

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Caracterización de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a través de la técnica de  
espoligotipificación

César Roberto Conde Pereira

Química Biológica

Guatemala, Noviembre de 2011

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Caracterización de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a través de la técnica de  
espoligotipificación

Informe de Tesis

Presentado por

César Roberto Conde Pereira

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, Noviembre de 2011

**JUNTA DIRECTIVA**

Óscar Cóbar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. José Roy Morales Coronado	Vocal IV
Br. Cecilia Liska de León	Vocal V

## DEDICATORIA

*“Bismil-lahir-Rahmanir-Rahim”*

### **A Al-lah**

el Más Misericordioso, el Dispensador de Gracia.

### **A mis viejitos**

Zoila y César, por todos los sacrificios que no podré pagar nunca.

### **A mis hermanos**

Eu, Jacobo, Beba y Beibi, por compartir el hogar más bello conmigo.

### **A mis dos ojos**

Guachita y Andreíta, por enseñarme cosas que no sabía.

### **A Gaby**

por todo.

### **Al Pueblo de Guatemala**

por becarme 5 años.

### **A la Universidad de San Carlos de Guatemala**

en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por forjar mi camino profesional.

### **A mis amigos de la universidad**

y con especial cariño: Cecy Castillo, Nadya Domínguez, Herlin Letrán, Guiselita Joachín, César “El Canche” Dávila, Víctor “El Topo” Corado, Jonathan “Barney” Delgado, Edson Flores, Christian Farfán y Juan Pablo Rodas.

### **A mis asesoras de tesis**

MSc. Blanca Samayoa, Dra. Dalia Lau y MSc. Anneliese Moller, por ser una guía en mi camino, por siempre creer en mí y también por toda la paciencia y esfuerzo durante el desarrollo de la investigación.

### **Al personal del Departamento de Microbiología**

Primeramente por todas las enseñanzas obtenidas en él y también por la amistad que me han brindado por años, en especial a Anny de Jiménez, Olguita, Doña Cony, Don Julio Maas, Charlie, Don Fili, Licda. M.C. Bran, Licda. María Luisa López, Lic. Martín Gil y Lic. Roberto Cáceres.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mis revisores de tesis**

Dra. Patricia Saravia y MSc. Gerardo Arroyo por sus valiosas correcciones.

### **A la Asociación de Salud Integral-ASI-**

En primer lugar por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. También por brindarme instalaciones, equipo y materiales óptimos para poder llevar a cabo este estudio.

### **A la Clínica Familiar “Luis Ángel García”**

En especial al personal de Enfermería por toda la colaboración en el seguimiento de las historias clínicas de los pacientes.

### **Al Hospital General San Juan de Dios**

Por permitirme realizar el estudio en sus servicios.

### **Al Laboratorio de Investigación de Enfermedades Tropicales-LIET- de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras-UNAH-**

Especialmente a Dra. Lelany Pineda y Dra. Senia Rosales, por sus enseñanzas en el uso de los equipos y reactivos para llevar a cabo la técnica usada en este estudio.

### **A MSc. María Eugenia Castellanos**

Por sus consejos y apoyo en todo momento.

### **A Netropica, al Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas-IIQB- de la USAC y el Instituto de Salud Carlos Tercero/Asamblea de Cooperación por la Paz/Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo**

Por el financiamiento para poder llevar a cabo esta investigación.

## INDICE

	Página
<b>I. Resumen</b>	<b>01</b>
<b>II. Introducción</b>	<b>03</b>
<b>III. Antecedentes</b>	<b>05</b>
<b>A. Tuberculosis</b>	<b>05</b>
<b>B. Epidemiología de la Tuberculosis en Guatemala</b>	<b>07</b>
<b>C. Características del genoma de <i>M. tuberculosis</i></b>	<b>08</b>
<b>D. Epidemiología molecular de TB y su importancia</b>	<b>09</b>
<b>E. Epidemiología molecular de tuberculosis: métodos más usados para su estudio</b>	<b>12</b>
<b>1. IS6110-Polimorfismo de longitud del fragmento de Restricción (RFLP)</b>	<b>12</b>
<b>2. Genotipificación de unidades repetitivas esparcidas micobacterianas (MIRU) y cantidad variable de repeticiones consecutivas (VNTR)</b>	<b>14</b>
<b>3. Espoligotipificación</b>	<b>14</b>
<b>a. Origen</b>	<b>14</b>
<b>b. Principio y características</b>	<b>15</b>
<b>c. Bases de datos de espoligotipificación</b>	<b>17</b>
<b>d. Clasificación de familias/linajes</b>	<b>19</b>
<b>IV. Justificación</b>	<b>20</b>
<b>V. Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>VI. Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>VII. Materiales y métodos</b>	<b>23</b>
<b>VIII. Resultados</b>	<b>33</b>
<b>IX. Discusión de resultados</b>	<b>46</b>
<b>X. Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>XI. Recomendaciones</b>	<b>56</b>
<b>XII. Referencias</b>	<b>57</b>
<b>XIII. Anexos</b>	<b>68</b>

## I. RESUMEN

La tuberculosis es la enfermedad causada por bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) y se estima que alrededor del mundo existen alrededor de 14 millones de personas infectadas.

El principal objetivo de este estudio fue el de caracterizar genéticamente a través de la técnica de espigotipificación las cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) que infectaron a pacientes que asistieron a la Asociación de Salud Integral/Clínica Familiar “Luis Ángel García” (ASI-CFLAG) y demás servicios del Hospital General San Juan de Dios (HGSJD). Se tenían como objetivos también, diferenciar los distintos grupos genéticos de cepas aisladas de MTC, elaborar un perfil epidemiológico de pacientes con tuberculosis y distinguir entre los perfiles epidemiológicos de pacientes infectados con VIH y sin VIH.

Se estudiaron 39 cepas identificadas como MTC que fueron aisladas de 34 pacientes que asistieron a ASI-CFLAG/HGSJD durante el año 2009. Todas las cepas fueron genotipificadas a través de espigotipificación y se clasificaron en familias usando dos bases de datos: SpolDB4 y SITVIT. Toda la información epidemiológica fue recolectada a través de una encuesta elaborada para este estudio, realizando entrevistas directas a pacientes así como la revisión de expedientes clínicos. Los datos fueron analizados utilizando el software Epi Info 2000 (versión 3.5.1), realizando un análisis de frecuencias.

Los resultados obtenidos pertenecen a una muestra que en su mayoría fueron hombres (61.8%), con una edad entre los 15-71 años, viviendo la mayoría en el departamento de Guatemala y la región nor-oriental del país (Jutiapa, El Progreso e Izabal). El 38.2% de los pacientes estaban infectados con el VIH. Las únicas asociaciones entre los pacientes

infectados con VIH y los que no lo estaban fueron: mayor proporción de ladinos ( $p=0.041$ ) y mejor ingreso mensual ( $p=0.042$ ) entre aquellos pacientes sin VIH. Las 39 cepas espoligotipificadas fueron agrupadas en 20 espoligotipos. De estos espoligotipos 18 ya han sido reportados en bases de datos internacionales SpolDB4/SITVIT y 2 espoligotipos correspondientes a 4 cepas, denominados GUA01 y GUA02, no se clasificaron dentro de ninguna familia. Se demostró la presencia de 6 familias de MTC en el país. Estas familias fueron en orden de la más a la menos frecuente: Latino Americana-Mediterráneo (LAM) ( $n=10$ ), T ( $n=8$ ), X ( $n=6$ ), U ( $n=3$ ), Beijing ( $n=2$ ) y Haarlem (H) ( $n=1$ ). El 53.9% de los tipos compartidos internacionales (SITs) estuvieron conformados por SIT33-LAM3 ( $n=5$ ), SIT237-U (likely H3) ( $n=4$ ), SIT53-T1 ( $n=3$ ), SIT130-LAM3 ( $n=3$ ), SIT137-X2 ( $n=3$ ) y GUA01 ( $n=3$ ).

La frecuencia de las familias LAM y T fue tres veces mayor en el interior del país que en el departamento central de Guatemala, aunque en la capital se observaron cepas pertenecientes a todas las familias y los dos espoligotipos GUA01 y GUA02. La distribución de las familias X y U en el estudio fueron casi exclusivamente encontradas en pacientes con VIH lo que sugiere que estos pacientes pudieron haberse infectado en sus visitas y/o internaciones periódicas a los diferentes servicios médicos del hospital. Se determinó la presencia de las familias Beijing, T y X en cárceles del sistema penitenciario del país.



## II. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis persiste como uno de los principales problemas de salud mundial. Sólo en el año 2006 hubo alrededor del mundo 9.2 millones de casos nuevos, además de los 14.4 millones de casos ya existentes. En Guatemala para ese mismo año la prevalencia fue de 103 casos por 100,000 habitantes y 34 nuevos casos para la misma cantidad de habitantes. Se sabe que la tuberculosis se transmite fácilmente por medio de aerosoles y en aquellas personas con contacto muy cercano. Por lo anterior se hace necesario el diagnóstico correcto, tratamiento y contención de la enfermedad para evitar su transmisión de persona a persona.

El control epidemiológico es clave para evitar la propagación de la tuberculosis, porque éste brinda las directrices necesarias para la intervención analítica en los sistemas de salud. Para realizar el control epidemiológico de la enfermedad es necesario el desarrollo de técnicas, como la espoligotipificación, el polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción (PLFR) y otros métodos porque permiten correlacionar datos genéticos y de especie de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e información demográfica, clínica y de laboratorio de los pacientes. En la actualidad esto puede hacerse gracias a que la biología molecular ha permitido el uso de métodos que unidos a las herramientas epidemiológicas clásicas ofrecen una perspectiva más completa de la dinámica de las enfermedades. Las nuevas técnicas moleculares permiten el estudio de brotes, la identificación de pacientes con alto riesgo, la investigación de contactos y la evaluación de los programas de control.

En el país hay muy pocos estudios que determinen el perfil genético de las cepas de *M. tuberculosis*. El presente estudio permitió describir de mejor manera los patrones

genéticos de cepas guatemaltecas de *M. tuberculosis* y su relación con el tipo de paciente y si existe o no una relación directa entre una cepa y otra.

El propósito de esta investigación fue el de caracterizar genéticamente por medio de la técnica de espoligotipificación cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes que asistieron al Hospital General San Juan de Dios (HGSJD). Esto hizo posible elaborar un perfil epidemiológico de las cepas de los pacientes y analizar la correspondencia mutua entre las características de aquellos pacientes infectados con tuberculosis que tuvieron rasgos diferentes (demográficos, factores de riesgo, clínicos y de laboratorio).

Para cumplir con los objetivos propuestos se implementó la técnica de espoligotipificación en los laboratorios de biología molecular de la Asociación de Salud Integral/Clínica Familiar “Luis Ángel García” del HGSJD. Al mismo tiempo se llevó a cabo el seguimiento de los pacientes con tuberculosis de los que se aisló al menos una cepa en medio de cultivo. Al momento de completarse la implementación de la espoligotipificación se caracterizaron genéticamente las cepas aisladas con el objeto de clasificarlas, reportarlas en bases de datos internacionales y comparar los grupos presentes en el país con los de la región. También se relacionaron los datos obtenidos de los pacientes con su espoligotipo correspondiente.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Tuberculosis

La tuberculosis es la enfermedad causada por bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Dicho complejo está formado por especies relacionadas filogenéticamente, éstas son: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canettii* y recientemente se incluyen aquí a las especies *M. pinnipeddi* y *M. caprae* (1, 2). El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos cortos, inmóviles, aerobios y no esporuladores que además poseen características especiales que los diferencian de los demás géneros bacterianos, como por ejemplo: pared celular rica en ácidos micólicos (lípidos hidrofóbicos) lo que los hace alcohol ácido resistente y elevado contenido de guanósina y citosina en su ADN que ha permitido su tipificación genética (3).

Los pulmones son el principal sitio de entrada del bacilo de la tuberculosis, el cual causa una infección focal en el sitio donde se deposita luego de la inhalación. A este tipo de infección se le llama tuberculosis pulmonar. Si la infección no puede ser contenida, se presenta la tuberculosis extrapulmonar, en la cual el bacilo se disemina por vía hematológica o linfática hasta llegar a diferentes órganos, principalmente hueso, médula ósea, ganglios linfáticos, intestinos, riñones, sistema nervioso y piel. Las manifestaciones clínicas de la tuberculosis dependerán de la defensa que desarrolle el sitio de infección (4, 5). Los síntomas clásicos de la tuberculosis pulmonar consisten en fiebre y sudoración, pérdida de peso, hemoptisis, disnea y dolor torácico. En los pacientes infectados con el VIH el curso natural de la enfermedad varía presentando mayor frecuencia de reactivación de la enfermedad, desarrollo de enfermedad aguda, anergia en piel, tuberculosis extrapulmonar y malabsorción de medicamentos antifímicos (6).

El diagnóstico de tuberculosis generalmente se hace en el laboratorio. Por su sencillez y economía los métodos más usados para el diagnóstico de la tuberculosis son: microscopía a base de tinciones de fucsina para bacilos alcohol ácidos resistentes (Ziehl-Neelsen o Kinyoun) o a base de tinciones con fluorocromos (auramina-rodamina); aislamiento de la bacteria a través de los medios de cultivos sólidos (i.e. Löwenstein-Jensen o Middlebrook 7H10) y líquidos (i.e. Middlebrook 7H9 o 12B BACTEC) y las identificación por pruebas bioquímicas (i.e., reducción de nitratos a nitritos, niacina, etcétera) (7, 8, 9, 10). Sin embargo, estos métodos presentan desventajas. La microscopía a base de tinciones posee una muy baja sensibilidad ya que necesita de  $10^4$  bacilos/mL para que un frote sea positivo. El cultivo en medios sólidos y líquidos requieren de hasta 6 u 8 semanas para que crezcan y se detecten los bacilos (11). Existen también pruebas diagnósticas enzimáticas como la medición de la actividad de la adenosina desaminasa (ADA), inmunológicas como la prueba de la tuberculina, el ELISA para la proteína 38 kDA, pruebas rápidas de detección de anticuerpos, el ELISPOT para la detección de interferón gama y moleculares tales como la amplificación de ADN micobacteriano por medio de PCR y la detección de secuencias específicas con sondas de ADN, entre otras (6).

El tratamiento de la tuberculosis consiste en una combinación de distintos antimicobacterianos. El esquema más eficiente es: rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol por 2 meses, y a continuación 4 meses de isoniazida y rifampicina (12). Sin embargo, se ha reportado la presencia de tuberculosis multirresistente (MDR-TB), la cual se define como aquella que es resistente a la isoniazida y rifampicina. También en los últimos años ha emergido la tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB) la cual es causada por cepas resistentes a la isoniazida y la rifampicina y en adición son resistentes a

alguna quinolona y algún antimicrobiano de segunda línea (kanamicina, amikacina, etcétera) (13, 14).

En el año 2006 se estima que hubo 9.2 millones (139 por 100,000 habitantes) nuevos casos de tuberculosis alrededor del mundo. Ese mismo año se calcula que en el mundo hubo 14.4 millones de casos prevalentes y 0.5 millones de casos de MDR-TB. La mortalidad debida a tuberculosis fue de 1.7 millones, incluidos 0.2 millones personas infectadas con el VIH (15a).

Por todas las circunstancias anteriormente mencionadas es necesario el desarrollo de nuevas técnicas que permitan mejorar el diagnóstico de la tuberculosis y su respectivo control epidemiológico. En la actualidad se desarrollan métodos moleculares de genotipificación que intentan comprender la dinámica de la tuberculosis en el mundo para contar con información epidemiológica certera y definir las estrategias que permitirán controlar la enfermedad (1, 16).

## **B. Epidemiología de la tuberculosis en Guatemala**

La República de Guatemala es un país ubicado en América Central. Tiene una extensión superficial de 108,889 km<sup>2</sup> y para el año 2006 contaba con aproximadamente 13,028,572 habitantes (17).

En el 2006 la prevalencia de tuberculosis en el país fue estimada en 103/100,000 habitantes y la incidencia en 34/100,000 habitantes. Para ese mismo año, la mortalidad debida a la enfermedad fue de 14/100,000 habitantes. De los todos los pacientes VIH positivo, el 13% presentaba tuberculosis. Asimismo, los casos de MDR-TB representaron el 3% de todos los aislamientos de *M. tuberculosis* a los que se les hizo prueba de susceptibilidad (18).

En Guatemala se han llevado a cabo un solo estudio que involucre las modernas técnicas de tipificación molecular para su aplicación epidemiológica. Utilizando la técnica de DRE-PCR, éste estudio determinó que las cepas resistentes a al menos dos antituberculosos (isoniacida, rifampicina, etambutol y estreptomycin) pertenecían a dos grupos genéticamente relacionados (19).

Sin embargo, en el país no se ha realizado ninguna investigación que involucre espoligotipificación para *M. tuberculosis*, pese que en países vecinos como Costa Rica, Honduras, México y Cuba ya se hayan reportado perfiles de espoligotipificación en bases de datos internacionales (20, 21, 22, 24).

### **C. Características del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*.**

En 1998 se publicó por primera vez el genoma de la cepa de laboratorio H37Rv de *M. tuberculosis*. A partir de entonces la cepa clínica CDC1551 de *M. tuberculosis* y seis micobacterias relacionadas han sido totalmente secuenciadas (24).

