Braden *et al.*, 2002).

La técnica de revelado mediante hibridación con una sonda marcada específica para la secuencia IS6110 resultó ser muy elaborada y costosa, y en varios casos los resultados finales no fueron los esperados, por lo que fue necesario reiniciar el protocolo desde la extracción del ADN o bien a partir de la membrana de hibridación.

La cantidad de ADN requerida para el método de AFLP simplificado fue de 0.2 µg, o sea 15 a 20 veces menos que en RFLP-IS6110, por lo que no se requiere partir de un cultivo muy abundante y por lo tanto se disminuye el tiempo de incubación de las micobacterias. La calidad e integridad del ADN siempre serán importantes, pero en nuestro caso muestras con ADN parcialmente degradado mostraron resultados reproducibles, probablemente debido a que el método de AFLP simplificado solo analiza bandas menores de 1500 pb. La evaluación de la presencia e identificación de las bandas se pudo realizar en gel de agarosa, la calidad de la agarosa fue importante para la obtención de una buena resolución de bandas. Se empleó una tinción simple con SYBR Gold o bromuro de etidio y visualización con luz UV. El tiempo de trabajo total se reduce a la mitad respecto al tiempo empleado para llevar a cabo el método de RFLP-IS6110. El método de tinción empleado resultó ser sencillo y con un bajo costo. Los resultados finales se pueden observar casi inmediatamente después de hacer el gel de electroforesis, de tal forma que de ser necesaria repetir la electroforesis se podría realizar en ese momento. La identificación de las bandas se pudo realizar sin dificultad ya que la intensidad de las

mismas permitió obtener una imagen digitalizada para su procesamiento y estimación de los tamaños moleculares. La temperatura generada durante el corrimiento electroforético no fue alta, por lo que no afectó la movilidad de los fragmentos del ADN. Se logró demostrar la reproducibilidad y confiabilidad del método de AFLP simplificado a partir de diferentes extracciones de ADN de la cepa de referencia H37Rv y comparándolos con resultados *in vitro* y los obtenidos anteriormente, usando el programa SitesFinder.

Las modificaciones realizadas al método tradicional de AFLP (Vos *et al.*, 1995) que generaron el método de AFLP simplificado resultaron ser de gran importancia, ya que se logró la obtención de 24 bandas con un tamaño molecular comprendido entre 1537 y 122 pb que pueden ser evaluadas en sistemas de detección sencillos, lo cual permitió la tipificación de las cepas estudiadas, resultando en 43 (83%) de las muestras analizadas seis o más bandas.

La cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv analizada por RFLP-IS6110 mostró el patrón de bandas característico descrito para la misma, lo cual asegura la buena implementación de este método.

Los patrones de bandas para IS6110-RFLP que presentaron más de 6 bandas (37 aislamientos) se compararon con los patrones de bandas prototipos reportados por Cowan y Crawford (Cowan y Crawford, 2002). Las bandas de RFLP del patrón de RFLP-IS6110 del prototipo W-Beijing se presentaron en un 50-85% de las bandas de 29 aislamientos. Adicionalmente, 50 a 66% de bandas del RFLP de 4 aislamientos se presentaron en el patrón del prototipo B y 60 a 71% de las bandas de RFLP de 3 aislamientos se presentaron en el prototipo D. Finalmente las bandas de RFLP del prototipo E se encontraron en el 71% de las bandas de un aislamiento y el 55% de las

bandas de un aislamiento se encontraron en el patrón de bandas de RFLP del prototipo A.

El 29% (15 de 52) de las muestras presentaron menos de seis bandas en su patrón de RFLP-IS6110. En estos casos se ha sugerido utilizar un segundo método de tipificación por no considerarse el método de RFLP-IS6110 suficientemente informativo (Indulakshmi *et al.*, 2001; Ellis *et al.*, 2002).

La estabilidad de la secuencia IS6110 es de aproximadamente de 3 a 10 años (Pfyffer *et al.*, 1998; de Boer *et al.*, 1999; Warren *et al.*, 2002), esto basado en la tipificación seriada de muestras de pacientes individuales. Nosotros encontramos la pérdida de una banda de 1.4 kpb en la muestra de un paciente bajo tratamiento en una diferencia de muestreo de 2 años. Esto puede estar influido por el tiempo de inicio de la enfermedad, de muestreo y proporcional al programa de control (de Boer *et al.*, 1999). El paciente bajo estudio era un recluso del CERESO de Ciudad Victoria. Este resultado muestra la importancia de realizar estudios que permitan dar un seguimiento de los pacientes para determinar si se presentan cambios en el transcurso del tiempo o bien para evaluar si los programas de control han resultado ser eficientes.

El método de AFLP con detección con fluorescencia y utilizando dos enzimas de restricción y dos juegos de iniciadores de PCR ha sido empleado para tipificar aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. Con este método, se pudieron tipificar cepas con cinco o menos copias de la secuencia IS6110, por lo que se consideró que el método de AFLP fluorescente puede contribuir al estudio epidemiológico y micro evolutivo de *M. tuberculosis* (Goulding *et al.*, 2000). La alta variabilidad observada por AFLP en grupos de cepas de *M. tuberculosis* con patrones de RFLP-IS6110 idénticos sugiere que estos procesos micro evolutivos no son de transmisión reciente

ya que se sabe que existe poca variabilidad genética en el genoma de *M. tuberculosis* (Ruiz *et al.*, 2003). Utilizando dos enzimas de restricción y la combinación de cuatro iniciadores de PCR, se ha descrito la obtención de 81 bandas de 80-380 pb, obteniendo un promedio de 14 bandas por cepa con lo que se ha considerado al método de AFLP como un método complementario al RFLP-IS6110 en la tipificación de *M. tuberculosis* (Ruiz *et al.*, 2003).