Las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* presentan un genoma altamente conservado. Estas poseen diversas características fenotípicas y una amplia variedad de hospederos, pero también representan un ejemplo extremo de homogeneidad genética interespecies, ya que el rango sinonímico de polimorfismo nucleótido va del 0.01% al 0.03%. Además, no hay evidencias de transferencias genómicas horizontales entre especies (25, 26).

Los genomas de algunos procariontes como *M. tuberculosis* están característicamente divididos por secuencias mononucleotídicas que se repiten periódicamente (unidades repetitivas). Hay dos tipos de unidades repetitivas, las repeticiones esparcidas (IR, del

inglés *interspersed repeats*) que se presentan como repeticiones directas o como repeticiones parecidas a secuencias de inserción y las repeticiones en tándem o fila (TR, del inglés *tandem repeats*) que son repeticiones ininterrumpidas que van directamente desde el extremo 5' (extremo con fosfato libre) al 3' (extremo con hidroxilo libre) de la cadena de ADN. Existen también microsátélites procarióticos que se definen como repeticiones de 1 a 10 pares de bases (pb) y minisátélites que son repeticiones de 10 a 100 pb, comúnmente referidas como cantidad variable de repeticiones consecutivas (VNTR) que están localizados en regiones intergénicas, en regiones regulatorias, o entre marcos de lectura (1).

El locus de repeticiones directas (DR) es una región sencilla del cromosoma de *M. tuberculosis* que contiene múltiples copias de una repetición directa de 36 pb que se repite entre 10 y 50 veces. Cada repetición esta separada de la siguiente por una secuencia no repetitiva de ADN. Cada espaciador mide de 37 a 41 pb. Todas las cepas de *M. tuberculosis* contienen el locus DR (1).

Se ha descrito la secuencia de inserción IS6110 que sólo pertenece al genoma de las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. Esta es una secuencia de 1355 pares de bases que se encuentra más o menos distribuida al azar a través del genoma de la bacteria. Los números de copias pueden variar desde cepas con 26 copias de la secuencia de inserción hasta aquellas que carecen de la misma y puede ocurrir que las secuencias de inserción IS6110 estén insertadas en la región DR (1).

#### **D. Epidemiología molecular de tuberculosis y su importancia.**

La epidemiología molecular se puede definir como aquel campo científico que ha integrado la biología molecular, la clínica medicinal, la estadística y la epidemiología. En

pocas palabras, la epidemiología molecular se enfoca en los factores de riesgo genéticos y ambientales a nivel molecular, celular o bioquímico de la etiología de una enfermedad y su distribución entre las poblaciones en diferentes regiones geográficas (1, 27).

Los métodos previos a la biología molecular, como la morfología colonial, rangos de crecimiento, susceptibilidad a antibióticos selectivos y fagotipificación, eran útiles pero no eran capaces de proveer la suficiente discriminación, limitando de esta manera su utilidad en la epidemiología de la tuberculosis (28 ). Esto quiere decir que antes de los métodos moleculares el estudio epidemiológico de la tuberculosis dependía de la mera observación de datos y correlaciones casuísticas (1, 28).

La utilización de la epidemiología molecular para el estudio de la tuberculosis es extensa. Ha demostrado su utilidad para analizar la dinámica de la enfermedad, el estudio de brotes, la identificación de grupos con alto riesgo, la investigación de contactos y la evaluación de programas de control (29). Además, permite la evaluación de aislamientos con diferentes patrones de susceptibilidad antimicrobiana. Esto determina si el microorganismo original desarrolla resistencia a drogas durante o después de la terapia antituberculosa, si el paciente se recontamina con una cepa de *M. tuberculosis* distinta o si se sospecha contaminación cruzada en el laboratorio (30).

Los estudios de epidemiología molecular han mostrado que la dinámica de transmisión de la tuberculosis varía grandemente de región en región. En los lugares donde hay mucha gente sin hogar, los hospicios son los focos principales de transmisión de la enfermedad. En otros lugares los bares han sido importantes factores de transmisión. Por lo tanto, los esfuerzos locales para identificar las poblaciones con alto riesgo de adquirir la



infección y los sitios de transmisión son cruciales para el control efectivo de la tuberculosis (31).

Antes del advenimiento de la epidemiología molecular se creyó que el 90% de los casos de tuberculosis en las naciones industrializadas eran el resultado de la reactivación de alguna infección adquirida en el pasado. Sin embargo, el análisis de genotipificación indica que la transmisión reciente causa del 20 al 50% de casos en las áreas urbanas. Luego de muchos estudios se ha demostrado que un tercio de los casos de tuberculosis aún se deben a transmisión reciente. Además, los pacientes con tuberculosis generalmente buscan atención médica mucho después de iniciados los síntomas, por lo que contribuyen a esparcir la enfermedad, a pesar de que existen programas de control de la tuberculosis (32).

Con la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se elevó la prevalencia de personas que padecían tuberculosis. Es un hecho que la interacción entre la infección con VIH y *M. tuberculosis* potencia ambas enfermedades. Una persona viviendo con SIDA en comparación con una persona inmunocompetente tendrá más riesgo de sufrir reactivaciones tuberculosas y/o infección aguda, presentar cuadros de tuberculosis extrapulmonar y mal absorber los medicamentos antituberculosos (8).

En la ciudad de Guatemala la Clínica Familiar “Luis Ángel García” (CFLAG) es la encargada de brindar atención integral a los pacientes que viven con VIH/SIDA que asistan al Hospital General San Juan de Dios (HGSJD), este servicio incluye el diagnóstico, tratamiento y control de enfermedades oportunistas como la tuberculosis. En este contexto la CFLAG contribuye en el país sustancialmente al desarrollo de nuevas técnicas y metodologías que permiten generar perfiles epidemiológicos con los datos de los pacientes

y su relación con la enfermedad. De esta manera la CFLAG ha implementado técnicas moleculares para el diagnóstico de la tuberculosis y continúa aportando en la generación de los primeros datos en Guatemala que permitan elaborar planes de control epidemiológico más adecuados para controlar la tuberculosis.

### **E. Epidemiología molecular de tuberculosis: métodos más usados para su estudio**

Existen varios métodos para la tipificación molecular de las cepas de *M. tuberculosis*. Entre estos se encuentran el *IS6110*-polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), las unidades repetitivas espaciadas micobacterianas (MIRU)- cantidad variable de repeticiones consecutivas (VNTR) y la espoligotipificación.

#### **1. *IS6110*-Polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP)**

Las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* contienen un número variable de secuencias de inserción *IS6110* a través de su material genético (33). El *IS6110*-polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (*IS6110*-RFLP, por sus siglas en inglés) es un poderoso método molecular que aprovecha esta característica del complejo para brindar información epidemiológica de la tuberculosis (ver figura 1) (34). La comparación de perfiles de *IS6110*-RFLP de las diferentes cepas causantes de la enfermedad en una comunidad o región geográfica permite relacionar las cepas aisladas de persona en persona. Los aislamientos de pacientes infectados de tuberculosis con cepas que no están relacionadas epidemiológicamente poseen diferentes patrones de *IS6110*-RFLP,

mientras que aquellos provenientes de pacientes tuberculosos epidemiológicamente relacionados generalmente presentan patrones idénticos de IS6110-RFLP (31, 35, 36).

El IS6110-RFLP es considerado el estándar de oro para la genotipificación del complejo *M. tuberculosis* porque provee una extensa diversidad de perfiles para aislamientos con más de 6 copias de IS6110. Además se han desarrollado amplias bases de datos para la comparación interregional de cepas obtenidas de diferentes aislamientos. Comparándolo con los últimos métodos moleculares a base de PCR (como MIRU, VNTR, espoligotipificación, etcétera), es el mejor método para discriminación entre diferentes cepas (1, 31, 37).

Sin embargo, el IS6110-RFLP tiene varias desventajas. Una limitación está relacionada al hecho de que para llevar a cabo el método se necesita abundante material genético proveniente de cultivo micobacteriano, lo que hace que la técnica pueda demorarse semanas e incluso meses. Otra desventaja importante es que el IS6110-RFLP tiene poco poder discriminatorio entre aquellas cepas con menos de seis copias de IS6110 y es casi nula la discriminación con las que tienen una o dos copias de la misma secuencia de inserción, como por ejemplo *M. bovis*. A esto debe añadirse que el método es muy laborioso, difícilmente automatizable, caro y que sus resultados son muy difíciles de analizar, requiriendo complejos programas de computación para su comparación interlaboratorios (1, 35, 38).

## **2. Genotipificación de unidades repetitivas esparcidas micobacterianas (MIRU) y cantidad variable de repeticiones consecutivas (VNTR)**

En el genoma de *M. tuberculosis* se han identificado varios *loci* distintos con una cantidad variable de repeticiones consecutivas (VNTR). Se han descrito 41 VNTR como unidades repetitivas esparcidas micobacterianas (MIRU). De estos, se han utilizado 12 para genotipificar los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. De ahí el nombre de genotipificación de MIRU-VNTR (39, 40).

Los últimos métodos de genotipificación de MIRU-VNTR se han automatizado y se basan en la utilización de PCR múltiple (PCR en el cual se puede amplificar más de una secuencia de ADN en una misma reacción empleando dos o más pares de cebadores), lo que ha hecho que el tiempo de realización de la técnica sea considerablemente menor que el usado en la genotipificación por IS6110-RFLP (41). La genotipificación MIRU-VNTR es altamente reproducible y tiene un alto poder discriminatorio entre cepas (37). Para aumentar la capacidad de discriminación también se ha desarrollado genotipificación MIRU-VNTR que puede tipificar 15 *loci* MIRU (1).

La principal desventaja de la genotipificación de MIRU-VNTR consiste en que su poder discriminatorio es aún menor al estándar de oro (IS6110-RFLP) y por lo tanto patrones genotípicos similares pueden resultar en diferentes linajes (1, 37).

## **3. Espoligotipificación**

### **a. Origen**

En 1991, Hermans *et al* describieron un locus cromosomal característico perteneciente a la bacteria *Mycobacterium bovis* BCG, la cual pertenece al complejo *M.*

*tuberculosis*. Se detectó una secuencia de inserción a la que se llamó IS987 y las regiones que la flanqueaban, localizados en una porción de repeticiones directas (DR). El locus DR es una región cromosomal que contiene de 10 a 50 copias de una repetición directa de 36 pb, separadas estas copias por espaciadores de ADN con varias secuencias, cada una de la cual mide 35 a 41 pb (ver figura 2). La secuencia genética del IS987 contiene 20 DRs. La conclusión más importante a la que se llegó en ese estudio es que las secuencias DR se encuentran únicamente en las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y no a otras especies micobacterianas. Por lo tanto, esa región DR y su secuenciación genética puede permitir la genotipificación del complejo (42, 43).

Con base a esta información, Kamerbeek *et al* publicaron en 1997 un método que permite la detección y diferenciación simultánea de cepas del complejo *M. tuberculosis* para el diagnóstico y epidemiología de la enfermedad. Este método fue denominado *espoligotipificación* (en inglés *spoligo*typing, acrónimo de *spacer oligo*typing). El método es capaz de genotipificar las cepas del complejo *M. tuberculosis* en base a sus diferencias en la región DR (que en su mayoría tiene insertada una o varias copias de IS6110), por lo que tiene una excelente aplicabilidad epidemiológica al relacionar aquellas cepas que compartan la misma composición genética (43).

#### **b. Principio y características**

El principio de la espoligotipificación está descrito en la figura 2. En la mayoría de las cepas del complejo *M. tuberculosis* varía el número de DRs que poseen y la presencia o ausencia de espaciadores particulares. La espoligotipificación comprende la utilización del PCR para amplificar el locus DR, seguido por hibridación de los productos de PCR a una

membrana que contiene unidos covalentemente oligonucleótidos correspondientes a los 43 espaciadores descritos para la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. El ADN hibridado se detecta por quimioluminiscencia. Las cepas individuales son positivas o negativas para cada espaciador, las combinaciones de estos es lo que genera el espoligotipo característico de cada cepa (43).

Una característica importante de la espoligotipificación que la hace superior a otros métodos es que posee una metodología sencilla y barata, haciendo bastante factible su uso en países pobres (43). Como se requieren solamente 2 microgramos de ADN cromosomal de *M. tuberculosis* para poder reproducir el método, se pueden usar preparados hervidos, muestras clínicas, material embebido en parafina y material proveniente de láminas teñidas con Ziehl-Neelsen (1).

Una de las principales ventajas de este método consiste en el corto tiempo en que se obtienen resultados. Dado que para llevar a cabo la espoligotipificación puede utilizarse directamente lisado celular, la técnica no requiere purificación de ADN, brindando resultados en 1 ó 2 días en contraposición de la tipificación IS6110-RFLP que requiere de hasta 2 meses, que es el tiempo en que crece la bacteria en el cultivo (31, 43).

Otra ventaja importante de la espoligotipificación es su capacidad discriminatoria con aquellas cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* que posean pocas copias de la secuencia de inserción IS6110. Por ejemplo, la especie *M. bovis* posee por lo general solamente una copia de dicha secuencia de inserción (37).

La espoligotipificación también permite la diferenciación de *M. bovis* con respecto a las demás especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. Las cepas pertenecientes a

*M. bovis* carecen de los últimos cinco espaciadores característicos de las demás especies del complejo (43).

Los resultados obtenidos de la espoligotipificación pueden reportarse como datos binarios (ausencia/presencia), como código octal o códigos hexales (44). Esto ha permitido la elaboración de amplias bases de datos internacionales que no necesitan software sofisticado para su análisis y que permiten la comparación interlaboratorios (1).

Sin embargo, la espoligotipificación presenta serias desventajas. Su poder discriminatorio en general es inferior a aquel que pueda brindar el análisis IS6110-RFLP o MIRU-VNTR (34, 37). Se han descrito espoligotipos idénticos que no están relacionados filogenéticamente, esto debido a que en algunos casos las regiones DR pierden irreversiblemente espaciadores, llevando a evolución convergente (45). Aun así la combinación de métodos de genotipificación con diferentes blancos moleculares es la tendencia preferida actualmente. Por ejemplo, la combinación de espoligotipificación y MIRU-VNTR ha mostrado una discriminación tan poderosa como la que brinda el uso exclusivo del método de IS6110-RFLP (46).

### **c. Bases de datos de espoligotipificación**

La difusión de la espoligotipificación ha permitido la elaboración de bases de datos para la comparación de resultados entre laboratorios. Las principales bases de datos internacionales han sido publicadas por el Instituto Pasteur de Guadalupe (20, 21). En la última base de datos internacional publicada por Brudye *et al.* en 2006, están contenidos los espoligotipos de cepas aisladas del complejo *M. tuberculosis*, cada uno de los cuales tiene asignado un número llamado “tipo compartido internacional” (SIT, por sus siglas en

inglés), una descripción binaria, una descripción octal, una distribución geográfica y su respectivo linaje o familia (21). Un linaje o familia es definido como un conjunto de cepas con espoligotipos relacionados (47).

En 1999 el primer intento de generar una base de datos fue publicado por Sola *et al*, la cual se limitaba a describir espoligotipos de cepas aisladas en países del Caribe (22). En 2001 se publicó la segunda base de datos la cual incluía espoligotipos pertenecientes a cepas aisladas en 4 países de América, 7 de Europa, 2 de África y 2 de Asia. En ella se incluían 3,319 espoligotipos agrupados en 259 SIT con fines de estudios epidemiológicos a nivel mundial (23).

En el año 2002 se crearon reglas en base a modelos matemáticos, con el fin de simplificar la agrupación de las distintas familias que conformaban los espoligotipos registrados en las bases de datos. Así, se crearon 9 superfamilias (familias o linajes relacionadas filogenéticamente) dependiendo de la presencia o ausencia de ciertos espaciadores. Estas son llamadas: *Afri*, *T*, *Beijing*, *EA-1*, *Haarlem*, *LAM-1*, *LAM-2*, *X* y *M. bovis* (48).

La última base de datos fue publicada en 2006 por Brudey *et al*. Ésta fue llamada SpolDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>) e incluye 39,295 cepas de 122 países. De estas cepas, 35,925 fueron agrupadas en 1,939 SITs y las restantes 3,370 fueron espoligotipos únicos. SpolDB4 brinda un panorama más claro de la distribución geográfica de los linajes del complejo *M. tuberculosis* a nivel mundial (21).

También es posible encontrar otras bases de datos en la red. El sitio SPOTCLUST (<http://cgi2.cs.rpi.edu/~vitoli/SPOTCLUST.html>) permite compartir espoligotipos hallados en cualquier parte del mundo para su análisis y agrupamiento genético. En otro sitio de la



red llamado spolTools (<http://www.emi.unsw.edu.au/spolTools/search.php>) puede buscarse información por autor de publicación o por **espoligotipos**, con su respectiva información filogenética. En este último sitio puede obtenerse un novedoso modelo gráfico, llamado “espoligobosque”, como una alternativa sencilla para relacionar filogenéticamente los espoligotipos que se obtengan. Este diseño se propone en contraposición a los dendogramas clásicos que son representaciones gráficas usadas ampliamente para simbolizar las relaciones genéticas entre los aislamientos tipificados. El espoligobosque permite evidenciar una relación filogenética más directa entre grupos de genotipos que un dendograma haciendo más sencilla su comprensión (49).

#### **d. Clasificación de familias/linajes por espoligotipificación**

En SpolDB4 se definen 62 linajes genéticos agrupados en 10 superfamilias redefinidas como: *Beijing*, *parecido a Beijing* (*Beijing-like en inglés*), *Centro Asiática* (CAS), *Este Africana-India* (EAI), *Haarlem*, *Latino Americana-Mediterránea* (LAM), *Manu*, *S*, *T* y *X*. Estas familias se encuentran distribuidas en 8 regiones geográficas: África, Centroamérica, Europa, Lejano Oriente asiático, Medio Oriente y Asia Central, Norteamérica, Oceanía y Suramérica. (21).

En Latinoamérica la superfamilia predominante es LAM, la cual se encuentra principalmente en Suramérica y el Caribe. Sin embargo, en Centroamérica las superfamilias más halladas son T, Haarlem y LAM representando estas más del 75% de los espoligotipos aislados en esa región. Un resumen de las superfamilias y su distribución a nivel mundial se da en la figura 3 (21).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Según cálculos de las organizaciones de salud la tuberculosis causó a principios del milenio la muerte de alrededor de 3 millones de personas en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que del año 2002 al año 2020, mil millones de personas adquirirán la infección, de estos 150 millones desarrollarán la enfermedad y 36 millones morirán de tuberculosis (15a). Según la OMS en Guatemala para el año 2006 la prevalencia de tuberculosis fue de 103/100,000 habitantes, con 34 nuevos casos para la misma cantidad de habitantes. Debe agregarse que de cada 100 pacientes viviendo con VIH/SIDA en el país, 13 padecían la enfermedad, situando a la nación entre aquellas con más cantidad de personas infectadas por ésta bacteria en América Latina (18). Si bien la tuberculosis es altamente infecciosa ésta afecta principalmente a aquellas personas con serios inmunocompromisos, por lo que la población infectada con VIH/SIDA es más vulnerable a padecer la enfermedad.

En el país existen muy pocos estudios basados en técnicas moleculares para la genotipificación de *M. tuberculosis*. Por ello no se cuenta con un conjunto completo de perfiles genéticos de las cepas aisladas de las personas infectadas, haciendo que la dinámica de la enfermedad permanezca como una incógnita. La Clínica Familiar “Luís Ángel García” es la entidad encargada de brindar atención integral a los pacientes que viven con VIH/SIDA que asisten al HGSJD. Así mismo al HGSJD asisten además de los pacientes que viven con VIH/SIDA, pacientes inmunocompetentes de todas las regiones del país que se encuentran enfermos de tuberculosis. Es por ello que se hace necesario el uso de la técnica molecular de la espoligotipificación que proveería de información importante acerca de la transmisión y epidemiología de la tuberculosis en Guatemala, porque permitiría la elaboración perfiles epidemiológicos de las cepas de los pacientes y su correspondencia con las características demográficas, clínicos y de laboratorio de los pacientes. Esto permitiría monitorear las principales cepas circulantes del país y contribuiría sustancialmente a elaborar planes de control más eficientes.

Por lo anterior es necesario el contar con los perfiles genéticos de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de los pacientes que asisten a la Clínica Familiar “Luís Ángel García” y demás servicios del HGSJD.

## V. OBJETIVOS

### a. Objetivo General:

Caracterizar genotípicamente a través de la técnica de espoligotipificación las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que infecten a los pacientes que asistan a la Asociación de Salud Integral/Clinica Familiar “Luís Ángel García” y demás servicios del Hospital General San Juan de Dios en el año 2009.

### b. Objetivos Específicos

- i. Diferenciar los distintos grupos genéticos de cepas aisladas de *M. tuberculosis*
- ii. Elaborar un perfil epidemiológico de pacientes con tuberculosis.
- iii. Diferenciar entre los perfiles epidemiológicos de pacientes infectados con VIH y sin VIH.

## **VI. HIPÓTESIS**

Por ser un estudio de corte transversal observacional descriptivo carece de hipótesis.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo (población) y muestra

#### 1. Universo

Pacientes que asistieron a la Asociación de Salud Integral/Clínica Familiar “Luís Ángel García” y demás servicios del Hospital General San Juan de Dios de los que se aislaron al menos una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* durante el año 2009.

#### 2. Muestra

Se realizó un muestreo por conveniencia en pacientes tuberculosos con y sin VIH. Se llevó a cabo durante el año 2009 y se obtuvieron 39 aislamientos de *M. tuberculosis* de distintos pacientes. Se incluyeron solamente aquellos pacientes de los que se aisló en medio de cultivo sólido al menos una cepa perteneciente al complejo *M. tuberculosis* y de los cuales se obtuvo la información demográfica y clínica completa. También se incluyeron solamente las cepas de las cuales pudo completarse la información microbiológica (tipo de muestra, tinción de Ziehl-Neelsen, fecha de aislamiento, resultado de sonda de identificación y servicio del que se aisló) correspondiente.

### B. Materiales

#### 1. Recursos Humanos

Br. César Roberto Conde Pereira

Asesora: Licda. Anneliese Möller

Asesora: MSc. Blanca Samayoa Herrera

Asesora: Dra. Dalia Mei Ling Lau Bonilla

## **2. Cultivos y tinciones**

- a. Medio Löwenstein-Jensen
- b. MGIT OADC
- c. Tinción de Zieh-Neelsen

## **3. Equipo**

- a. Termociclador
- b. Miniblotter MN45
- c. Soportes de goma
- d. Incubadora a 80°C
- e. Centrífuga para microtubos
- f. Botellas para hibridación
- g. Horno de hibridación
- h. Cassette de exposición
- i. Bandejas plásticas

## **4. Reactivos**

- a. Solución de NaCl 150 mM
- b. Agua bidestilada
- c. Agua Grado Biología Molecular

- d. EDAC (100 g.)
- e. SDS 10 % con alto grado de pureza (500 g.)
- f. SSPE 2x
- g. 2x SSPE/0.1% SDS
- h. 2x SSPE/0.5% SDS
- i. 1% SDS
- j. Buffer TE
- k. FastStart PCR Master
- l. Conjugado de Streptavidina-peroxidasa
- m. Líquido de detección ECL
- n. EDTA 20 mM (pH = 8)
- o. Reactivos de descontaminación (NaOH/NALC)
- p. AccuProbe (Gen-Probe)(Sondas de ADN)

## **5. Otros materiales**

- a. Microtubos de 1 mL
- b. Micropipetas (0-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L)
- c. Membrana para espoligotipificación de Isogene Life Science con 43 oligonucleótidos correspondientes a los espaciadores (para más especificaciones ver figura 2)
- d. Hyperfilm (Filmes Rayos X)
- e. Tips con filtro (0-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L)
- f. Guantes

- g. Pinzas plásticas
- h. Control positivo 1: *M. tuberculosis* cepa H37Rv
- i. Control positivo 2: *M. bovis* BCG P3

## C. Métodos

### 1. Obtención de cepas e identificación

La obtención de cepa se llevó a cabo a través del cultivo de los diferentes tipos de muestras (esputos, biopsias, secreciones, médulas óseas, sangre, líquidos corporales, etcétera) procesadas en el Laboratorio de Micobacterias y Hongos del HGSJD. El medio de cultivo Löwenstein-Jensen fue utilizado para realizar el aislamiento. Los medios inoculados fueron incubados a 37°C por un período de cuatro a ocho semanas.

Para identificar las cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* se usaron las sondas de ADN comerciales AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, CA) a partir de colonias frescas (no más de 30 días) sospechosas de pertenecer al género *Mycobacterium*, diferenciando así las cepas del complejo *M. avium/intracellulare*, *M. kansasii* y *M. goodii*.

### 2. Preparación de los lisados a partir de colonias

- a. Resuspender dos asadas de células en 250 µL de 1xTE en un tubo Eppendorf.
- b. Matar las células por incubación a 80°C por una hora.
- c. Centrifugar el tubo a 1300 rpm por 2 minutos, descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 500 µL de NaCl 150 mM. Repetir éste paso dos veces más.



- d. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 25  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada o 1xTE (50).

### 3. Amplificación *in vitro* de los espaciadores de ADN por PCR

- a. Siempre incluir ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv de *M. bovis* BCG, como controles positivos y agua como control negativo.
- b. Mezcla de reacción:

5  $\mu\text{L}$  templado de ADN (10 ng)

4  $\mu\text{L}$  primer DRa (20 pmol) (biotinilado)

4  $\mu\text{L}$  primer DRb (20 pmol)

4  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTP (2.5 mM cada dNTP, para una concentración final de 0.2 mM de cada dNTP)

5  $\mu\text{L}$  buffer concentrado 10X

5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$

0.25  $\mu\text{L}$  Taq polimerasa (5 unidades/  $\mu\text{L}$ )

23  $\mu\text{L}$  de agua grado Biología Molecular para ajustar a un volumen final de 50  $\mu\text{L}$

- c. Colocar los microtubos en un termociclador y realizar el siguiente ciclo 35 veces:

3 minutos a 96°C

1 minuto a 96°C

1 minuto 55°C

30 segundos a 72°C

5 minutos a 72°C (50).

**Observaciones.**

- A. La preparación de la mezcla debe llevarse a cabo en un laboratorio libre de productos de PCR micobacterianos que contengan secuencias de DR.
- B. El cebador DRa está biotinilado y debe almacenarse a 4°C. repetidos descongelamientos y congelamientos de los cebadores biotinilados puede resultar en patrones de espilogotipos débiles.
- C. El cebador DRb debe almacenarse en pequeñas alícuotas a -20°C.
- D. Para la amplificación de la región DR a partir de muestras clínicas el número de ciclos puede incrementarse a 40.
- E. Los productos de PCR se pueden usar inmediatamente, pero también se pueden almacenar a -20°C para usarse después.
- F. Todas las incubaciones deben llevarse a cabo en un recipiente plástico con una agitación muy suave.
- G. Limpiar con mucho cuidado y firmemente el miniblatter con jabón neutro y una gasa antes de su uso.
- H. Nunca tocar la membrana con guantes, el talco produce manchas y rayas en el fondo en la película cuando se revela e interfiere con la interpretación de los patrones de los espilogotipos. Usar una pinza adecuada para tal cometido.
- I. La calidad del SDS es muy importante. Debe ser recientemente preparado, no almacenar por más de una semana (50).

#### 4. Hibridación

- a. Todas las soluciones amortiguadoras deben prepararse a partir de las soluciones stock y precalentarse antes de usarse.

250 mL 2xSSPE/0.1% SDS, 60°C

500 mL 2xSSPE/0.5% SDS, 60°C

500 mL 2xSSPE/0.5% SDAS, 42°C

500 2xSSPE, Temperatura ambiente

- b. Agregar 20  $\mu$ L de cada producto de PCR a 150  $\mu$ L 2xSSPE/0.1% SDS para hacer diluciones de muestras.
- c. Calentar la dilución de las muestras 10 minutos a 99°C y enfriar en hielo inmediatamente para desnaturalizar el producto de PCR.
- d. Lavar la membrana 5 minutos en 250 mL 2xSSPE/0.1% SDS, 60°C.
- e. Desarmar el miniblatter, retirar el soporte de protección y colocar un soporte nuevo sobre el cual se colocará la membrana (ver figura 4) teniendo cuidado de que los oligonucleótidos queden viendo hacia arriba y que al momento de cerrar el miniblatter la disposición de los oligonucleótidos sea perpendicular a la posición de vaciado de las muestras. Cerrar el miniblatter ajustando con firmeza.
- f. Remover el fluido residual de las ranuras del miniblatter por aspiración.
- g. Rellenar las ranuras con los productos de PCR diluidos. Evitar la formación de burbujas. Hibridar 60 minutos a 60°C en un horno para hibridación en

una superficie horizontal sin agitar para evitar contaminación con ranuras vencidas.

- h. Remover las muestras del miniblatter por aspiración, desarmar el miniblatter y tomar la membrana por una esquina usando pinzas.
- i. Lavar la membrana dos veces con 250 mL 2xSSPE/0.5% SDS, 60°C por 10 minutos.
- j. Colocar la membrana en un la botella de hibridización. Permitir que se enfríe, para evitar la inactivación de la streptavidina-peroxidasa que se le va agregar.
- k. Agregar 2.5  $\mu$ L del conjugado streptavidina-peroxidasa (500 U/mL) a 10 mL de 2xSSPE/0.5% SDS, 60°C e incubar la membrana en esta solución de 45 a 60 minutos a 42°C en el cilindro de rodamiento.
- l. Lavar la membrana dos veces en 250 mL 2xSSPE/0.5% SDS, 42°C por 15 minutos.
- m. Enjuagar la membrana dos veces con 250 mL 2xSSPE por 5 minutos a temperatura ambiente.
- n. Para la detección por quimioluminiscencia se incuba la membrana por 1 minuto en 20 mL de líquido de detección ECL.
- o. Dentro de cassette de exposición cubrir la membrana con una sección de plástico transparente y exponerla al Hyperfilm (filme de rayos x) por 20 minutos.

- p. Si la señal es muy débil o muy fuerte la membrana se puede usar otra vez directamente para exponer otra película por un período más corto o más prolongado (50).
- q. El filme será revelado en la sección de Rayos X del hospital en el equipo marca Compact Protec de Procesor-Tecnology de Alemania.

### **Observaciones.**

- A. No reutilizar los soportes de goma de espuma.
- B. Si menos de 45 muestras se cargan en el miniblotter, rellenar una línea vecina con 2xSSPE/0.1% SDS para prevenir el flujo cruzado entre las líneas.
- C. Use un contenedor plástico. No use este contenedor para otros propósitos, ya que algunos reactivos disminuyen la intensidad de los patrones de espoligotipo.
- D. Las manchas negras que interfieren con la visualización de los patrones de los espoligotipos pueden ocurrir posiblemente debido a la contaminación durante la manipulación de la membrana (tocada con los dedos). Comenzar otra vez en el paso 8. Áreas blancas en los patrones de espoligotipos posiblemente indican que la membrana no está completamente humedecida con el líquido de detección ECL. Comenzar otra vez en el paso 13 (50).

### **5. Reuso de la membrana**

- a. Lavar la membrana dos veces por incubación en 1% de SDS a 80°C por 30 minutos.
- b. Lavar la membrana con 20 mM de EDTA (pH = 8), por 15 minutos a temperatura ambiente.

- c. Almacenar la membrana a 4°C hasta su uso (en una bolsa plástica con cierre automática para evitar deshidratación de la membrana) (50).

#### **D. Análisis de Datos**

Se llevó a cabo un estudio de corte transversal observacional descriptivo. Los espoligotipos encontrados fueron comparados en diferentes bases de datos internacionales para su análisis.

## VIII. RESULTADOS

En este estudio se caracterizaron genótipicamente, por medio de la técnica de espigotipificación 39 cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) aisladas de 34 pacientes que asistieron a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” y a otros servicios del Hospital General San Juan de Dios. Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

### *Características poblacionales de los pacientes*

En este estudio fueron incluidas 39 cepas identificadas, a través de sondas moleculares como complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), pertenecientes a 34 pacientes. Las muestras provenían de 21 hombres y 13 mujeres, que oscilaban entre los 15 a 71 años. De estos el 76.5% (26) se encontraban entre los 16 y 40 años de edad. El 38.2% (13) de los pacientes estaban coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Todos los pacientes eran guatemaltecos y al momento del estudio el 55.9% (19) de ellos vivían en el departamento de Guatemala mientras que el resto residían en el interior de la República. Un total de 82.4% (28) pacientes se auto-denominaban como ladinos, el 17.6% (6) restantes como pertenecientes a alguna etnia maya.

Cerca del 35.3% (12) de pacientes completó la educación básica y diversificado, mientras que el 67.7% (22) sólo educación primaria o ninguna. El ingreso promedio mensual fue de Q.1511.76 ( $\pm 536.98$ ). Los resultados se resumen en la tabla No. 1.

La mayoría de los pacientes del estudio se encontraban en edad económicamente activa (entre los 16 y 60 años de edad), residentes de la ciudad capital del país, solteros, con educación formal completada hasta la educación básica, mestizos y con ingreso mensual

menor al salario mínimo del país (alrededor de Q.1700.00). Las únicas asociaciones significativas entre los pacientes infectados con VIH/SIDA y los que no estaban infectados estaban relacionadas a la etnia ( $p = 0.041$ ) y el ingreso mensual ( $p=0.042$ ).

**Tabla No. 1. Datos demográficos de pacientes y características poblacionales (N = 34)**

Parámetro	VIH/SIDA negativo (n = 21)	VIH/SIDA positivo (n = 13)	valor p
<b>Edad (n = 34)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<15 (1)	1 (4.8)	0	
16-40 (26)	15 (71.4)	11 (84.6)	0.64
41-60 (4)	2 (9.5)	2 (15.4)	0.97
>60 (3)	3 (14.3)	0	
<b>Género (n = 34)</b>			
Masculino (21)	10 (47.6)	11 (84.6)	0.073
Femenino (13)	11 (52.4)	2 (15.4)	0.073
<b>Residencia (n = 34)</b>			
Ciudad capital (19)	10 (47.6)	9 (69.3)	0.22
Interior (15)	11 (52.4)	4 (30.7)	0.22
<b>Estado civil (n = 34)</b>			
Soltero (18)	11 (52.4)	7 (53.8)	0.93
Casado (3)	2 (9.5)	1 (7.7)	0.66
Viudo/Divorciado (5)	3 (14.3)	2 (15.4)	0.68
Unión Libre (8)	5 (23.8)	3 (23.1)	0.71
<b>Paciente vive con (n = 34)</b>			
Cónyuge (11)	7 (33.3)	4 (30.8)	0.82
Padres (14)	8 (38.1)	6 (46.2)	0.64
Hijos (3)	3 (14.3)	0	
Otros (6)	3 (14.3)	3 (23.0)	0.85
<b>Escolaridad (n = 34)</b>			
Primaria/Básicos (29)	17 (81.0)	12 (92.3)	0.68
Diversificado (1)	1 (4.8)	0	
Ninguna (4)	3 (14.2)	1 (7.7)	0.97
<b>Etnia (n = 34)*</b>			
Ladinos (28)	20 (95.2)	8 (61.5)	0.041
Etnias mayas (6)	1 (4.8)	5 (38.5)	0.041
<b>Ingreso Mensual* (Promedio)</b>	Q.1657.14 (±478.1)	Q.1276.92 (±561.5)	0.042

\* La etnia y el ingreso mensual fueron las únicas características con asociación significativa entre ambos grupos.