La genotipificación de aislamientos clínicos se ha utilizado para la identificación de transmisiones recientes de tuberculosis (Crawford, 2003), basándose en que los genotipos iguales representan una transmisión reciente mientras que la presencia de genotipos únicos indica una reactivación de la infección. De los aislamientos estudiados en el presente trabajo, todos presentaron diferentes genotipos por ambos métodos de genotipificación, indicando una posible reactivación de la tuberculosis en la población de pacientes estudiados. Recientemente, varios autores compararon los métodos de AFLP convencional y de RFLP-IS6110 usando aislamientos de *M. tuberculosis* (Ahmed *et al.*, 2004, Goulding *et al.*, 2000; Huys *et al.*, 2000, Kassama *et al.*, 2006; Krishnan *et al.*, 2007, Ruiz *et al.*, 2003, Sims *et al.*, 2002; Van den Braak *et al.*, 2004) e hicieron referencia a las ventajas de AFLP sobre el RFLP-IS6110. Las principales ventajas que se encontraron fueron la facilidad del método, la pequeña cantidad de ADN requerida y la reproducibilidad del método. Los autores intentaron correlacionar los grupos de AFLP con los obtenidos por RFLP, pero ninguno de ellos correlacionó los índices de similitud de ambos métodos de genotipificación, siendo esto más exacto que una simple inspección entre los dendrogramas obtenidos por ambos métodos.

En los 52 aislamientos analizados por ambos métodos de genotipificación (AFLP simplificado y RFLP-IS6110) en el presente trabajo, ambos métodos

mostraron un poder de discriminación de muestras del 100% y una distribución similar de los 1326 índices de similitud calculados. Sin embargo, el estudio de correlación entre los índices de similitud de ambos métodos de genotipificación mostró una distribución aleatoria a lo largo de los tres grupos de comparación ($IS_{AFLP} < IS_{RFLP}$, $IS_{AFLP} = IS_{RFLP}$, $IS_{AFLP} > IS_{RFLP}$), lo cual indica una total ausencia de correlación entre los índices de similitud de los dos métodos de genotipificación evaluados. Ambos métodos revelaron polimorfismos independientes, generando diferentes tipos de dendrogramas.

Con el método de AFLP simplificado se esperaría un mayor poder de discriminación de muestras que con el método de RFLP-IS6110, ya que el elemento móvil IS6110 no tiene relación en el proceso evolutivo de las cepas, por lo menos en la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, donde el 93% de las secuencias de IS6110 se distribuye en copias ubicadas entre los 1500 a 4000 kpb del genoma (Philipp *et al.*, 1996), mientras que los sitios de restricción para la enzima *Xho*I utilizada en los ensayos del AFLP simplificado se distribuyen uniformemente en todo el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Por lo tanto, el método de AFLP simplificado evalúa las variaciones genéticas en el genoma de *M. tuberculosis* generados por la acumulación de sustituciones de bases, como lo mostró el simulador *in silicio* de AFLP (Bikandi *et al.*, 2005), usando la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, la enzima de restricción *Xho*I, y un iniciador con una G en el extremo 3'. Además, el poder de discriminación del método de AFLP simplificado podría aumentar si también se emplea un iniciador XP-C, que tendría una C en lugar de una G en el extremo 3', y se combinan ambos resultados, tal como se ha descrito para el método convencional de AFLP (Blears *et al.*, 1998), ya que el programa SitesFinder predice la obtención de 15 bandas resueltas en el gel de agarosa al utilizar el iniciador XP-C. Estas

características, junto con su rapidez, bajo costo, reducción de tiempo debido a la pequeña cantidad de ADN necesario y el uso de sólo una enzima de restricción, un adaptador de doble cadena, un iniciador de PCR, y un sistema sencillo de detección, demuestran cómo este método de AFLP simplificado compite favorablemente con el método de RFLP-IS6110 o métodos convencionales AFLP. El método simplificado de AFLP, por tanto, resulta una muy buena opción en la genotipificación de aislamientos de *M. tuberculosis*, especialmente en los países en desarrollo o cuando es usado como método de tamizaje inicial.

8 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluó un método de AFLP simplificado y se comparó con el método de RFLP-IS6110. Debido a la relativa rapidez, bajo costo, reducción de tiempo así como a la pequeña cantidad de ADN necesario y el uso de sólo una enzima de restricción, un adaptador de doble cadena, un iniciador de PCR, y un sistema sencillo de detección, el método de AFLP simplificado compite favorablemente con el método de RFLP-IS6110 o métodos convencionales AFLP.

Con el método de AFLP simplificado se esperaría un mayor poder de discriminación de muestras que con el método de RFLP-IS6110, ya que por lo menos en la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv el 93% de las secuencias de IS6110 se distribuye entre los 1500 a 4000 kpb del genoma, mientras que los sitios de restricción para la enzima *XhoI* utilizada en los ensayos del AFLP simplificado se distribuyen uniformemente en todo el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

Las modificaciones realizadas al método tradicional de AFLP que generaron el método de AFLP simplificado resultaron ser de gran importancia, ya que se logró la obtención de 24 bandas con un tamaño molecular comprendido entre 1537 y 122 pb que pueden ser evaluadas en sistemas de detección sencillos, lo cual permite la tipificación de cepas de *M. tuberculosis*.

En los 52 aislamientos de *M. tuberculosis*, los dos métodos de genotipificación mostraron un poder de discriminación de muestras del 100% y una distribución similar de los 1326 índices de similitud calculados. Sin embargo, los

índices de similitud de ambos métodos de genotipificación mostraron una total ausencia de correlación. Ambos métodos de genotipificación revelaron polimorfismos independientes, generando diferentes tipos de dendrogramas.

Se aplicaron por primera vez métodos moleculares de genotipificación a aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* del estado de Tamaulipas, detectando 29 cepas del prototipo W-Beijing, 4 cepas del prototipo B, 3 cepas del prototipo D, 1 cepa del prototipo E y otra cepa del prototipo A.

Debido a que todos los aislamientos de *M. tuberculosis* estudiados en el presente trabajo presentaron diferentes genotipos por ambos métodos de genotipificación, probablemente la población de pacientes estudiados presenten un proceso de reactivación de la tuberculosis.

APÉNDICE

Preparación de medios, soluciones y reactivos.

Solución TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).

Pesar 1.2 g de Tris-base y 372 mg de EDTA, Disolver en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 y completar a 1000 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15 lbs/15 minutos y almacenar a 4°C.

Solución TE 0.1 (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM).