### *Descripción de espoligotipos encontrados*

Los espoligotipos encontrados en este estudio fueron clasificados según dos bases de datos: SpolDB4 y SITVIT. La base SpolDB4 fue publicada en 2006 por Brudye *et al.*, y contiene información específica por área geográfica lo que permitió la comparación de espoligotipos por regiones. La base de datos SITVIT se encuentra en línea y la actualiza el Instituto Pasteur de Guadalupe<sup>1</sup>. La base SITVIT permitió la clasificación de los espoligotipos encontrados en este estudio dentro de familias y SITs específicos.

Las 39 cepas caracterizadas como complejo *M. tuberculosis* fueron agrupadas en 20 diferentes espoligotipos. De éstas, 35 cepas se clasificaron en 18 espoligotipos que ya han sido reportados en la base de datos internacional SITVIT/SpolDB4 mientras que 4 cepas se agruparon en 2 espoligotipos que no habían sido reportados a julio de 2010 en SITVIT/SpolDB4 (ver tabla No. 2). De estas últimas cepas, 3 compartían un espoligotipo y 1 cepa huérfana. Todos los pacientes de los que sea aislaron dos o más cepas de distintos sitios anatómicos compartían el mismo espoligotipo, por lo que el análisis se basó en 34 cepas. Todas las cepas espoligotipificadas, a excepción de las 4 cepas no reportadas en SITVIT/SpolDB4, fueron clasificadas en 6 familias, éstas fueron las familias: Beijing (2), Latino Americana-Mediterráneo (LAM) (10), T (8), Haarlem (H) (1), X (6) y U (3). El 29.4% (10) de las cepas pertenecieron a la familia LAM (subfamilias LAM3 y LAM9), por lo que ésta familia fue la más frecuente en el estudio. Aunque esta familia ha sido reportada en todo el mundo, predomina en Latinoamérica representando hasta el 40% de cepas aisladas en la región. Las otras dos familias más frecuentes fueron la T y X, con 23.5% (8) y 17.6% (6) de las cepas, respectivamente. Estas tres familias (LAM, T y X) en

<sup>1</sup> El Instituto Pasteur de Guadalupe con sede en la isla caribeña de Guadalupe es un anexo del Instituto Pasteur de Francia, que se especializa en el estudio de enfermedades infecciosas.

conjunto fueron aisladas en el 71% (24) de los pacientes del estudio. Las familias H y U y los espoligotipos GUA01 y GUA02 (éstos últimos dos nombrados provisionalmente mientras se asigna nombre oficial) mostraron una frecuencia 24% (8) de las cepas tipificadas. El 6% (2) de las cepas pertenecieron a la familia Beijing.

**Tabla No. 2. Descripción de 19 SIT encontrados para este estudio y su comparación con SITVIT.**

SIT #	Código octal	No. de cepa ¥	Cepas en este estudio (n = 39)	% en este estudio	Cepas en SITVIT	% en SITVIT	% en estudio comparado con SITVIT	Linaje/Etiqueta
1	00000000003771	85, 89 27, 44, 72,	2	5,1	2965	7,5	0,1	Beijing
33	776177607760771	153, 161	5	12,8	609	1,5	0,8	LAM3
42	777777607760771	38	1	2,6	1307	3,3	0,1	LAM9
44	77777757760771	94, 95	2	5,1	121	0,3	2,0	T5
50	7777777720771	76	1	2,6	1203	3,0	0,1	H3
53	7777777760771	24, 59, 77	3	7,7	2380	6,0	0,1	T1
70	70007677760671	28, 29	2	5,1	50	0,1	4,0	X3
73	7773777760731	52	1	2,6	131	0,3	0,8	T2-T3
92	70007677760771	87	1	2,6	255	0,6	0,4	X3
119	7777677760771	33, 99	2	5,1	414	1,0	0,5	X1
130	776177607760731	43, 45, 55 100, 102,	3	7,7	44	0,1	6,8	LAM3
137	7777677760601	105	3	7,7	298	0,8	1,0	X2
160	77777477400001	30	1	2,6	9	0,0	11,1	U
222	77774077560771	49 12, 47, 50,	1	2,6	9	0,0	11,1	T1
237	7777777700000	53	4	10,3	54	0,1	7,4	U (likely H3)
376	376177607760771	107	1	2,6	14	0,0	7,1	LAM3
638	001777607760771	39	1	2,6	2	0,0	50,0	LAM9
732	7776377760771	96	1	2,6	9	0,0	11,1	T1
GUA01€	000000004620731	69, 91, 106	3	7,7	REPORTADO NO	APLICA NO	NO APLICA	NO ID
GUA02	376077600000000	97	1	2,6	REPORTADO	APLICA	NO APLICA	NO ID

‡ SIT son las siglas en inglés del *Tipo internacional compartido* que es la nomenclatura usada para identificar a las cepas del complejo *M. tuberculosis* que pertenecen al mismo espoligotipo.

¥ Las cepas 43 y 45; 28 y 29; 47, 50 y 53; 100 y 102, corresponden a los 4 pacientes de los que se aislaron cepas de diferentes sitios anatómicos.

€ La nomenclatura GUA01 y GUA02 será utilizada arbitrariamente en este estudio para definir dos espoligotipos que no han sido reportados en SITVIT/SpolDB4.

*Distribución de SITs por regiones*

Con respecto al análisis en base a los SITs encontrados, el 53.9% estuvo conformado por: SIT33-LAM3 (n=5), SIT237-U (likely H3) (n=4), SIT53-T1 (n=3), SIT130-LAM3 (n=3), SIT137-X2 (n=3) y GUA01 (n=3). Los SITs (n=18) restantes representaron menos del 3% de frecuencia en este estudio. Una comparación de estos resultados se presenta en la tabla No. 3. En la misma se puede observar que: el SIT33-LAM3 fue según SpolDB4 más frecuentemente aislado en Estados Unidos (26%), Argentina (17.5%) y Suráfrica (14.6%). El SIT237-U (likely H3) ha sido reportado en Estados Unidos (17.6%), Austria (13.5%), Alemania (10.8%) y países del Este de Europa (17.6%). Los otros SITs más frecuentes en el país presentaron una distribución mundial amplia la cual incluye a Estados Unidos, Italia, Suráfrica, Francia de Ultramar<sup>2</sup> y Reino Unido.

<sup>2</sup> Francia de Ultramar se refiere a las dependencias o territorios bajo soberanía francesa situados fuera del continente europeo.

**Tabla No. 3. SITs más frecuentes en el estudio y su distribución mundial según SpolDB4 (n = 18)**

SIT ‡	Etiqueta	Código Octal	Número en estudio n (%)	% en estudio comparado con SpolDB4	Distribución por país País (% en SpolDB4) ¥
33	LAM3	776177607760771	5 (12.8)	1,0	USA <sup>£</sup> (26.0), ARG (17.5), ZAF (14.6), ESP (5.3)
237	U (likely H3)	777777777700000	4 (10.3)	0,2	USA (17.6), AUT (13.5), DEU (10.8), RUS (9.4), POL (8.1), CMR (6.8), IDN (6.8), ITA (6.8)
53	T1	777777777760771	3 (7.7)	7,0	USA (43.6), FXX (6.0), ITA (5.0)
130	LAM3	776177607760731	3 (7.7)	0,1	USA (61.8), ITA (11.8), ZAF (8.8)
137	X2	777776777760601	3 (7.7)	2,0	USA (81.1), GBR (7.6)

‡ Se incluyeron en esta tabla los SIT que representaran más del 5% de los espilogotipos del estudio. La cepa GUA01 no fue incluida debido a que no está reportada en SpolDB4.

¥ Aparecen incluidos los países que representan más del 5% de los SITS reportados en la base.

£ La abreviación de tres letras de los nombres de los países se ha realizado de acuerdo a la norma ISO 3166-1. Fuente: Base de datos SITVIT/SpolDB4 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>).

#### *Familias y distribución geográfica en Guatemala*

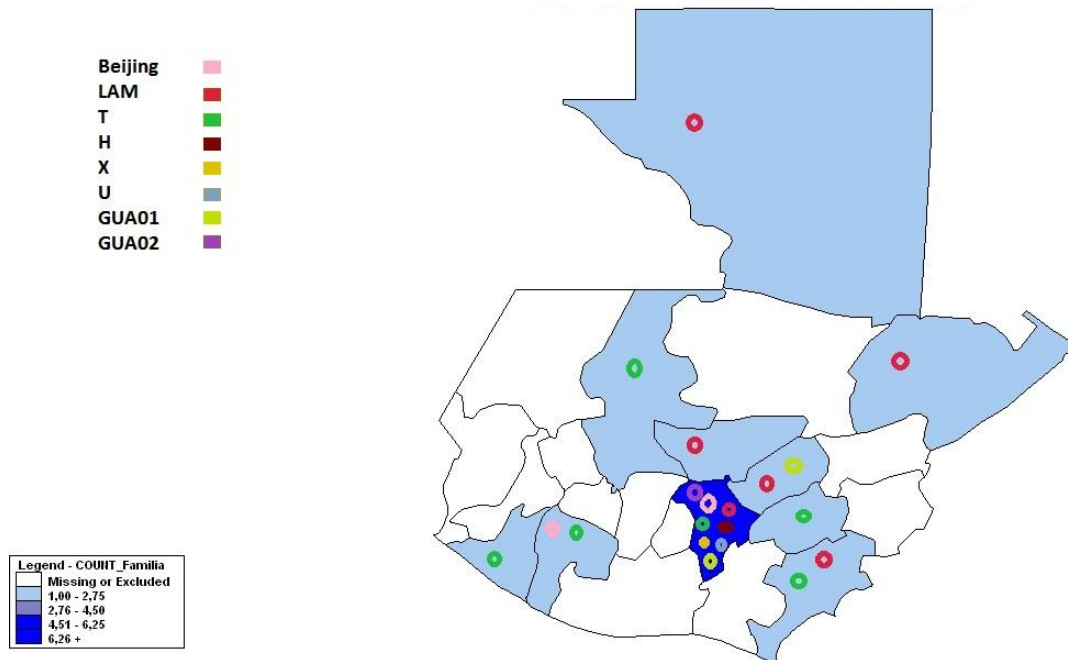
Con respecto a las familias de MTC y su distribución geográfica en el país la familia LAM fue aislada en su mayoría en el departamento de Guatemala (n=3), seguido en frecuencia por los departamentos de Jutiapa (n=2) e Izabal (n=2). Mientras que La familia T, fue más frecuente en los departamentos de Guatemala (n=2) y Retalhuleu (n=2). En lo que respecta a la familia Beijing solo fue encontrada en los departamentos de Guatemala (n=1) y Suchitepéquez (n=1). El espilogotipo GUA01 fue aislado en Guatemala (n=2) y El Progreso (n=1). Las familias Haarlem (n=1), X (n=6), U (n=3) y el espilogotipo GUA02 (n=1) fueron encontradas exclusivamente en el departamento de Guatemala. La distribución geográfica de las familias se observa en la tabla No. 4.

Tabla No. 4. Distribución geográfica en Guatemala de las cepas espoligotipificadas (N = 34) ‡

Departamento	Beijing n (%)	LAM n (%)	T n (%)	H n (%)	X n (%)	U n (%)	GUA01 n (%)	GUA02 n (%)	Total
<b>Capital y alrededores</b>									
Guatemala	1 (50)	3 (30)	2 (25)	1 (100)	6 (100)	3 (100)	2 (66.7)	1 (100)	<b>19 (55.9)</b>
<b>Interior</b>									
Jutiapa	-	2 (20)	1 (12.5)	-	-	-	-	-	3 (20)
El Progreso	-	1 (10)	-	-	-	-	1 (33.3)	-	2 (13.3)
Izabal	-	2 (20)	-	-	-	-	-	-	2 (13.3)
Retalhuleu	-	-	2 (25)	-	-	-	-	-	2 (13.3)
Suchitepequez	1 (50)	-	1 (12.5)	-	-	-	-	-	2 (13.3)
Baja Verapaz	-	1 (10)	-	-	-	-	-	-	1 (6.7)
Jalapa	-	-	1 (12.5)	-	-	-	-	-	1 (6.7)
Petén	-	1 (10)	-	-	-	-	-	-	1 (6.7)
Quiché	-	-	1 (12.5)	-	-	-	-	-	1 (6.7)
<b>Total Interior</b>	<b>1 (50)</b>	<b>7 (70)</b>	<b>6 (75)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1 (33.3)</b>	<b>0</b>	<b>15 (44.1)</b>

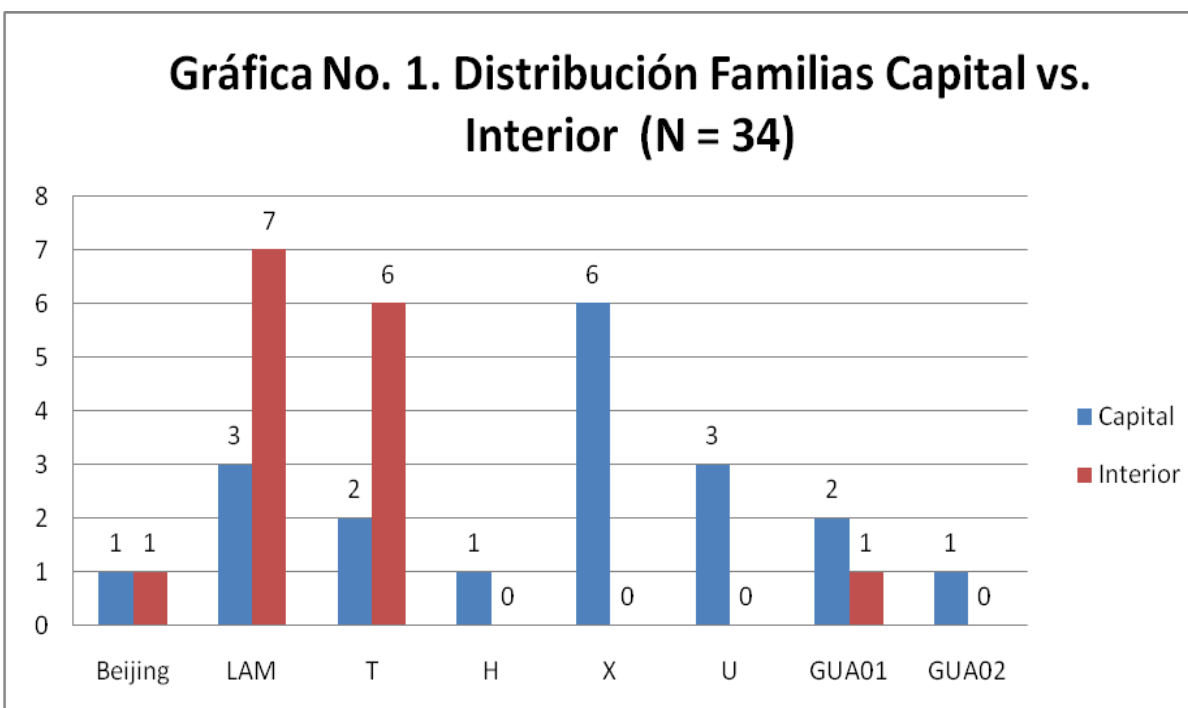
‡ Listado de departamentos en los cuales se aisló al menos una cepa del complejo *M. tuberculosis* y que se caracterizaron genéticamente en éste estudio.

En la Figura No. 1 se muestra la distribución de familias de MTC en los departamentos del país en los que se haya aislado al menos una cepa. Todas las familias se encontraron en la región central de Guatemala, mientras que en el interior de la República no ocurrió esta situación.



**Figura No. 1.** La familia LAM (70%) más frecuente en el interior del país y fue aislada en los departamentos de Petén, Izabal, Baja Verapaz, El Progreso y Jutiapa. Igualmente ocurrió con la familia T (75%) que se encontró en los departamentos de Quiché, Suchitepéquez, Retalhuleu, Jalapa, Jutiapa. Ambas familias fueron aisladas en el departamento de Guatemala pero en menor proporción. El departamento de Guatemala fue el único en donde se encontraron todas las familias.

En la gráfica No. 1 se observa que el 55.9% (19) de los pacientes de los que se aislaron cepas de MTC residían en el departamento central de Guatemala y sus municipios, mientras que el restante 44.1% (15) residían en el interior. Luego de Guatemala el departamento del con mayor frecuencia de cepas fue Jutiapa con el 8.9% (3) de las muestras del interior, le siguieron con el 5.9% (2) de las cepas los departamentos de El Progreso, Izabal, Retalhuleu y Suchitepéquez. Las dos familias más frecuentes en el interior del país fueron la familia T con un 75% (6) de prevalencia contra 25% (2) del departamento central de Guatemala y la familia LAM con un 70% (7) de prevalencia mientras que en la capital ésta representó el 30% (3). Las familias H, X y U y el espoligotipo GUA02 fueron exclusivos de la región central de Guatemala.



**Descripción de frecuencias de familias Capital vs. Interior.** Las familias T y LAM fueron las únicas aisladas en mayor proporción en el interior del país que en la capital. Las familias H, X, U y espoligotipo GUA02 fueron exclusivos de la capital.

#### *Distribución de familias, demográfica y factores reportados como asociados*

Con respecto a la distribución de las familias del complejo *M. tuberculosis* y su relación con algunos factores reportados como asociados la familia LAM se distribuyó mayoritariamente entre aquellos pacientes sin infección de VIH/SIDA (n=8) y aquellos sin ventilación en su lugar de trabajo (n=5). La familia T (n=6) fue frecuentemente encontrada en pacientes sin VIH/SIDA. Las familias X (n=5) y U (n=3) fueron identificadas en pacientes infectados con VIH/SIDA. La familia Beijing fue encontrada en igual proporción en pacientes con y sin VIH/SIDA. Sin embargo, los pacientes infectados con estas familias compartían habitación con más de 2 personas. La familia H y los espoligotipos GUA01 y GUA02 fueron exclusivamente aislados de pacientes sin VIH/SIDA.

De las 13 cepas aisladas de pacientes con VIH/SIDA, 5 cepas fueron clasificadas dentro de la familia X. Además las 3 cepas pertenecientes a la familia U fueron aisladas exclusivamente de pacientes con VIH/SIDA. De pacientes sin VIH/SIDA se aislaron 21 cepas, las cuales en su mayoría (67%) fueron agrupadas dentro de las familias LAM y T.

Los 3 pacientes privados de libertad habían cumplido condenas, 2 de ellos (uno con cepa Beijing y otro con cepa T1) estuvieron recluidos en el centro preventivo de Mazatenango, Suchitepéquez, el otro paciente (cepa X1) estuvo recluido en un centro carcelario de la ciudad capital. En lo que respecta a aglomeraciones en transporte, 14 pacientes afirmaron viajar en buses llenos de personas. De estas 14 personas 1 de ellas se le identificó la familia Beijing. En general todos los pacientes del estudio compartían dormitorio con una persona o más (1.7 en promedio). Esta información se presenta en la tabla No. 5.



Tabla No. 5. Distribución de Familias y factores asociados (N = 34)

Factores Asociados	Beijing (n = 2) n (%)	LAM (n = 10) n (%)	T (n = 8) n (%)	H (n = 1) n (%)	X (n = 6) n (%)	U (n = 3) n (%)	GUA01 (n = 3) n (%)	GUA02 (n = 1) n (%)	Total (n = 34) n (%)
<b>VIH/SIDA</b>									
Positivo	1 (50)	2 (20)	2 (25)	-	5 (83.3)	3 (100)	-	-	13 (38.2)
Negativo	1 (50)	8 (80)	6 (75)	1 (100)	1 (16.7)	-	3 (100)	1 (100)	21 (61.8)
<b>Ventilación en lugar de trabajo</b>									
Si	1 (50)	2 (20)	3 (37.5)	-	1 (16.7)	-	1 (33.3)	1 (100)	9 (26.5)
No	-	5 (50)	1 (12.5)	-	1 (16.7)	2 (66.7)	2 (66.7)	-	11 (32.4)
No sabe	1 (50)	3 (30)	4 (50)	1 (100)	4 (66.6)	1 (33.3)	-	-	14 (41.1)
<b>Estancia en cárcel</b>									
Si	1 (50)	-	1 (12.5)	-	1 (16.7)	-	-	-	3 (8.8)
No	1 (50)	10 (100)	7 (87.5)	1 (100)	5 (83.3)	3 (100)	3 (100)	1 (100)	31 (91.2)
<b>Aglomeración bus</b>									
Si	1 (50)	4 (40)	3 (37.5)	-	2 (33.3)	2 (66.7)	2 (66.7)	-	14 (41.2)
No	1 (50)	6 (60)	5 (62.5)	1 (100)	4 (66.7)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (100)	20 (58.8)
<b>Consumo de tabaco</b>									
Si	-	1 (10)	1 (12.5)	-	1 (16.7)	2 (66.7)	-	-	5 (14.7)
No	2 (100)	9 (90)	7 (87.5)	1 (100)	5 (83.3)	1 (33.3)	3 (100)	1 (100)	29 (85.3)
<b>Consumo de bebidas alcohólicas</b>									
Si	1 (50)	3 (30)	1 (10)	-	2 (33.3)	2 (66.7)	-	-	9 (26.5)
No	1 (50)	7 (70)	7 (70)	1 (100)	4 (66.7)	1 (33.3)	3 (100)	1 (100)	25 (73.5)
<b>Conviviente por dormitorio</b>	2.5	1.4	2.3	2.7	1.7	0.7	1.7	0.5	1.7

### *Familias del complejo M. tuberculosis e información clínica de los pacientes*

En este estudio se encontró información acerca de la distribución de las familias del complejo *M. tuberculosis* de las cepas aisladas con respecto a datos clínicos de los pacientes. La familia LAM fue aislada principalmente en pacientes con primer diagnóstico de tuberculosis (n=9), sin embargo, fue aislada en un paciente que ya había sido diagnosticado con la enfermedad. La localización de la tuberculosis causada por esta familia tuvo la misma proporción, en la presentación pulmonar (n=5) como la extrapulmonar (n=5). La familia T fue aislada exclusivamente de pacientes con primer diagnóstico de tuberculosis (n=8) y un paciente infectado con esta familia falleció en el tiempo que duró este estudio. La localización de la tuberculosis causada por la familia Beijing fue en su totalidad pulmonar (n=2). Las familias X (n=3) y U (n=2) fueron aisladas

en mayor proporción de muestras extrapulmonares. Para los 32 pacientes incluidos de este estudio fue su primer diagnóstico de tuberculosis. Los 2 casos restantes habían padecido la enfermedad con anterioridad. Uno presentó una cepa de la familia LAM y era originario de Baja Verapaz con diagnóstico de 1 mes atrás y el segundo caso fue diagnosticado hace 6 años con tuberculosis y en el presente estudio presentó una cepa de la familia X. En el primer caso el paciente completó tratamiento y en el segundo el paciente se encontraba cumpliendo el protocolo de antituberculosos. Treinta pacientes habían recibido tratamiento antifímico (consistente en isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida), aunque no se pudo corroborar si completaron el esquema del tratamiento. Estos datos se observan en la tabla No. 6.

Durante el estudio 3 pacientes fallecieron, de los cuáles 2 estaban infectados con VIH/SIDA. Las familias identificadas en los pacientes fallecidos fueron la LAM, T y X.

Tabla No. 6. Información clínica de TB y relación con familias (N = 34)

Parámetro	Beijing (n = 2) n (%)	LAM (n = 10) n (%)	T (n = 8) n (%)	H (n = 1) n (%)	X (n = 6) n (%)	U (n = 3) n (%)	GUA01 (n = 3) n (%)	GUA02 (n = 1) n (%)	Total (n = 34) n (%)
<b>Primer Diagnóstico TB</b>									
Si	2 (100)	9 (90)	8 (100)	1 (100)	5 (83.3)	3 (100)	3 (100)	1 (100)	32 (94.1)
No	-	1 (10)	-	-	1 (16.7)	-	-	-	2 (5.9)
<b>Tiempo con TB (días promedio)</b>	17.5 (3.5)	20.6 (18.0)	19.8 (12.3)	15	10.0 (7.9)	3.3 (1.5)	40.0 (22.9)	5	18.0 (17.3)
<b>Tratamiento TB recibido</b>									
Si	2 (100)	9 (90)	7 (87.5)	1 (100)	4 (66.7)	3 (100)	3 (100)	1 (100)	30 (88.2)
No	-	1 (10)	1 (12.5)	-	2 (33.3)	-	-	-	4 (11.8)
<b>Antituberculosos recibidos</b>									
Estreptomicina	-	-	1 (12.5)	-	1 (16.7)	-	-	-	2 (5.9)
Isoniacida	2 (100)	9 (90)	7 (87.5)	1 (100)	4 (66.7)	3 (100)	3 (100)	1 (100)	30 (88.2)
Rifampicina	2 (100)	9 (90)	6 (75)	1 (100)	4 (66.7)	3 (100)	3 (100)	1 (100)	29 (85.3)
Etambutol	2 (100)	9 (90)	7 (87.5)	1 (100)	4 (66.7)	3 (100)	3 (100)	1 (100)	30 (88.2)
Pirazinamida	2 (100)	9 (90)	6 (75)	1 (100)	4 (66.7)	3 (100)	3 (100)	1 (100)	29 (85.3)
<b>Localización de TB</b>									
Pulmonar	2 (100)	5 (50)	5 (62.5)	1 (100)	2 (33.3)	1 (33.3)	1(33.3)	1 (100)	18 (52.9)
Extrapulmonar	-	5 (50)	3 (37.5)	-	3 (66.7)	2 (66.7)	2(66.7)	-	16 (47.1)
<b>Estatus del paciente</b>									
Vivo	2 (100)	9 (90)	7 (87.5)	1 (100)	5 (83.3)	3 (100)	3 (100)	1 (100)	31 (91.2)
Fallecido	-	1 (10)	1 (12.5)	-	1 (16.7)	-	-	-	3 (8.8)

## IX. DISCUSIÓN

En Guatemala, las investigaciones en el campo de la epidemiología molecular son muy pocas o casi inexistentes. Este estudio describe los patrones genéticos por espoligotipificación de cepas guatemaltecas de MTC y su relación entre el tipo de paciente y las cepas.

Al realizar el análisis de la distribución de las familias de MTC halladas para Guatemala y su comparación con los países vecinos de Centroamérica (Belice, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá), México y el Caribe se deben considerar dos factores importantes: 1) la desproporción existente entre la cantidad de cepas reportadas por México y el Caribe en comparación con la cantidad de cepas reportadas por los países centroamericanos en SpolDB4 (base de datos que es la referencia en este estudio)(21). Cuando se analizan detenidamente los países que aportaron cepas a SpolDB4 se puede notar como los países de Centro América (Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras, Costa Rica, Nicaragua y Panamá) se encuentran poco representados. Por lo tanto es probable que conforme se hagan más estudios en los países de Centro América y estos se reporten en bases de datos internacionales las prevalencias de las diferentes familias pueda variar según la región geográfica específica y puedan en algún momento coincidir con los hallazgos de éste estudio; y 2) la historia de migraciones humanas externas e internas de los distintos países a comparar (20). Se cree que la expansión de la tuberculosis y las familias pertenecientes al MTC se ha dado en el mundo a través de las distintas migraciones entre poblaciones humanas (20).

La familia más frecuentemente encontrada fue la LAM (29.4%), a pesar de que según SpolDB4 ésta familia ocupa el tercer lugar en frecuencia en la región

centroamericana. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que los resultados de este estudio se ven apoyados en la evidencia existente acerca de la distribución cosmopolita de esta familia, que representa hasta el 40% de los aislamientos obtenidos en Sur América, siendo la más prevalente en esa región vecina, y cerca del 25% de los que se realizan en Centro América (21, 51). La familia LAM, además de Latinoamérica, se encuentra presente en la cuenca del Mediterráneo (España 30%). Históricamente Guatemala fue habitada por oleadas de migrantes provenientes de España a partir del siglo XVI, lo que podría explicar la llegada de las cepas de esta familia a la región (52).

Aunque la familia T no fue la más prevalente en el país, fue la segunda familia más encontrada en éste estudio. Esta familia, que representa las cepas modernas de tuberculosis, fue según SpolDB4, la más frecuente en Centro América, además de que se ha encontrado en todos los continentes, representando hasta el 30% de todas las cepas reportadas en SpolDB4. Agrupa un conjunto de cepas genéticamente mal definidas, por lo que, se esperaría en un futuro poder definir adecuadamente a las cepas clasificadas en esta familia y comprender mejor su dinámica y distribución regional (20, 21).

La familia X, la tercera familia más frecuente en este estudio, representa un grupo de cepas, con bajo número de IS6110, altamente prevalentes en Norte América (21.5%) y Centro América (11.9%), relacionada a la colonización inglesa de estas regiones (21). La presencia de esta familia ha sido reportada en el Reino Unido, Estados Unidos, Australia y colonias británicas en el Caribe (20). En Guatemala podría esperarse por lo tanto una cantidad significativamente alta de cepas de ésta familia, sustentando esto en base de que Belice, país caribeño vecino de Guatemala que con anterioridad formaba parte del país, fuera colonia británica hasta antes de 1981 (53). Sugiriendo esto que la presencia de la

familia X en el país se haya podido dar principalmente a través de migraciones poblacionales de Belice hacia el territorio guatemalteco y viceversa.

Las cepas de la familia Beijing reportadas por primera vez en este estudio, están asociadas generalmente a tuberculosis multidrogo resistente (MDR, resistencia contra, al menos, rifampicina e isoniacida) y a cuadros febriles severos (54, 55). Cerca del 6% de las cepas de este estudio pertenecieron a esta familia, una prevalencia que triplica el cerca del 2% de cepas de la familia Beijing que se reportan en total en el área de Centro América, según SpolDB4 (21). Lo mismo ocurrió cuando se comparó la prevalencia encontrada por otros estudios en la región de Latino América en general. En la base internacional SITVIT para la región de Sur América se ha reportado una baja prevalencia y para Centro América aún, en la literatura reportada hasta la fecha no se ha reportado alguna cepa de ésta familia (56, 57). La familia Beijing, ha sido descrita en China y además es prevalente en el Lejano Oriente<sup>3</sup> (45.9%), Mediano Oriente<sup>4</sup> (16.5%) y Oceanía (17.2%). Estas cepas se diseminan a otras partes del mundo principalmente por la inmigración de pacientes originarios de éstas regiones (54). Las dos cepas aisladas en este estudio pertenecían a pacientes de origen guatemalteco y no se pudo encontrar información de que hubieran tenido contacto con migrantes asiáticos. Uno de los pacientes guatemaltecos infectados con la familia Beijing al momento del estudio trabajaba como ayudante (cobrador) de bus urbano, lo que podría potenciar su capacidad de contacto con otras personas y ayudar con la dispersión de estas cepas.

La familias halladas con menos frecuencia en el estudio fueron la familia Haarlem (H) y la familia U. De acuerdo a SpolDB4 la familia H es una de las tres más prevalentes

3 Según SpolDB4 el término Lejano Oriente incluye países situados al este del continente euroasiático (China, Japón, Vietnam, Corea, Birmania, etcétera).

4 Según SpolDB4 el término Mediano Oriente incluye países situados al sudoeste de Asia (Arabia Saudita, Irak, Israel, Jordania, Omán, etcétera).

en la región de Centro América, dato que no concuerda con este estudio en el cual ésta familia es la menos prevalente, representando cerca del 3% de los aislamientos (20, 21). En lo que respecta a la familia U esta representa a todos aquellos SIT que permanecen sin clasificar, ya que no cumplen ninguna regla para formar parte de las demás familias “convencionales”. En esta familia de distribución mundial se agrupan cepas que presentan bloques de delección, deleciones diseminadas o patrones que no son comunes en ninguna otra familia (20, 21). En este estudio se aisló de dos pacientes el mismo tipo de cepa perteneciente a la familia U y éstas presentaban características genéticas parecidas a las encontradas en la familia H. Sin embargo, se deben hacerse más estudios para determinar la manera de clasificar correctamente estos espoligotipos en el futuro.

En este estudio se hallaron dos espoligotipos, GUA01 y GUA02, que no han sido reportados en SITVIT/SpolDB4 por lo que no se han clasificado en alguna familia específica. El espoligotipo GUA01 fue hallado en dos pacientes, mientras que el espoligotipo GUA02 se clasificó como espoligotipo huérfano, ya que, fue hallado en un solo paciente de este estudio. Estas cepas deberán ser reportadas en un futuro a la base de datos internacional para poder hacer el análisis epidemiológico molecular correcto y determinar a qué familia pertenecen.

Cuando se hizo el análisis en base a los tipos compartidos o SITs, los espoligotipos más frecuentes en este estudio (representando 21/34 cepas ó 61.6% de las cepas) fueron en orden decreciente: SIT33-LAM3 (12.8%), SIT237-U (10.3%), SIT44-T5 (7.7%), SIT53-T1 (7.7%), SIT130-LAM3 (7.7%), SIT137-X2 (7.7%). Todos estos SITs han sido reportados como predominantes en Estados Unidos, incluidos SIT33-LAM3 y SIT237-U, que fueron los dos SITs más frecuentes en este estudio. El SIT33-LAM3, también ha sido encontrado

frecuentemente en la región de Sur América (Argentina, Brasil y Venezuela) y además ha sido hallado en México, aunque la prevalencia en este país fue baja (menor al 0.3%) (58). El único nexo epidemiológico del SIT33-LAM3 con Centro América fue que en la base de datos SITVIT existen 11 cepas reportadas para El Salvador, las cuales fueron aisladas y tipificadas en los Estados Unidos. De estas 11 cepas reportadas 10 correspondían a éste SIT, por lo que podría esperarse que en El Salvador la prevalencia de esta cepa también fuera alta (56). Lo que respecta al SIT237-U nunca antes había sido reportado en la región de Centro América o México. Solamente ha sido informado en Estados Unidos, país que encabeza los aislamientos de este SIT. En Sur América sólo ha sido aislado en Brasil con una baja prevalencia. Sin embargo, el SIT237-U presenta una composición genética muy similar a la familia Haarlem, por lo que probablemente en estudios genéticos posteriores se clasifique este SIT dentro de esta familia (21, 56). El tercer SIT más frecuente en este estudio, el SIT44-T5, es mayoritariamente encontrado en Europa (Austria 25.0%, Italia 12.5% y República Checa 7.1%) lo que sugiere haya llegado a Guatemala con la inmigración europea, principalmente alemana, austriaca e italiana de finales del siglo XIX y principios del siglo XX (21, 52, 56).