Pesar 1.2 g de Tris-base y 37.2 mg de EDTA, Disolver en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 y completar a 1000 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15 lbs/15 minutos almacenar a 4°C.

Solución de lisozima 10 mg/mL

Pesar 10 mg de lisozima y disolver en 1 mL de agua destilada. Almacenar a -20°C. Preparar al momento de usar.

SDS 10 % (Duodecil sulfato de sodio o Laurilsulfato de sodio).

Pesar 10.0g de SDS y disolver en 100 mL de agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de proteinasa K 10 mg/mL.

Pesar 10 mg de proteinasa K y disolver en 1 mL de agua destilada. Almacenar a -20°C.

NaCl 5 M

Pesar 29.2 g de NaCl y disolver en 100 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15lbs/15min. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de CTAB/NaCl.

Pesar 4.1g de NaCl y 10.0g de CTAB (Bromuro de N-hexadecil N,N,N-trimetil amonio) y disolver en 80mL de agua destilada calentando a 65°C. Ajustar a 100 mL con agua destilada y almacenar a temperatura ambiente.

Solución Sevag (cloroformo/ alcohol isoamílico; 24:1)

Mezclar 40 mL de alcohol isoamílico y 960 mL de cloroformo

Etanol al 75%.

Mezclar 75 mL de etanol absoluto con 30 mL de agua destilada. Almacenar a 4°C.

Buffer de corrida Azul (5X).

Pesar 0.3 g de Tris-base, 0.1 g EDTA y 25 mg de bromofenol azul. Disolver en 3 mL de agua destilada. Añadir 5 mL de glicerol. Ajustar el pH a 8 en un pHmetro y llevar a 10 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15lbs/15min.

Solución de ADN de fago Lambda 5 ng/ml

Se diluyen 10 µl de ADN del fago Lambda 750 ng/µl en 1490 µl de agua ultra pura.

Buffer TBE (Tris-borato-EDTA).

Pesar 10.8 g de Tris-base, 5.5 g de Acido Bórico y 0.74 g de EDTA. Disolver en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 y aforar a un volumen de 1000 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15lbs/15min.

Bromuro de Etidio (EtBr) 10 mg/mL.

Disolver 0.1 g de EtBr en 10 mL de agua destilada. Almacenar a 4°C.

Acetato de amonio 7.5 M

Pesar 578.1 g de Acetato de amonio y disolver en 1000mL agua destilada.

Solución desnaturalizante.

Disolver 87.66 g de NaCl y 20 g de NaOH en 800 mL de agua destilada, aforar a un volumen de 1000 mL.

Solución de neutralización.

Disolver 87.66 g de NaCl y 60.55 g de Tris base en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con HCl y aforar a un volumen de 1000 mL.

Buffer de transferencia SSC 20X.

Pesar 17.53 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio. Disolver en 80 mL de agua destilada.

Ajustar a pH 7.0 con NaOH 5M y aforar a 100 mL, esterilizar en autoclave a 15lbs/15min.

Solución de lavado primario.

Mezclar 4 g de SDS y 25 mL de SSC 20X. Completar a 1l con agua destilada. Filtrar por membrana de 0.45 µm.

Solución de lavado secundario

Mezclar 100 ml del buffer de transferencia SSC 20X más 900 mL de agua destilada.

Enzima XhoI.

Condiciones de incubación buffer 1X: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25°C), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 100 µg/mL BSA incubar a 37°C.

Enzima PvuII.

Condiciones de incubación buffer NEB2 1X: 10 mM Tris-HCl 50 mM NaCl 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9 a 37°C.

Preparación del adaptador XA

Los adaptadores XA-1 (GTAGACTGCGTACATGCA) y XA-2 (TCGATGCATGTACGCAGT) se ajustaron a una concentración de 25 μ M cada uno y se mezclaron juntos en una solución conteniendo 90 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, y 0.1 mM EDTA (pH 8.0), la mezcla se calentó en baño de agua a 90°C por 5 min dejando enfriar lentamente a temperatura ambiente y fueron colocados a -20°C hasta su posterior uso en el paso de ligación.

Preparación del iniciador XP-G

Se disolvió el iniciador XP-G (TGCGTACATGCATCGAGG) utilizando agua ultra pura estéril y ajustando a una concentración de 60mM se disolvió completamente y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

Iniciadores para la síntesis de la sonda IS6110

Se disolvieron los iniciadores INS-1 (5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC) e INS-2 (5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA) a una concentración de 50 ng/ μ l cada uno utilizando agua ultra pura estéril, y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

Marcadores de peso molecular

Supercoiled DNA marcador de peso molecular de 2 a 16 kb Invitrogen Cat. No. 15622-012 a una concentración de 0.25 μ g/ μ l en 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA.

X174 DNA digerido con la enzima *Hae* III Cat. No. 15611-015 generando fragmentos de de 72 a 1,353 bp.

T4 DNA Ligase

Condiciones de incubación buffer de reacción 1X: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 a 25°C), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 μ g/ml BSA.

Medio de cultivo Middlebrook 7H10

Disolver 18.0g del medio de cultivo Middlebrook 7H10, agregar 5 mL de glicerol y 900 mL de agua destilada esterilizar en autoclave a 10lbs/10min, dejar enfriar a 45°C aproximadamente y agregar 100 mL del suplemento.

Suplemento Medio de cultivo Middlebrook 7H10

Pesar 0.85g NaCl, 5 g Peptona, 2 gr Dextrosa disolverlos en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración utilizando un filtro de 0.45 μ s de poro, conteniéndolo en un recipiente estéril y almacenándolo en refrigeración hasta su posterior uso.

Isopropanol al 80%

Mezclar 80 mL de isopropanol absoluto con 30 mL de agua destilada. Almacenar a 4°C.

LITERATURA CITADA

Ahmed N, Rao AM, Kauser KR, Kumar F, Qazi NA, Sangal NN, Sharma V, Das VD, Katoch R, Murthy VM, Suneetha JR, Sharma S, Sechi SK, Gilman LA, Hasnain S E. 2004. Molecular Genotyping of a Large, Multicentric Collection of Tubercle Bacilli Indicates Geographical Partitioning of Strain Variation and Has Implications for Global Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 3240–3247.