Seis espoligotipos hallados en Guatemala superaron más del 5% del total de las cepas reportadas en SITVIT, éstas son: SIT130-LAM3 (6.8%), SIT376-LAM3 (7.1%), SIT237-U (7.4%), SIT160-U (11.1%), SIT222-T1 (11.1%) y SIT638-LAM9 (50.0%). Estos espoligotipos han sido reportados alrededor de todo el mundo, sin embargo, no ha sido demostrada su presencia en los otros países centroamericanos. En países cercanos a Guatemala los espoligotipos anteriores han sido hallados en: SIT130 en Estados Unidos, Cuba y Brasil; SIT376 en Estados Unidos, Brasil y Venezuela; SIT237 en Estado Unidos y



Brasil; SIT160 en Estados Unidos y Cuba; SIT222 en México, Perú y Estados Unidos. El SIT638 solamente ha sido aislado en Holanda y la cepa de ese SIT reportada en este estudio constituye la mitad de las reportadas en SITVIT. Deben realizarse estudios más amplios para determinar el movimiento de los SITs en diferentes áreas geográficas.

Con respecto a la distribución de cepas fue muy similar tanto en el departamento de Guatemala (55.9%) como para los restantes departamentos del país (44.1%), esto posiblemente por la localización del hospital en que se realizó el estudio. Tres departamentos del nor-oriental del país obtuvieron la mayor frecuencia de cepas: Jutiapa (20%), El Progreso (5.9%), Izabal (5.9%) representando en conjunto cerca del 32% total de las cepas aisladas para todo el país. Esto se explica debido a que los pacientes son atendidos en un centro urbano de referencia. La frecuencia de las familias T y LAM fue tres veces mayor en el interior del país que en el departamento central de Guatemala, al contrario de lo que ocurrió con las familias X, H, U y con el espoligotipo GUA02 que fueron exclusivos del departamento de Guatemala. En el departamento de Guatemala se observaron cepas de todas las familias. Esta distribución particular de familias en el departamento de Guatemala puede explicarse debido a la migración interna del interior del país hacia la capital (52, 53). Probablemente la inmigración por sí misma no explica este fenómeno, por lo que deben hacerse otros estudios para evaluar otras posibles causas.

La distribución de las familias X y U en el estudio fueron casi exclusivamente encontradas en pacientes con VIH/SIDA quienes representan la tercera parte de los pacientes de éste estudio. El principal factor de riesgo de una paciente para la manifestación de tuberculosis es padecer alguna enfermedad inmunosupresora, como el VIH/SIDA. Estudios recientes han sugerido la infección con cepas específicas de MTC en

poblaciones con VIH, aunque ninguno es concluyente en la manera en la que ocurre éste fenómeno (59-61). Existen otros factores de riesgo como la aglomeración y el contacto estrecho con otros pacientes infectados con el bacilo de la tuberculosis (62). Estos dos últimos factores de riesgo podrían sugerir que los pacientes con VIH/SIDA han podido infectarse en sus visitas y/o internamientos periódicos a los diferentes servicios médicos del hospital, sin embargo hacen falta más estudios epidemiológicos para concluir que los contagios se han dado de esta manera.

El hallazgo de tres pacientes privados de libertad infectados con las familias Beijing, T y X pone en evidencia un problema que puede estar generalizado en las cárceles del país. La sobrepoblación, la pobreza y la falta de atención médica en las cárceles hacen de las personas privadas de libertad una población vulnerable para la adquisición de tuberculosis (62). Se ha demostrado a través del uso de epidemiología molecular el activo contagio entre privados de libertad (63). Estudios en Rusia y otros países de Europa del Este han demostrado la alta prevalencia de la familia Beijing y cepas de *M. tuberculosis* multidrogo resistentes (64-67). Aunque las tres cepas aisladas en Guatemala pertenecían a diferentes familias de MTC y no se logró demostrar ninguna relación epidemiológica entre los tres pacientes privados de libertad, se hace necesario que se realicen estudios posteriores para determinar la dinámica de la tuberculosis en las cárceles nacionales y se pueda, por lo tanto, intervenir de manera efectiva para controlarla.

En dos pacientes participantes de este estudio se determinó que no era el primer diagnóstico de tuberculosis que se les realizaba. A través de espiligotipificación es posible determinar el perfil genético de una cepa, lo que es invariable en el tiempo, por lo que con ésta técnica es posible definir si un paciente ha sufrido una recaída con la misma cepa de

MTC o se ha reinfectado con una nueva (1). En el caso específico de los dos pacientes del estudio no se contó con ningún tipo de información o de tipificación molecular de su primer diagnóstico, pero si se puso en evidencia la necesidad de implementar técnicas moleculares como la espiligotipificación para el control y tratamiento de la enfermedad.

Aunque este estudio brinda el primer panorama de la distribución de las cepas de MTC tipificadas por medio de espiligotipificación en Guatemala y la importancia de la utilización de la técnica en el ámbito de la salud pública nacional, es conveniente tomar en cuenta las limitaciones del mismo: 1) el diseño epidemiológico que fue de corte transversal observacional descriptivo, por lo que solamente se limitó a describir a través de medidas de frecuencia la situación de las cepas aisladas en el Hospital General San Juan de Dios y no pudo demostrar causalidad entre la adquisición de familias del MTC y factores de riesgo; 2) El tamaño de la muestra, lo que no permitió comparar en forma apropiada los datos obtenidos de las cepas MTC de este estudio con los encontrados en las bases de datos internacionales (SpolDB4/SITVIT); 3) La no utilización de otras técnicas moleculares para tipificación de micobacterias como el PFLR o MIRU-VNTR, para aumentar la especificidad de información de cada cepa.

A pesar de lo anterior el presente estudio aporta datos para comprender mejor el comportamiento de la tuberculosis en el país. Es aconsejable que en un futuro se realicen estudios más extensos y que cubran mayores áreas geográfica del país, así como poblaciones más específicas o en riesgo (pacientes con VIH/SIDA, privados de libertad, etcétera). Sólo de esta manera se podrá poseer una visión más completa de la dinámica de la enfermedad y por lo tanto, permita diseñar estrategias razonables para el diagnóstico temprano, la contención y el tratamiento adecuado de la tuberculosis.

## X. CONCLUSIONES

1. La familia más frecuente en este estudio fue la LAM (29.4%), pese a que según SpolDB4 es la tercera familia más frecuente en la región centroamericana.
2. La familia T (23.5%) fue la segunda más frecuente en este estudio, pese a que según SpolDB4 es la familia más frecuente en la región centroamericana.
3. La familia X (17.6%) fue la tercera más frecuente en este estudio.
4. Se informa por primera vez la presencia de la familia Beijing (6%) en el país con una prevalencia más alta de la reportada en la región.
5. En el país existen espoligotipos que no han sido reportados ni clasificados en las bases de datos internacionales como lo demuestra la presencia de los espoligotipos GUA01 y GUA02.
6. Los espoligotipos más frecuentes en este estudio fueron en orden decreciente: SIT33-LAM3 (12.8%), SIT237-U (10.3%), SIT53-T1 (7.7%), SIT130-LAM3 (7.7%), SIT137-X2 (7.7%).
7. Seis espoligotipos hallados en este estudio superaron más del 5% del total de las cepas reportadas en SITVIT, éstas son: SIT130-LAM3 (6.8%), SIT376-LAM3

(7.1%), SIT237-U (7.4%), SIT160-U (11.1%), SIT222-T1 (11.1%) y SIT638-LAM9 (50.0%).

8. La frecuencia de las familias LAM y T fue tres veces mayor en el interior del país que en el departamento central de Guatemala.
9. En el departamento de Guatemala se observaron cepas pertenecientes a todas las familias (LAM, T, X, H, U y Beijing) y los dos espoligotipos GUA01 y GUA02.
10. La distribución de las familias X y U en el estudio fueron casi exclusivamente encontradas en pacientes con VIH/SIDA lo que sugiere que estos pacientes pudieron haberse infectado en sus visitas y/o internamientos periódicos a los diferentes servicios médicos del hospital .
11. Se determinó la presencia de familias Beijing, T y X, en cárceles del sistema penitenciario del país.

## **XI. RECOMENDACIONES**

1. Llevar a cabo estudios más extensos y que cubran una mayor área geográfica del país para poder tener una visión más clara de la dinámica de las cepas de MTC que circulan en Guatemala.
2. Llevar a cabo estudios más extensos en poblaciones específicas o en riesgo, como aquellos pacientes de tuberculosis que viven con VIH/SIDA o se encuentran privados de libertad.
3. Desarrollar y estandarizar nuevos métodos de tipificación molecular tales como PFLR o VNTR-MIRU para complementar la información brindada por espigotipificación.
4. Desarrollar a largo plazo un sistema de vigilancia en base a las herramientas brindadas por la epidemiología molecular para diseñar estrategias coherentes para el diagnóstico, tratamiento y control de la tuberculosis en el país.

## XII. REFERENCIAS

1. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:658-685.
2. Brosch R, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:3684-3689.
3. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microb Molec Biol Rev.* 2008;72:126-156.
4. Bates JH. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. *Clin Chest Med.* 1980 1:167-174.
5. Stead WW. Pathogenesis of tuberculosis: clinical and epidemiologic perspective. *Rev Infect Dis.* 1989; 2:366-368.
6. Palomino JC, Cardoso S, Ritacco V. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. First edition. Disponible en: [www.tuberculosisistextbook.com](http://www.tuberculosisistextbook.com).  
Accesado: Enero 2009
7. Kochi, A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle.* 1991;72:1-6.

8. Sepkowitz KA, *et al.* Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:180-199.
9. Gordin F, Slutkin G. The validity of acid-fast smears in the diagnosis of tuberculosis. *Arch Pathol Lab.* 1990;114:1025-1027.
10. Klotz S, Penn R. Acid-fast staining of urine and gastric contents is an excellent indicator of mycobacterial disease. *Am Rev Respir Dis.* 1987;136:1197-1198.
11. Good RC, Mastro TD. The modern mycobacteriology laboratory. How it can help the clinician. *Clin. Chest Med.* 1989;10:325-322.
12. Maartens G, Wilkinson RJ. Tuberculosis. *Lancet.* 2007. 370:2030-2043
13. Farmer, Paul. The major infectious diseases in the world – To treat or not to treat. *N Engl J Med.* 2001. 345:208-210
14. Quitugua TN, *et al.* Transmission of Drug-Resistant Tuberculosis in Texas and Mexico. *J Clin Microbiol.* 2002. 40:2716-2724.
15. WHO Report 2008. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing.
  - a. World Health Organization, 2008, *Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report 2008.* World Health



Organization. Disponible en:

[http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2008/download\\_centre/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/download_centre/en/index.html) Accesado: Enero 2009

16. Fluit AD, *et al.* Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2001. 14:836-871
17. WHO/PAHO. PAHO Basic Health Indicator Data Base. 2008. Disponible en: [http://www.paho.org/English/DD/AIS/cp\\_320.htm](http://www.paho.org/English/DD/AIS/cp_320.htm) Accesado: Enero 2009.
18. World Health Organization. Global Tuberculosis Database. Country Profiles on Tuberculosis. 2007. Disponible en: <http://www.who.int/globalatlas/predefinedreports/tb/index.asp> Accesado: Enero 2009.
19. Jiménez AT, Samayoa B, Xet AM, Lau DM. Susceptibilidad antibiótica y perfil genético de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes que acudieron al Hospital General San Juan de Dios durante el año 2002. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2004. 82p.

20. Filliol I, *et al.* Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1963-1970.
21. Brudey K, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006. doi: 10.1186/1471-2180-6-23.
22. Sola C, *et al.* Tuberculosis in the Caribbean: using spacer oligonucleotide typing to understand strain origin and transmission. *Emerg Inf Dis.* 1999;5:404-414.
23. Sola C, *et al.* Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerg Inf Dis.* 2001;7:390-396.
24. Cole ST, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998;393:537-544.
25. Alland D, *et al.* Modeling bacterial evolution with comparative-genome-based marker systems: application to *Mycobacterium tuberculosis* evolution and pathogenesis. *J Bacteriol.* 2003;185:3392-3399.

26. Gutacker M, *et al.* Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics*. 2002;162:1533-1543
27. Tazi L, *et al.* Molecular epidemiology of *Mycobacterium* and its relevance to the surveillance and control of TB: an e-debate. *Infect Genet Evol.* 2002. 2:153-158.
28. Murray CJ, Salomon JA. Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. *Proc Natl Acad. Sci.* 1998;95:13881-13886.
29. Barnes PF, Cave D. Molecular Epidemiology of tuberculosis. *N Eng J Med.* 2003;349:1140-1156.
30. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:496-514
31. Chin DP, *et al.* Spread of *Mycobacterium tuberculosis* in a community implementing recommended elements of tuberculosis control. *JAMA.* 2000;283:2698-2974.
32. Barnes PF. Reducing ongoing transmission of tuberculosis. *JAMA.* 1998;280:1702-1703

33. Van Soolingen D, *et al.* Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. Publicación del National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, The Netherlands. 2002. 1020-127.
34. Kremer K, *et al.* Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2607-2618.
35. Goyal M, *et al.* Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 1997;35:647-651.
36. Goguet De La Salmonière Y, *et al.* Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2210-2214.
37. Kremer K, *et al.* Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 2005;43:5628-5638.
38. Cronin WA, *et al.* Epidemiologic usefulness of spoligotyping for secondary type of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3709-3711.

39. Supply P, *et al.* Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol.* 2000;36:762-771.
40. Mazars E, *et al.* High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:1901-1906.
41. Supply P, *et al.* Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3563-3571.
42. Hermans PWM, *et al.* Insertion elements IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun.* 1991;59:2695-2705.
43. Kamerbeek J, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35:907-914.
44. Dale JW, *et al.* Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5:216-219.

45. Mancilla M, *et al.* Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la X<sup>a</sup> Región de Chile. *Rev Chil Infect.* 2006;23:220-225.
46. Maes M, *et al.* 24-Locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. *Tuberc.* 2008;88:490-494.
47. Vitol I, *et al.* Identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex strain families using spoligotypes. *Inf Gen Evol.* 2006;6:491-504.
48. Sebban M, *et al.* A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinfo.* 2002;18:235-243.
49. Reyes JF, *et al.* Models of deletion for visualizing bacterial variation: an application to tuberculosis spoligotypes. *BMC Bioinfo.* 2008 doi: 10.1186/1471-2180-6-23.
50. Spoligotyping kit manual. Spoligotyping: a PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Isogen Life Science.
51. Candia N, *et al.* First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. *BMC Microbiol.* 2007. Doi: 10.1186/1471-2180-7-75

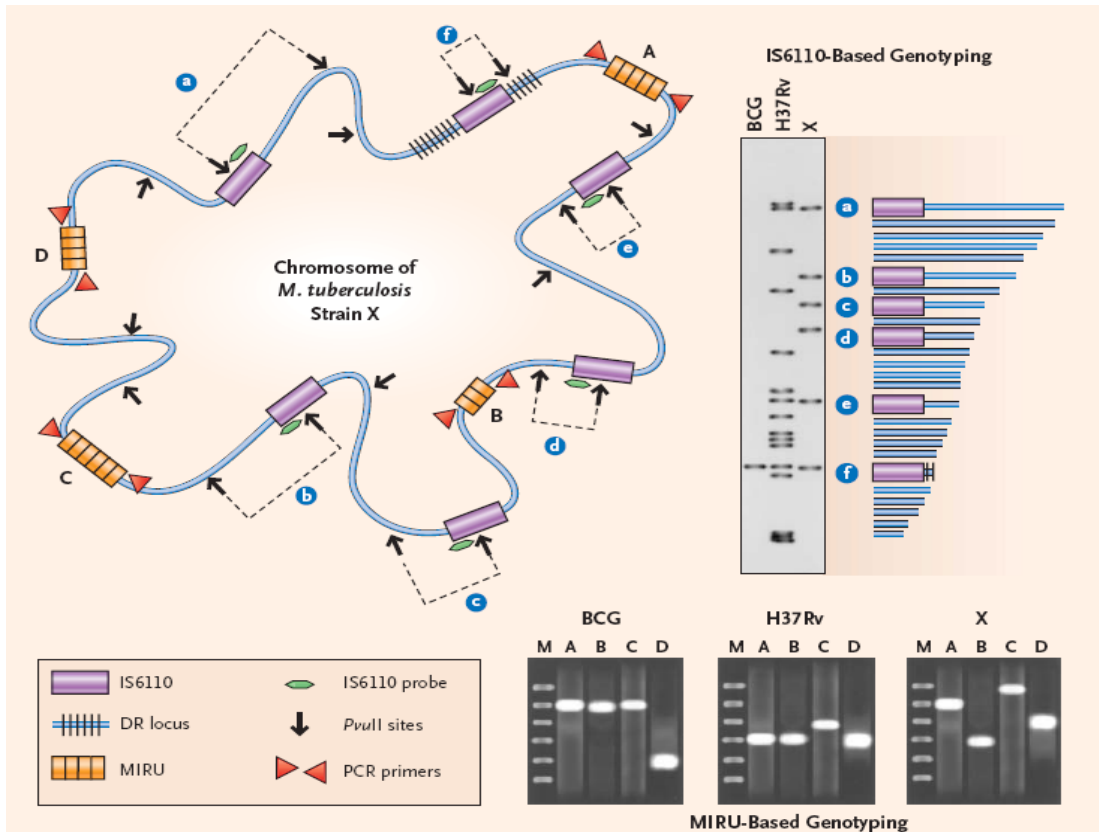
52. Gonzales L. Efectos de la migración interna hacia la ciudad de Guatemala, como factor para la emigración internacional. Guatemala: Universidad Francisco Marroquín, (tesis de graduación, Instituto de Estudios Políticos y Relaciones Internacionales) 2000. 70p.
53. CEPAL. Informes Nacionales sobre migración internacional en países de Centroamérica. 2002. Disponible en:  
[www.eclac.org/publicaciones/xml/9/11699/lc11764\\_resumen.pdf](http://www.eclac.org/publicaciones/xml/9/11699/lc11764_resumen.pdf) Accesado en:  
Agosto 2010
54. Cox HS, *et al.* The Beijing genotype and drug resistance tuberculosis in the Aral Sea region of central Asia. BMC Microbiol. 2005. Doi: 10.1186/1465-9921-6-134
55. Van Crevel R, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment. Emer Infe Dis. 2001.;7:880-883
56. Disponible en: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/>
57. Ritacco V, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:489-492.

58. Molina-Torres CA, et al. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *J Clin Microb.* 2010;48:448-455.
59. Samper S, et al. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS.* 1997;11:1237-1242.
60. Asiiimwe B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes and drug susceptibility patterns of isolates from tuberculosis patients in peri-urban Kampala, Uganda. *BMC Inf Dis.* 2008. Doi: 10.1186/1471-2334-8-101
61. Cadmus S, et al. Spoligotype profile of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from HIV positive and negative patients in Nigeria: a comparative analysis. *J Clin Microb.* 2010 Doi: 10.1128/JCM.01241-10.
62. Lienhardt C. From exposure to disease: the role of environmental factors in susceptibility to and development of tuberculosis. *Epid Rev.* 2001;23:288-301.
63. Fernández-Martín J, et al. Transmission of tuberculosis in the prisons of Madrid. *Med Clin (Barc).* 2000;115:246-250.
64. Pfyffer G, et al. Multidrug-Resistance tuberculosis in prison inmates, Azarbaijan. *Em Inf Dis.* 2001;7:855-861.



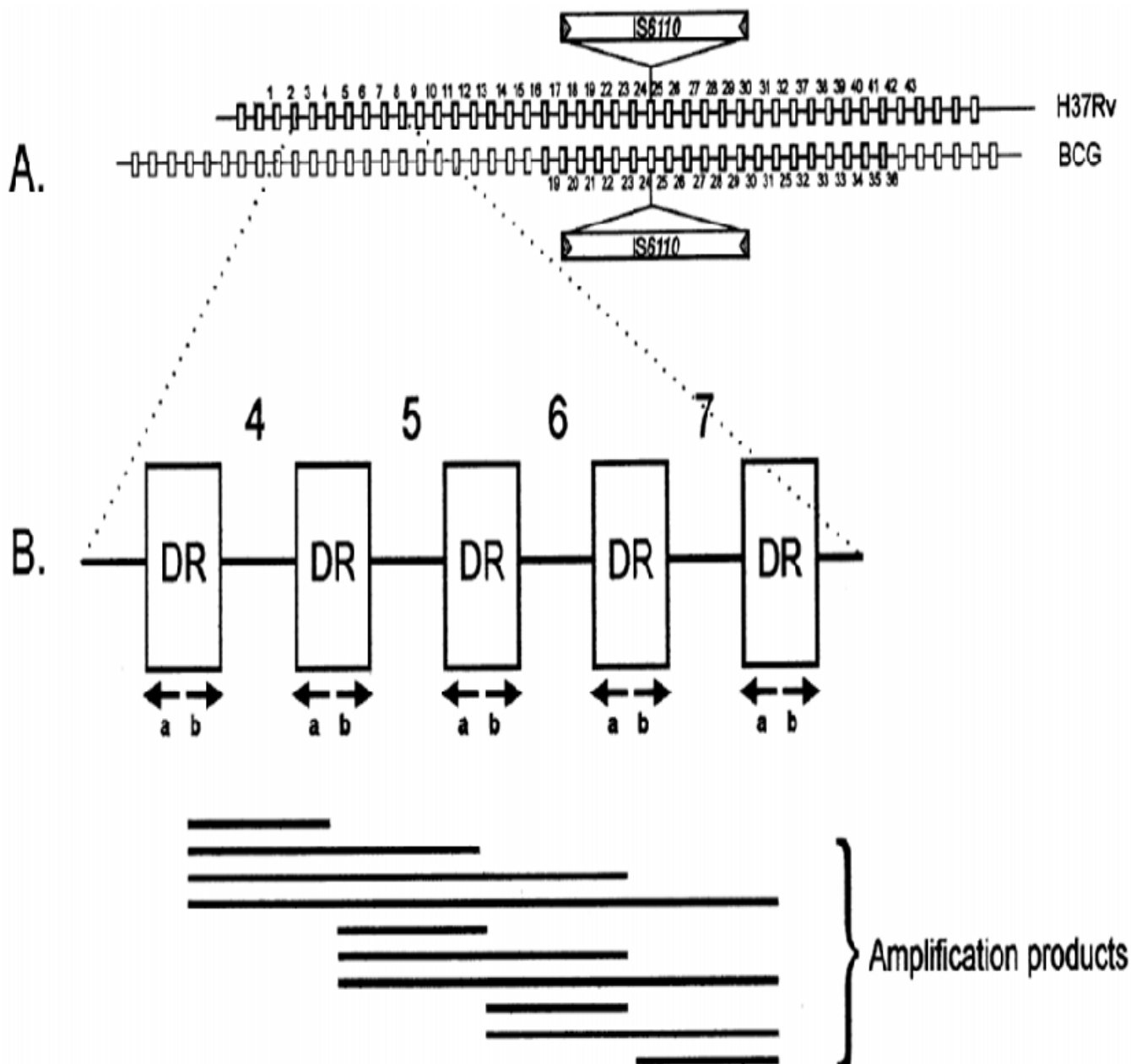
65. Shemyakin I, *et al.* Characterization of drug-resistance isolates of *Mycobacterium tuberculosis* derived from Russian inmates. *Int J Lung Dis.* 2004;8:1194-11203.
  
66. Tougousova O, *et al.* Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Arcangel prison in Russia: predominance of the W-Beijing clone family. *Clin Inf Dis.* 2003;37:665-672.
  
67. Drobniwsky F, *et al.* Rifampin-and multidrug-resistant tuberculosis in Russian civilians and prison inmates: dominance of the Beijing strain family. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:1320-1326.

## XIII. ANEXOS

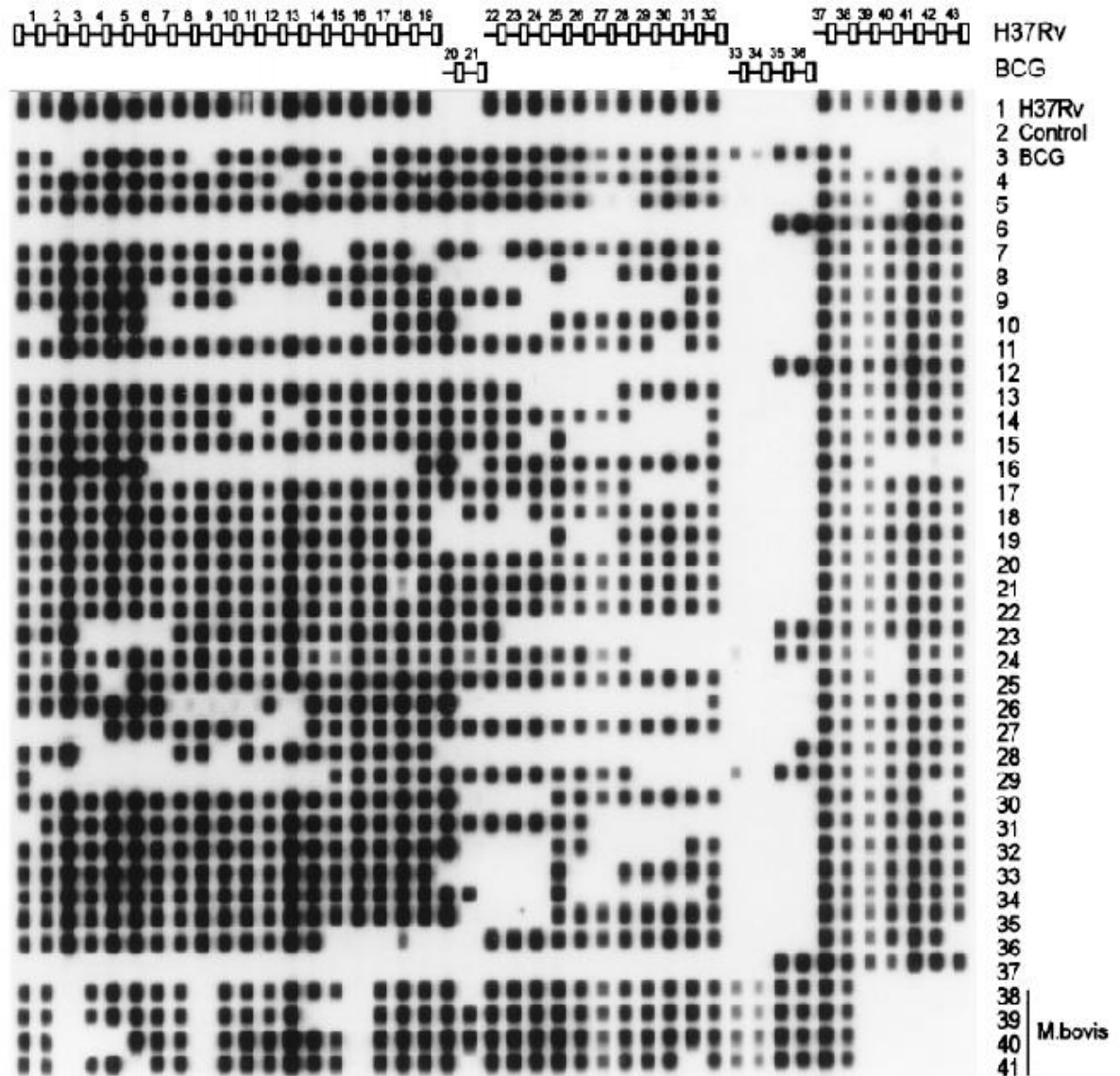
ANEXO 1

**Figura 1. Cromosoma de una hipotética cepa X de *Mycobacterium tuberculosis* y la genotipificación de *M. bovis* BCG (bacilo de Calmette-Guérin), la cepa de laboratorio H37Rv de *M. tuberculosis* y la cepa X de *M. tuberculosis* en base a secuencias de inserción IS6110 y unidades de repetición micobacterianas esparcidas (MIRU).** En la parte superior izquierda se observa el cromosoma de una cepa X de *M. tuberculosis*. En la parte superior derecha se observa el resultado de una tipificación a base de IS6110. El ADN micobacteriano es digerido por la endonucleasa de restricción *PvuII* donde indican las flechas negras. La sonda IS6110 se hibridiza con el ADN de la IS6110 a la derecha del sitio de la *PvuII* en la IS6110. El tamaño de cada fragmento hibridizado depende de la distancia entre un sitio y el siguiente sitio que cortará la *PvuII* (de flecha negra a flecha negra) que en este caso son los fragmentos de a hasta f, como se ve reflejado en la electroforesis de los fragmentos de ADN de las cepas BCG, H37RV y X. Las líneas horizontales a la derecha de las bandas de electroforesis indican la distribución de las extensiones de los fragmentos en la gel, incluyendo sitios cortados por la *PvuII* que no contienen IS6110. En la parte inferior derecha se observar tres paneles que son el resultado de la genotipificación MIRU. La genotipificación MIRU incluye el uso de PCR y la electroforesis en gel para categorizar el número y tamaño de las repeticiones en 12 loci independientes, teniendo cada uno una secuencia repetitiva única. Los tamaños de los marcadores de peso molecular (M) y los productos de PCR para el loci A, B, C y D en BCG, H37RV y X se pueden ver. Los tamaños específicos de varios MIRU en cada cepa resultan ser la “huella” distintiva para cada cepa. (Tomado de Barnes PF, Cave D. Molecular Epidemiology of tuberculosis. N Eng J Med. 2003;349:1140-1156)

ANEXO 2

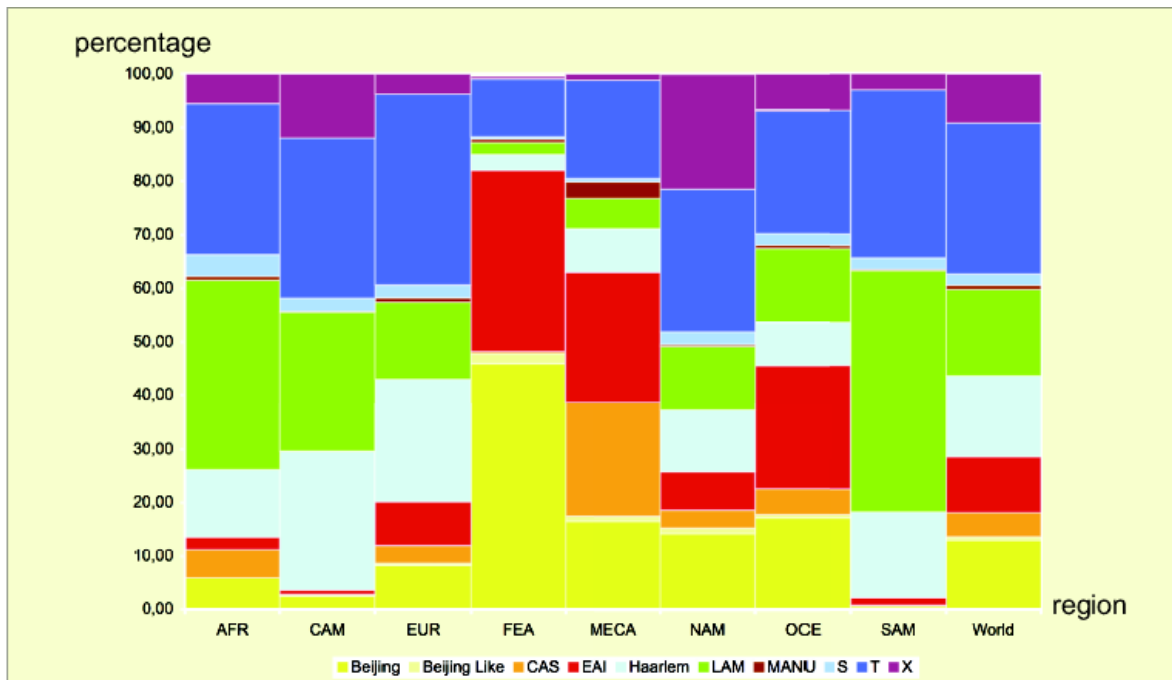


C.



**Figura 2. Espoligotipificación.** (A) Estructura del locus DR en el genoma de la micobacteria. Los cromosomas de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG contienen 48 y 41 DRs, respectivamente (representados por rectángulos), los cuales son separados por espaciadores de 35 a 41 pares de bases. (B) Principio de amplificación *in vitro* de la región DR por PCR. Cualquier DR en la región DR puede servir como blanco para los cebadores; por lo tanto, el ADN amplificado está compuesto por un largo número de fragmentos de diferentes tamaños. El dibujo muestra la combinación de fragmentos que se producirían por la amplificación *in vitro* de un DR blanco conteniendo cinco DRs contiguos. (C) Patrones de hibridación o espoligotipos del ADN amplificado de 35 cepas de *M. tuberculosis* y 5 de *M. bovis*. El orden de los espaciadores en el papel corresponde al orden en el genoma. (Tomado de Kamerbeek J, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35:907-914.)

### ANEXO 3



**Figura 3. Porcentajes de las principales familias definidas por espigotipificación para el complejo *M. tuberculosis* en SpolDB4 por continente.** Abreviaciones AFR = África, CAM = América Central, EUR = Europa, FEA = Asia Lejano Oriente, MECA = Asia Central y Medio Oriente, NAM = América del Norte, OCE = Oceanía, SAM = América del Sur. (Tomado de Brudey K, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. 2006. doi: 10.1186/1471-2180-6-23.)