Ajmone-Marsan P, Valentini A, Cassandro M, Vecchiotti-Antaldi G, Bertoni G, Kuiper M. 1997. AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle *Anim Genet* 28: 418–426.

Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth A. 1994. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods *N. Engl J. Med.* 330: 1710-1716.

Ausina V, Gamboa F, Gazapo E, Manterola JM, Lonca J, Matas L. 1997. Evaluation of the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1996-2002.

Bachem CW, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9: 745–753.

Badak FZ, Kiska DL, Setterquist s, Hartley C, O'Connell MA, Hopfer RC. 1996. Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol* 34: 2236-2239.

Barnes PF, Yang Z, Preston-Martin S, Pogoda JM, Jones BE, Otaya M. 1997. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *JAMA.* 278: 1159–63.

Bauer J, Thomsen V, Poulsen S, Andersen AB. 1997. False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 35: 988-91.

Beggs ML, Cave MD, Marlove C, Cloney L, Duck P, Eisenach KD. 1996. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction. *J. Clin. Microb.* 34: 2985-9.

Bergmire-Sweart D, Barnett BJ, Harris SL, Taylor JP, Mazurek JH, Reddy V. 1996. Tuberculosis outbreak in a Texas prison 1994. *Epidemiol Infect Dis.* 117: 485-492.

Bifani PJ, Plikaytis BB, Kapur V, Stockbauer K, Pan X, Lutfey ML. 1996. Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA* 275: 452-7.

Bikandi J, San Millán AR, Rementeria, Garaizar J. 2004. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics* 20: 798-799.

Blanc DS, Hauser PM, Francioli P, Bille J. 1998. Molecular typing methods and their discriminatory power. *Clin. Microbiol Infect.* 4: 61-63.

Blears MJ, De Grandis SA, Lee H, Trevors JT. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): review of the procedure and its applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 99-114.

Borgdorff MW, Behr MA, Nagelkerke N, Hopewell PC, Small PM. 2000. Int Transmission of tuberculosis in San Francisco and its association with immigration and ethnicity. *J Tuberc Lung Dis.* 4: 287-94.

Braden CR, Templeton GL, Cave MD, Valway SE, Onorato IM, Castro KG. 1997a. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacteria* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis.* 175: 1446-1452.

Braden CR, Templeton GL, Stead WW, Bater JH, Cave MD, Valway SE. 1997b. Retrospective detections of laboratory cross contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures with use of DNA fingerprint analysis. *Clin Infect Dis.* 24: 35-40.

Braden CR, Crawford JT, Schable BA. 2002. Quality assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genotyping in a large laboratory network. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1210-1215.

Britton WJ, Roche PW, Winter N. 1994. Mechanisms of persistence of *Mycobacteria*. *Trends Microbiol.* 2: 284-288.

Caminero JA, Peña MJ, Campos-Herrero MI, Rodriguez JC, Afonso O, Martin C. 2001. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 163: 717- 20.

Cave MD, Eisenach KD, Templeton G, Salfinger M, Mazurek G, Bates J. 1994. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 32: 262-6.

Clarridge JE 3rd, Shawar RM, Shinnick TM, Plikaytis BB. 1993. Large scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J. Clin Microbiol.* 31: 2049-2056.

Cleveland JL, Kent J, Gooch BF, Valway SE, Marianos DW, Butler WR. 1995. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in an HIV dental clinic. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 16: 7-11.

Cole ST, Telenti A. 1995. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J.* 8: S701-13

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry III CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393: 537-544.

Collins DM, de Lisle GW. 1984. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol.* 130: 1019-1021.

Collins DM, Stephens DM. 1991. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Lett.* 67: 11-15

Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT. 1997. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J Clin Microbiol.* 35: 1281-1283.

Cousins DV, Wilson SD, Francis BR, Gwo BL. 1992. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 30: 255-258.

Cowan LS, Crawford JT. 2002. Genotype analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a sentinel surveillance population. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1294-1302.

Crawford JT, Braden CR, Schable BA, Onorato IM. 2002. National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network: Design and Methods. *Emerging Infectious Diseases.* 8: 1192 -1196.

Curtis AB, Ridzon R, Novick LF, Driscoll J, Blair D, Oxtoby M. 2000. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* transmission patterns in a homeless shelter outbreak. *Int J Tuberc Lung Dis.* 4: 308-13.

Chalhoub BA, Thibault S, Laucou V, Rameau C, Hofte H, Cousin R. 1997. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *BioTechniques.* 22: 216–218

Cho YG, Blair MW, Panaud O, McCouch SR. 1996. Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome.* 39: 373–378.

Chaves F, Dronda F, Cave M, Alonso-Sanz M, Eisenach K. 1997. A longitudinal study of transmission of tuberculosis in a large prison population. *Am J Respir Crit Care Med.* 155: 719-725.

Chevrel- Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, Koubaji H, Gicquel B, Dellagi K. 1993. Large-scale DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 31: 2446-50.

Daly A. 1998. Evaluation of the AFLP and RAPD molecular marker technologies with regard to the genetic diversity of commercial wheat cultivars. In: Karp A, Isaac P G, Ingram D S, editors. Molecular tools for screening biodiversity. London, United Kingdom: Chapman & Hall.

De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes W, Mijs L, Machtelinckx L, Rossau R. 1995. Rapid detection of rifampin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tuber Lung Dis.* 76: 425–430

de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, Nagelkerke NJ, van Embden JD, van Soolingen D. 1999. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J Infect Dis.* 180: 1238–44.

De Boer AS, van Soolingen D. 2000. Recurrent tuberculosis due to exogenous reinfection. *N Engl J Med* 342: 1050-1051.

Desai M, Tanna A, Wall R, Efstratiou A, George R, Stanley J. 1998. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of an outbreak of group A streptococcal invasive disease. *J Clin Microbiol.* 36: 3133–3137.

Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, Ursing J, Pitt TL. 1996. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol.* 34: 1519–1525.

Dooley SW, Jarvis WR, Marlon WJ, Snider DE. 1992. Multi-drug resistant tuberculosis. *Ann Intern Med.* 117: 257–259

Drobniewski FA, Wilson SM. 1998. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a molecular story. *J Med Microbiol.* 47: 189-96.

Duim B, Kruijt E, van Leeuwen W, van Zijderveld F, Wagenaar J. 1997. Proceedings of the Molecular epidemiology of *Campylobacter* and *Salmonella*. Application of the DNA fingerprinting method AFLP to differentiate strains of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella dublin*; pp. 81–86.

Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. 1990. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis. 161: 977–81.

Ellis THN, Poyser SJ, Knox MR, Vershinin AV, Ambrose MJ. 1998. Polymorphism of insertion sites of *Ty1-copia* retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. Mol Gen Genet. 260: 9–19.

Ellis BA, Jack TC, Christopher RB, Scott JNM, Marisa M, Steve K, the National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network Work Group¹. 2002. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in a Sentinel Surveillance Population Emerging Infectious Diseases. Vol. 8 No. 11.

Enarson DA, Rieder HL, Arnadottir T, Trébuçq A. 2000. Manejo de la tuberculosis. Guía para los países con escasos recursos económicos. 5ta Ed., Paris, Francia: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER)

Fadda G and Sanguinetti M. 1998. Polymerase chain reaction and other molecular techniques used in the diagnosis of tuberculosis. Rays. 23: 48-54

Fang Z, Forbes K. 1997. A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (ipl) for insertion into the genome. J Clin Microbiol. 35: 479-481.

Felmlee TA, Liu Q, Whelen AC, Williams D, Sommer SS, Persing DH. 1995. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance: comparison of single-strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting. J Clin Microbiol. 33: 1617-1623.

Fletcher HA. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis: recent developments and applications. Curr Opin Pulm Med. 7: 154–159.

Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson JR, Riley LW. 1995. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J Clin Microbiol. 33: 1383-4.

Frieden TR, Woodley CL, Crawford JT, Lew D, Dooley SM. 1996. The molecular epidemiology of tuberculosis in New York City: the importance of nosocomial transmission and laboratory error. Tuberc Lung Dis. 77: 407–413.

Gamboa F, Cardona PJ, Manterola JM, Lonca J, Matas L, Padilla E. 1998. Evaluation of a commercial probe assay for detection of rifampin resistance in

Mycobacterium tuberculosis directly from respiratory and nonrespiratory clinical samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 17: 189-192.

Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, Mordasini C, Weiss S, Maurer AM. 1993. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. Lancet. 342: 841-4.

Gibson JR, Slater E, Xerry J, Tompkins DS, Owen RJ. 1998. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol. 36: 2580-2585.

Goulding JN, Stanley J, Saunders N, Arnold C. 2000. Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 38: 1121-1126.

Goyal M, Saunders NA, van Embden JDA, Young DB, Shaw RJ. 1997. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by Spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol. 35: 647-51.

Grange JM. 1996. The biology of the genus *Mycobacterium*. J Appl Bacteriol Suppl. 81: 1-9.

Greef JM, Deuter M, Jung C, Schondelmaier J. 1997. Genetic diversity of European *Miscanthus* species revealed by AFLP fingerprinting. Gen Res Crop Evol. 44: 185-195.

Gutiérrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L. 1998. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. J Clin Microbiol. 36: 486-492.

Haas WH, Butler WR, Woodley CL, Crawford JT. 1993. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol. 31: 1293-1298.

Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, Lida S. 1997. Amplified restriction fragment length polymorphism-based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. Biochem Biophys Res Commun. 234: 516-521.

Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliot LB, Morgan MA, Novak SM, Rusch-Gerdes S. 1999. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 37: 748-752.

Hannan MM, Peres H, Maltez F, Heyward AC, Machado J, Morgado A. 2001. Investigation and control of a large outbreak of multi drug resistant tuberculosis at a central Lisbon hospital. *J Hosp Infect.* 47: 91-97.

Hayward AC. 1995. Restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Thorax.* 50: 1211-1218.

Heifets L. 1997. Mycobacteriology Laboratory. *Clin Chest Med.* 18:35-53.

Hermans PWM, van Soolingen D, Dale JW, Schwidema ARJ, MacAdam RA, Catty D. 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 28: 2051-2058.

Hecker, KH, Roux KH. 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *BioTechniques* 20: 478-485.

Hermans PWM, van Soolingen D, Bik EM, de Hass PEW, Dale JW, van Embden JDA. 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun.* 59: 2695-705.

Hermans PWM, Messadi F, Guebrexabher H, van Soolingen D, de Haas PE, Heersma H. 1995. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis.* 171: 1504-1513.

Hill M, Witsenboer H, Zabeau M, Vos P, Kesseli R, Michelmore R. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLP as a tool for studying genetic relationships in *Lettuca* spp. *Theor Appl Genet.* 93: 1202-1210.

Holton D, Pearson M, Larson C, Allen J, Hanssen TA, MacKeough E. 1996. Investigation of tuberculosis outbreak in a Canadian federal penitentiary. *Tuber Lung Dis.* 77: 51.

Hunter PR, Gaston MA. 1998. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465–2466.

Huys G, Coopman R, Vancanneyt M, Kersters I, Verstraete W, Kersters K, Janssen P. 1993. High resolution differentiation of aeromonads. *Med Microbiol Lett.* 2: 248–255.

Huys G, Altwegg M, Hanninen ML, Vancanneyt M, Vauterin L, Coopman R, Torck U, Luthy Hottenstein J, Janssen P, Kersters K. 1996. Genotypic and chemotaxonomic description of two subgroups in the species *Aeromonas eucrenophila* and their affiliation to *A. encheleia* and *Aeromonas* DNA hybridization group 11. *Syst Appl Microbiol.* 19: 616–623.

Huys G, Kersters I, Coopman R, Janssen P, Kersters K. 1996. Genotypic diversity among *Aeromonas* isolates recovered from drinking water production plants as revealed by AFLP analysis. *Syst Appl Microbiol.* 19: 428–435.

Huys G, Coopman R, Janssen P, Kersters K. 1996. High resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol.* 46: 572–580.

Huys G, Kampfer P, Altwegg M, Coopman R, Janssen P, Gillis M, Kersters K. 1997. Inclusion of *Aeromonas* DNA hybridization group 11 in *Aeromonas encheleia* and extended descriptions of the species *Aeromonas eucrenophila* and *A. encheleia*. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 1157–1164.