**ANEXO 4**

Registro Principal: \_\_\_\_\_  
 Registro Consejería: \_\_\_\_\_  
 Iniciales Entrevistador: \_\_\_\_\_

Registro de Estudio: \_\_\_\_\_  
 Fecha de Entrevista: \_\_\_\_\_  
 Número de Entrevista: \_\_\_\_\_

**REGISTRO SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO PARA ESPOLIGOTIPIFICACIÓN**

Registro Médico: \_\_\_\_\_  
 Iniciales: \_\_\_\_\_  
 Teléfono: \_\_\_\_\_

Registro ASI: \_\_\_\_\_

A1. Género: A1.1. Femenino \_\_\_\_ A1.1. Masculino \_\_\_\_ B. Edad: \_\_\_\_\_  
 C. Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_  
 D. Fecha de Defunción: \_\_\_\_\_

E1. Usuario: E1.1. \_\_\_\_ Ambulatorio E1.2. \_\_\_\_ E1.3 Hospitalizado  
 E1.3.1. Fecha: \_\_\_\_\_ E1.3.2. Unidad \_\_\_\_\_ E1.3.3. No. Cama \_\_\_\_\_

**A. DATOS DEMOGRÁFICOS**

- |   |   |
|---|---|
| 1. Estado del paciente:                       | 1.1. Consciente ____ 1.2. Inconsciente ____   |
| 2. Procedencia (Lugar de nacimiento):         | _____   |
| 3. Estancia en otro país:                     | 3.1. Sí ____ 3.2. No ____ 3.3. ¿Cuál? _____   |
| 4. Tiempo de estancia:                        | 4.1 Años ____ 4.2 Meses ____ 4.3 Días ____  |
| 5. Dirección actual:                          | _____   |
| 6. Tiempo de vivir en el lugar:               | 6.1 Años ____ 6.2 Meses ____ 6.3 Días ____  |
| 7. Cantidad de personas que viven en la casa: | _____   |
| 8. Relación de convivientes:                  | 8.1. Cónyuge: ____ 8.2. Padres: ____ 8.3. Hijos: ____<br>8.4 Otros: ____ 8.5 Especificar: _____             |
| 9. Religión:                                  | _____   |
| 10. Etnia:                                    | 10.1.Ladino ____ 10.2.Indígena ____ 10.3. Garífuna ____<br>10.4. Otra ____                                  |
| 11. Tiene hijos:                              | 11.1.Sí ____ 11.2.No ____ 11.3 Cuántos: _____   |
| 12. Estado Civil:                             | 12.1 Soltero ____ 12.2 Casado ____<br>12.3. Viudo/Divorciado ____ 12.4 Unido (unión libre) ____             |
| 13. Escolaridad (Anotar años):                | 13.1. Primaria ____ 13.2. Básicos ____ 13.3 Diversificado ____<br>13.3 Universitaria ____ 13.4 Ninguna ____ |
| 14. Ingreso mensual en el hogar:              | _____   |

**B. FACTORES DE RIESGO**

- |   |  |
|---|--|
| 15. Trabaja actualmente:                                | 15.1 Sí ____ 15.2 ____ 15.3 ¿En qué? _____     |
| 16. Ventilación en lugar de trabajo:                    | 16.1. Sí ____ 16.2. No ____ 16.3. No sabe ____ |
| 17. Espacios abiertos en anteriores lugares de trabajo: | 17.1. Sí ____ 17.2. No ____ 17.3. No sabe ____ |
| 18. Estancia en la cárcel:                              | 18.1. Sí ____ 18.2. No ____ 18.3. No sabe ____ |
| 19. Nombre de la cárcel:                                | _____  |
| 20. Tiempo de encarcelamiento:                          | _____  |
| 21. Fecha aproximada:                                   | _____  |
| 22. Numero. de habitaciones en casa:                    | 22.1 Dormitorios ____ 22.2 Otros: _____        |

Registro Principal: \_\_\_\_\_ Registro de Estudio: \_\_\_\_\_

23. Estancia en un orfanato: 23.1. Sí \_\_\_\_\_ 23.2. No \_\_\_\_\_ 23.3. No sabe \_\_\_\_\_
24. Tiempo y Fechas de estancia: \_\_\_\_\_
25. Nombre del orfanato: \_\_\_\_\_
26. Aglomeraciones en el bus: 26.1. Sí \_\_\_\_\_ 26.2. No \_\_\_\_\_ 26.3. No sabe \_\_\_\_\_
27. Tiempo de ruta en el bus: \_\_\_\_\_
28. Uso de drogas: 28.1. Sí \_\_\_\_\_ 28.2. No \_\_\_\_\_ 28.3. No sabe \_\_\_\_\_
29. Tipo de droga: \_\_\_\_\_
30. Tiempo de uso: \_\_\_\_\_
31. Asistencia a una clínica para los pulmones/neumología: 31.1. Sí \_\_\_\_\_ 32.2. No \_\_\_\_\_ 33.3. No sabe \_\_\_\_\_
32. Nombre de la clínica: \_\_\_\_\_
33. Fechas de asistencia a la clínica (aprox.): \_\_\_\_\_
34. Hospitalización previa: 34.1. Sí \_\_\_\_\_ 34.2. No \_\_\_\_\_ 34.3. No sabe \_\_\_\_\_
35. Fecha de hospitalización: \_\_\_\_\_
36. Fecha de remisión: \_\_\_\_\_
37. Motivo de la hospitalización: \_\_\_\_\_
38. Se le han recetado pastillas para la tos: 38.1. Sí \_\_\_\_\_ 38.2. No \_\_\_\_\_ 38.3. No sabe \_\_\_\_\_
39. Fechas aproximadas: \_\_\_\_\_
40. Tiempo de tomar pastillas para la tos: \_\_\_\_\_
41. Personas con las que vive: \_\_\_\_\_
42. Se conoce si el esposo(a) \_\_\_\_\_ ,pareja \_\_\_\_\_ , personas que viven con usted \_\_\_\_\_ o que conoce \_\_\_\_\_ , presentan :
- 41.1 Tos persistente 41.1.1. Si \_\_\_\_\_ 41.2.1. No \_\_\_\_\_ 41.1.3. No sabe \_\_\_\_\_
- 41.2 Fiebre 41.2.1. Si \_\_\_\_\_ 41.2.2. No \_\_\_\_\_ 41.2.3. No sabe \_\_\_\_\_
- 41.3 Escalofríos 41.3.1. Si \_\_\_\_\_ 41.3.2. No \_\_\_\_\_ 41.3.3. No sabe \_\_\_\_\_
- 41.4 Sangre en las flemas 41.4.1. Si \_\_\_\_\_ 41.4.2. No \_\_\_\_\_ 41.4.3. No sabe \_\_\_\_\_
- 41.5 Sudores nocturnos 41.5.1. Si \_\_\_\_\_ 41.5.2. No \_\_\_\_\_ 41.5.3. No sabe \_\_\_\_\_
- 41.6 Pérdida de peso 41.6.1. Si \_\_\_\_\_ 41.6.2. No \_\_\_\_\_ 41.6.13. No sabe \_\_\_\_\_
43. Consumo de tabaco (cigarrillos, etc.) 43.1. Sí \_\_\_\_\_ 43.2. No \_\_\_\_\_ 43.3 Tiempo: \_\_\_\_\_
44. Consumo de bebidas alcohólicas: 44.1. Sí \_\_\_\_\_ 44.2. No \_\_\_\_\_ 44.3 Tiempo: \_\_\_\_\_
45. Frecuencia de uso de alcohol: 45.1. Ocasional \_\_\_\_\_ 45.2. Frecuente \_\_\_\_\_ 45.3. Constante \_\_\_\_\_
46. Familiares con TB: 46.1. Sí \_\_\_\_\_ 46.2. No \_\_\_\_\_ 46.3. No sabe \_\_\_\_\_
47. Familiares con tos persistente por más de dos meses: 47.1. Si \_\_\_\_\_ 47.2. No \_\_\_\_\_ 47.3. No sabe \_\_\_\_\_
48. Previa transfusiones de sangre: 48.1. Si \_\_\_\_\_ 48.2. No \_\_\_\_\_ 48.3. No sabe \_\_\_\_\_
49. Animales en casa: 49.1. Si \_\_\_\_\_ 49.2. No \_\_\_\_\_ ¿Cuáles? \_\_\_\_\_
50. Exposición laboral a ganado (vacas) o sus derivados: 50.1. Si \_\_\_\_\_ 50.2. No \_\_\_\_\_ 50.3. No sabe \_\_\_\_\_
51. Internación en alguna institución (policía, ejército, iglesia, seguridad, etc.) 51.1. Si \_\_\_\_\_ 51.2. No \_\_\_\_\_ 51.3. No sabe \_\_\_\_\_  
51.4 ¿Cuál? \_\_\_\_\_ 51.5 Tiempo: \_\_\_\_\_
52. Trabajo en una institución de salud (hospital, puesto o centro de salud, etc.) 52.1. Si \_\_\_\_\_ 52.2. No \_\_\_\_\_ 52.3. No sabe \_\_\_\_\_  
52.4 ¿Cuál? \_\_\_\_\_

Registro Principal: \_\_\_\_\_ Registro de Estudio: \_\_\_\_\_  
 Registro Consejería: \_\_\_\_\_ Fecha de Entrevista: \_\_\_\_\_  
 Iniciales Entrevistador: \_\_\_\_\_ Número de Entrevista: \_\_\_\_\_

### REGISTRO SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO PARA ESPOLIGOTIPIFICACIÓN

Registro Médico: \_\_\_\_\_ Registro ASI: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

#### A. DATOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO

1. Prueba del PPD: 1.1. Si \_\_\_\_\_ 1.2. No \_\_\_\_\_ 1.3. No sabe \_\_\_\_\_
2. Resultado del PPD: 2.1. Positivo \_\_\_\_\_ 2.2. Negativo \_\_\_\_\_  
2.3. Anérgico \_\_\_\_\_ 2.4. No sabe \_\_\_\_\_
3. Vacuna de BCG: 3.1. Si \_\_\_\_\_ 3.2. No \_\_\_\_\_ 3.3. No sabe \_\_\_\_\_
4. Embarazo actualmente: 4.1. Si \_\_\_\_\_ 4.2. No \_\_\_\_\_ 4.3. No sabe \_\_\_\_\_  
4.4 No aplica \_\_\_\_\_
5. Altura del paciente: \_\_\_\_\_
6. Peso del paciente (libras) \_\_\_\_\_
7. Índice de Karnofsky: Puntuación: \_\_\_\_\_
8. Índice de masa corporal (IMC) \_\_\_\_\_  
Peso Kg/talla<sup>2</sup> (mts); <20 = bajo peso, 20-25 = normal,  
>25 = elevada)
9. Fecha de Diagnóstico de TB \_\_\_\_\_
10. Tiempo con TB: \_\_\_\_\_
11. Primer Dx. de TB: 11.1. Si \_\_\_\_\_ 11.2. No \_\_\_\_\_ 11.3. No sabe \_\_\_\_\_  
11.4 Fecha \_\_\_\_\_
12. Tratamiento Anti-TB: 12.1. Si \_\_\_\_\_ 12.2. No \_\_\_\_\_ 12.3 No sabe \_\_\_\_\_  
¿Cuánto? \_\_\_\_\_
13. Medicamentos recibidos:
 

13.1. Isoniacida	13.1.1 Si _____	13.1.22 No _____	13.1.3. No sabe _____
13.2. Rifampicina	13.2.1. Si _____	13.2.2. No _____	13.2.3. No sabe _____
13.3. Pirazinamida	13.3.1. Si _____	13.3.12. No _____	13.3.13. No sabe _____
13.4. Estreptomina	13.4.1. Si _____	13.4.2. No _____	13.4.3. No sabe _____
13.5. Etambutol	13.5.1. Si _____	13.5.2. No _____	13.5.3. No sabe _____
14. Resistencia a antibióticos: 14.1. S \_\_\_\_\_ 14.2. I \_\_\_\_\_ 14.3. R \_\_\_\_\_ 14.4. E \_\_\_\_\_
15. Hace cuánto tiempo estuvo en Tx.: \_\_\_\_\_
16. Localización de la TB: 16.1. Pulmonar \_\_\_\_\_ 16.2. Extrapulmonar \_\_\_\_\_  
16.3. Ambos \_\_\_\_\_ 16.4. No sabe \_\_\_\_\_
17. Rayos X de tórax: 17.1. Si \_\_\_\_\_ 17.2. No \_\_\_\_\_ 17.3. No sabe \_\_\_\_\_
18. Resultados de los rayos X:
 

LUGAR	TIPO
Inf. Apical _____	Caverna _____
Inf. Basal _____	Miliar _____
Miliar _____	Alveolar _____
Difuso _____	Consolidado _____
19. Otras infecciones: \_\_\_\_\_
20. Otros tratamientos: \_\_\_\_\_

**OBLIGATORIAMENTE DEBE COMPLETARSE ANEXO NO. 1 CORRESPONDIENTE AL REGISTRO DE CULTIVOS Y BACIOSCOPIAS POSITIVAS PARA ESTUDIO DE ESPOLIGOTIPIFICACIÓN Y ANEXO NO. 2 CORRESPONDIENTE AL REGISTRO DE PRUEBAS DE LABORATORIO.**



Registro Principal: \_\_\_\_\_ Registro de Estudio: \_\_\_\_\_  
 Registro Consejería: \_\_\_\_\_ Fecha de Entrevista: \_\_\_\_\_  
 Iniciales Entrevistador: \_\_\_\_\_ Número de Entrevista: \_\_\_\_\_

### REGISTRO SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO PARA ESPOLIGOTIPIFICACIÓN

Registro Médico: \_\_\_\_\_ Registro ASI: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

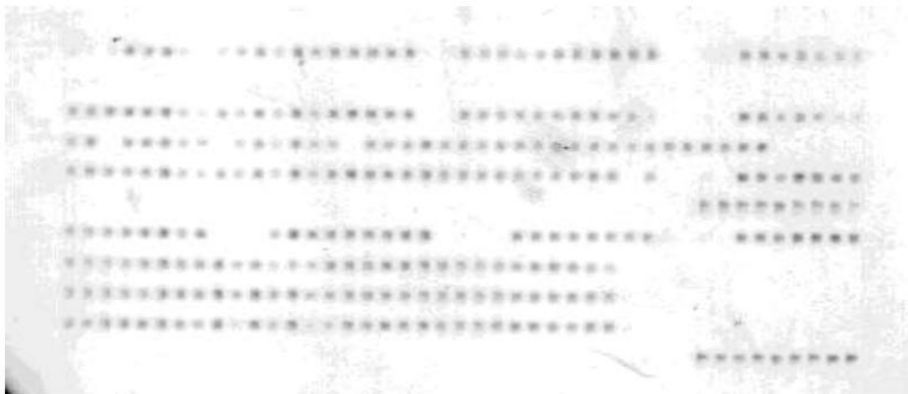
#### A. PACIENTES CON VIH/SIDA (SECCIÓN EXCLUSIVA)

1. Fecha diagnóstico de VIH: \_\_\_\_\_
2. Fecha Dx. de SIDA: \_\_\_\_\_
3. Primer conteo de CD4+ al momento de Dx. de VIH/SIDA:  
     Fecha: \_\_\_\_\_ Conteo: \_\_\_\_\_
4. Primer conteo de CD4+ al momento de Dx. de TB:  
     Fecha: \_\_\_\_\_ Conteo: \_\_\_\_\_
5. Último conteo de CD4+ (absoluto):  
     Fecha: \_\_\_\_\_ Conteo: \_\_\_\_\_
6. Primera Carga Viral al momento de Dx. de VIH/SIDA :  
     Fecha: \_\_\_\_\_ Conteo: \_\_\_\_\_
7. Primera Carga Viral al momento de Dx. de TB:  
     Fecha: \_\_\_\_\_ Conteo: \_\_\_\_\_
8. Última Carga Viral (absoluto):  
     Fecha: \_\_\_\_\_ Conteo: \_\_\_\_\_
9. Tx. Antiretroviral:  
     Inicio: \_\_\_\_\_  
     Continúa: \_\_\_\_\_

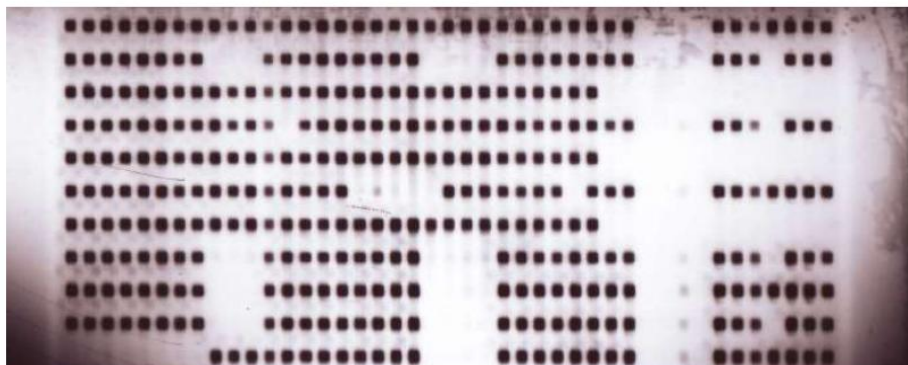




## ANEXO 6



**Cepa Control *M. tuberculosis* H37Rv**  
**Cepa Control *M. bovis* BCG**



**Cepa No. 59**  
**Cepa No. 55**  
**Cepa No. 53**  
**Cepa No. 52**  
**Cepa No. 50**  
**Cepa No. 49**  
**Cepa No. 47**  
**Cepa No. 45**  
**Cepa No. 44**  
**Cepa No. 43**  
**Cepa No. 39**



**Cepa No. 77**  
**Cepa No. 85**  
**Cepa No. 87**  
**Cepa No. 89**  
**Cepa No. 90**  
**Cepa No. 91**  
**Cepa No. 94**  
**Cepa No. 95**  
**Cepa No. 96**  
**Cepa No. 97**  
**Cepa No. 100**  
**Cepa No. 102**  
**Cepa No. 105**  
**Cepa No. 106**  
**Cepa No. 107**  
**Cepa No. 153**  
**Cepa No. 161**

**Fotografía 1. Espoligotipos.** En esta fotografía se pueden observar los espoligotipos de algunas cepas tipificadas en este estudio.