Huys G, Kampfer P, Altwegg M, Kersters I, Lamb A, Coopman R, Luthy-Hottenstein J, Vancanneyt M, Janssen P, Kersters K. 1997. *Aeromonas popoffii* sp. a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 1165–1171.

Huys G, Rigouts L, Chemlal K, Portaels F, Swings J. 2000. Evaluation of Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis for Inter- and Intraspecific Differentiation of *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, and *M. ulcerans*. *Journal of Clinical Microbiology.* 38: 3675–3680.

Iovannisci DM, Winn-Denn ES. 1993. Ligation amplification and fluorescence detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Mol Cell Probes.* 7: 35-43.

Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*. 142: 1881–1893.

Janssen P, Dijkshoorn L. 1996. High resolution DNA fingerprinting of *Acinetobacter* outbreak strains. *FEMS Microbiol Lett*. 142: 191–194.

Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K, Dijkshoorn L. 1997. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol*. 47: 1179–1187.

Jereb JA, Burwen DR, Dooley SW, Haas WH, Crawford JT, Geiter LJ. 1993. Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit: application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* 168: 1219-24.

Jonas V, Alden MJ, Curry JJ, Kamisango K, Knott CA, Lankford R. 1993. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol*. 31: 2410-2416.

Jones JT, Harrower BE. 1998. A comparison of differential display and cDNA-AFLPs as tools for the isolation of differentially expressed parasite genes. *Fundam Appl Nematol*. 21: 81–88.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Achteveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*. 35: 907–914.

Kassama Y, Shemko M, Shetty N, Fang Z, MacIntire G, Gant V, Zumla A, Goodacre R. 2006. An Improved Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Method for Typing *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 288–289.

Kearns AM, Barrett A, Marshall C, Freeman R, Magee JG, Bourke SJ. 2000. Epidemiology and molecular typing of an outbreak of tuberculosis in a hostel from homeless men. *J Clin Pathol*. 53: 122-4.

Kiers A, Drost AP, van Soolingen D, Veen J. 1997. Use of DNA fingerprinting in international source case finding during a large outbreak of tuberculosis in the Netherlands. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1: 239-45.

Koeleman JGM, Parlevliet GA, Dijkshoorn L, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE. 1997. Nosocomial outbreak of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. *J Hosp Infect.* 37: 113–123.

Koeleman JGM, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE. 1998. Comparison of ARDRA, RAPD and AFLP fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 36: 2522–2529.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C. 1999. 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.* 37: 2607–2618.

Krishnan, MY, Radhakrishnan I, Joseph BV, GK ML, Kumar RR, Mundayoor S. 2007. Combined use of Amplified Fragment Length Polymorphism and IS6110-RFLP in fingerprinting clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, South India. *BMC Infectious Diseases.* 7: 86

Leowski J, Miller M. 1992. Tuberculosis and AIDS: European and worldwide perspectives. *Soz Paraventivmed.* 37: 199-206.

Lemaitre N, Souga KW, Coëtmeur D, Vausel J, Jarlier V, Groseet J. 1996. Nosocomial transmission of tuberculosis among mentally- handicapped patients in a long-term care. *Tuber Lung Dis.* 77: 531-6.

Lin JJ, Kuo J. 1995. AFLP: a novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus.* 17: 66-70.

Lu J, Knox MR, Ambrose MJ, Brown JKM, Ellis THN. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theor Appl Genet.* 93: 1103–1111.

Martin C. 1996. Molecular typing in the investigation of outbreaks. *Tuber Lung Dis.* 77: S18.

Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. 1993 Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis.* 17: 153–164.

Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD, Wallace RJ, Bates JH, Crawford JT. 1991. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 29: 2030-2033.

Money T, Reader S, Qu LJ, Dunford RP, Moore G. 1996. AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 24: 2616–2617.

Morel V. 1997. Bacteria diversify through warfare. *Science.* 278:575.

Niemann S, Riisch GS, Richter E. 1997. IS6110 fingerprinting of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Germany during 1995. *J Clin Microbiol.* 35: 3015-20.

Organizacion Mundial de la Salud (OMS). 1996. Directrices para el tratamiento de la tuberculosis farmacoresistente. WHO/TUB/96. 210 S:5-15.

Otal I, Samper S, Asensio MP, Victoria MA, Rubio MC, Gómez LR. 1997. Use of PCR method based an IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis*: strains from BACTEC cultures. *J Clin Microbiol.* 35: 273-7.

Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F. 1998. Global surveillance for antituberculosis drug resistance 1994–1997. *World Health*

Organization– International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med.* 338: 1641–1649.

Palittapongarnpim P, Chomyc S, Fanning A, Kunimoto D. 1993. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 21: 761–762.

Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portales F. 1999. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube (MGIT) for drug susceptibility testing *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 3: 344-348.

Patel S, Wall S, Saunders NA. 1996. Heminested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. J Clin Microbiol. 34: 1686-90.

Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J. 1997. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid fast bacilli. J Clin Microbiol 35: 364-368.

Pfyffer GE, Strassle A, Rose N, Wirth R, Brandli O, Shang H. 1998. Transmission of tuberculosis in the metropolitan area of Zurich: a 3 year survey based on DNA fingerprinting. Eur Respir J 11: 804-8.

Philipp WJ, Poulet S, Eiglmeier K, Pascopella L, Balasubramanian V, Heym B, Bergh S, Bloom BR, Jacobs Jr WR, Cole ST. 1996. An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93: 3132-3137.

Picardeau M, Prod'Hom G, Raskine L, LePennec MP, Vincent V. 1997. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J Clin Microbiol. 35: 25-32.

Plikaitis BB, Morden JL, Crawford JT, Woodley CL, Butter WR, Shinnick TM. 1994. Multiplex PCR assay specific for multidrug resistance strain of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1542-1546.

Plikaitis BB, Crawford JT, Woodley CL, Butler WR, Eisenach KD, Cave MD. 1993. Rapid amplification based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen Microbiol. 139: 1537-1542.

Portugal I, Covas MJ, Brum L, Viveiros M, Ferrinho P, Moniz-Pereira J, 1999. Outbreak of multiple drug-resistant tuberculosis in Lisbon: detection by restriction fragment length polymorphism analysis. Int J Tuberc Lung Dis. 3: 207-3.

Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breeding. 2: 225-238.

Pretorius GS, Sirgel FA, Schaff HS, van Helden PD, Victor TC. 1996. Rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* rapid detection and implications in chemotherapy. S Afr Med J. 86: 50-55.

Rademaker JLW, Hoste B, Kersters K, Louws FJ, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, de Bruijn FJ. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. Int. J. Syst. Bacteriol. 50: 665-677

Radhakrishnan I, Kumar RA, Mundayoor S. 2001. Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala India. J. Clin. Microbiol. 39:1683.

Raviglione MC. 1996. What is the current situation of TB/HIV? Tuber Lung Dis. 77: 13-14.

Raviglione MC. 2001. The Global epidemiology of tuberculosis. Int. J. Tuber Lung Dis 5:S7-8

Reineke A, Karlovsky P, Zebitz CP. 1998. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. Insect Mol Biol. 7: 95-99.

Replogle J, Lord WD, Budowle B, Meinking TL, Taplin D. 1994. Identification of host DNA by amplified fragment length polymorphism analysis: preliminary analysis of human crab louse (Anoplura: Pediculidae) excreta. J Med Entomol. 31: 686-690.

Reisner BS, Gatson AM, Woods GL. 1995. Evaluation of mycobacteria growth indicator tubes for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin. Diag Microbiol Infect Dis. 22: 325-329.

Ridzon R, Joseph HK, Valway S, Weismuller P, Maxwell R, Elcock M. 1997. Outbreak of drug-resistant tuberculosis with second- generation transmission in a high school in California. J Pediatr. 131: 863-8.

Ross BC, Raios K, Jackson K, Dwyer B. 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *M. tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. J Clin Microbiol. 30: 942-6.

Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P. 1997. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 2093-8.

Ruiz M, Rodríguez JC, Rodríguez-Valera F, Royo G. 2003. Amplified-fragment length polymorphism as a complement to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4820–4822.

Russell J, Fuller R, Fuller JD, Macaulay M, Hatz BG, Jahoor A, Powell W, Waugh R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet.* 95: 714–722.

Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Lezcano MA, Vitoria LA, Rubio MC. 1998. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiology study in 1993. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2: 281-7.

Samper S, Martin C, Pinedo A, Rivero A, Blázquez J, Baquero F. 1997. Transmission between HIV- infected patients of multidrug- resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS.* 11: 1237-42.

Scarpellini P, Braglia S, Brambilla AM, Dalessandro M, Cichero P, Gori A. 1997. Detection of rifampin resistance by single strand conformation polymorphism analysis of cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis of the central nervous system. *J Clin Microbiol.* 35: 2802-2806.

Sêbek M. 2000. DNA fingerprinting and contact investigation. *Int J Tuberc Lung Dis.* 4:S45-8.

Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS. 1989. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug user with human immunodeficiency virus infection. *New Engl J Med.* 320:545-550.

Sensi E, Vignani R, Rohde W, Biricolti S. 1996. Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L, Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis.* 35:183–188.

Sharma SK, Knox MR, Ellis THN. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Leishmania* and its comparison with RAPD analysis. *Theor Appl Genet.* 93: 751–758.

Sheldon M, Han B, Suffys P, Portillo L, Fairchok M, Rouse D. 1995. Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect Dis.* 171: 954–60.

Shinnick TM, Good RC. 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 13: 884–901.

Shinnick TM, Good RC. 1995. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. *Clin Infect Dis.* 21: 291–299.

Siddiqui SH, Libonati JP, Middlebrook G. 1981. Evaluation of rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 13: 908–912.

Sims EJ, Goyal M, Arnold C. 2002. Experimental versus In Silico Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Mycobacterium tuberculosis*: Improved Typing with an Extended Fragment Range. *Journal of Clinical Microbiology.* 40: 4072–4076.

Sloos JH, Janssen P, van Boven CPA, Dijkshoorn L. 1998. AFLPTM typing of *Staphylococcus epidermidis* in multiple sequential blood cultures. *Res Microbiol.* 149: 221–228.

Small PM, van Embden JDA. 1994. Molecular epidemiology of tuberculosis. En: Bloom BR, ed. *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control.* Washington D.C: American Society for Microbiology. 569–82.

Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC. 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med.* 330: 1703–9.

Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, Singh SP, Murphy MJ, Desmond E. 1993. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med.* 328: 1137–44.

Smith PG, Moss AR. 1994. Epidemiology of Tuberculosis. En: Bloom BR, Editors. Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control. Washington D, C.: American Society for Microbiology. p. 47-57.

Speijer H, Savelkoul PHM, Bonten MJ, Stobberingh EE, Tjhie HT. 1999. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in an endemic setting on an intensive care. J. Clin Microbiol. 37:11.

Spidola de Miranda S, Drout E, Kritski AL, Peillon R, Panteix G, Gantijo PP. 1996. Similar patterns of polymorphism between Brazilian and French *Mycobacterium tuberculosis* strains demonstrated by using IS6110-RFLP. Tuberc Lung Dis. 77: 116.

Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis FM, Mogazeh SL, Kreiswirth BN, Pottathil RR. 1998. Comparative evaluation of cleavase fragment length polymorphism with PCR-SSCP and PCR-RFLP to detect antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Diagn. 3: 81-91.

Stead WW, Bates JH. 2000. Recurrent tuberculosis due to exogenous reinfection. N Engl J Med. 342: 1050.

Sterling TR, Thompson D, Stanley RL, McElroy PD, Madison A, Moore K. 2000. A multi-state outbreak of tuberculosis among members of a highly mobile social network: implications for tuberculosis elimination. Int J Tuberc Lung Dis. 4: 1066-1073.

Strässle A, Putnik J, Weber R, Fehr MA, Weist J, Pfyffer GE. 1997. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in a Human Immunodeficiency Virus cohort in Switzerland. J Clin Microbiol. 35: 374-8.

Styblo K, Enarson D. 1991. The impact of HIV infection on the global epidemiology of tuberculosis. Bull Int Union Tuberc Lung Dis. 66:27-32

Suffys PN, Ivens de Araujo ME, Degraeve WM. 1997. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 92: 297-316.

Supply P, Lesjean S, Savine K, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. 2001. Automated high-throughput genotyping for the study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J. Clin Microbiol. 39: 3563-71.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 31:175–8.

Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hébert GA, Hill B, Hollis R, Jarvis W R, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal L K, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 32: 407–415.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33: 2233–2239.

Trakas K, Stosor V, Dietrich S, Mosher L, Warren JR. 2000. Persistent tuberculosis or specimen contamination? *Arch Pathol Lab Med.* 124: 902-3.

Travis SE, Maschinski J, Keim P. 1996. An analysis of genetic variation in *Astragalus crennophylax* var. *Crennophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Mol Ecol.* 6: 735–745.

Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM. 1999. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol.* 37: 49-55.

Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi R, Piffaretti J-C. 1995. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol.* 33: 1716–1719.

Van Belkum A. 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev.* 7: 174–184.

Viader-Salvadó JM, Tijerina-Menchaca R, Vega-Alonso AS, Treviño-Alvarado VM, Guerreo-Olazarán M. 2002. Genotipificación de aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* mediante polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados. XXXIII Congreso Nacional de Microbiología, Asociación Mexicana de Microbiología y Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. (México), 7-10 de Abril de 2002.

van den Braaka N, Guus Simonsb, Roy Gorkinkb, Martin Reijansb, Kimberly Eadiea, Kristin Kremersc, Dick van Soolingenc, Paul Savelkould, Henri Verbrugha, Alex van Belkum. 2004. A new high-throughput AFLP approach for identification of new genetic polymorphism in the genome of the clonal microorganism *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods* 56: 49–62

Van Deutekom H, Gerritsen JJ, van Soolingen D, van Ameijden EJ, van Embden JD, Coutinho RA. 1997. A molecular epidemiological approach to studying the transmission of tuberculosis in Amsterdam. *Clin Infect Dis.* 25: 1071–1077.

Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 31: 406–409.

Van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, Soll DR, van Embden JDA. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 29: 2578-86.

Van Soolingen D, Hermans PW. 1995. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. *Eur Respir J Suppl.* 20: 649-56.

Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. 1994. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* 235:196–205.

Van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F. 1995. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol.* 33: 3234-3238

Van Soolingen D, de Haas PEW, Hermans PWM, Groenen PMA, van Embden JDA. 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 31: 1987-1995.

Van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, van Embden JD. 1992. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol.* 30: 1772-1777.

Van Soolingen D, de Haas P, Kremer K. 2002. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. Protocol. RIVM. The Netherlands.

Vaneechoutte M. 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Mol Biotechnol* 6:115–142.

Varnerot A, Clement F, Gheorghin M, Levy-Frébault VV. 1992. Pulse field gel electrophoresis of representative of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains. *FEMS Microbiol Letters*. 98: 155-60.

Versalovic J, Woods CR, Jr, Georghiou PR, Hamill RJ, Lupski JR. 1993. DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. *Arch Pathol Lab Med*. 117:1088–1098.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 23:4407–4414.

Viader-Salvadó JM, Luna-Aguirre CM, Reyes-Ruiz JM, Valdez-Leal R, Bosque-Moncayo MA, Tijerina-Menchaca R, Guerrero-Olazarán M. 2003. Frequency of mutations in *rpoB* and codons 315 and 463 of *katG* in rifampin- and/or isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northeast Mexico. *Microb. Drug Resist*. 9: 33-38.

Viader-Salvadó JM, Eddy LCB, Luis JGW and Martha GO. 2006. Genotyping of recombinant *Pichia pastoris* strains. *Celular & Molecular Biology Letters*. 11: 348–359

Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, Beyers N, Borgdorff MW, Behr MA. 2002. Calculation of the stability of the IS6110 banding pattern in patients with persistent *Mycobacterium tuberculosis* disease. *J Clin Microbiol* 40: 1705–8.

Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BB, Powell W. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barely genome revealed by sequence specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol Gen Genet*. 253: 687–694.

Walters SB, Hanna BA. 1996. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by *Mycobacterium* growth indicator tube method. *J Clin Microbiol*. 34: 1565-1567.

Warren R, Richardson M, Sampson S, Hauman JH, Beyers N, Donald PR, van Helden PD. 1996. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* with additional markers enhances accuracy in epidemiological studies. J Clin Microbiol. 34: 2219-24.

World Health Organization WHO/TB/97.229. Geneva: World Health Organization, 1997.

World Health Organization (WHO). Tuberculosis control and research strategies for the 1990s. Memorandum from WHO meeting. Bull WHO 1992. 70: 17-21.

World Health Organization (WHO) Anti Tuberculosis drug resistance in the World: The WHO/IUTLD Global Project on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance 1004-1997.

World Health Organization (WHO). 1994. A Global emergency Geneva: World Health Organization WHO TB. P 177.

Yang ZH, de Haas PEW, Wachmann CH, van Soolingen D, van Embden JDA, Andersen AB. 1995. Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. J Clin Microbiol. 33: 2077-81.

Yang ZH, de Haas PE, van Soolingen D, van Embden JD, Andersen AB. 1994. Restriction fragment length polymorphism *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from Greenland during 1992: evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. J Clin Microbiol. 32: 3018-25.

Zabeau M, Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. Publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13. Munich, Germany: European Patent Office.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Juan Flores Gracia

Candidato al Grado de
Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Tesis: POLIMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS
COMO MÉTODO DE GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis*

Campo de Estudio: Biotecnología y Diagnóstico Molecular

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 25 de Mayo de 1962.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo 1980-1985 (cédula 1245012).

Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.
Grado obtenido: Maestría en Ciencias Agrícolas 1995-1997 (cédula 3358352).

Experiencia Profesional: Maestro de tiempo completo, adscrito al Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria Tamaulipas de 1987 a la fecha.

Perteneciente al cuerpo académico Diversidad Biológica del 11 de Agosto del 2006 a la fecha.

Reconocimiento al perfil deseable del 15 de Noviembre del 2005 a la fecha.