

**DETERMINACIÓN DE PATRONES GENÉTICOS DE *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER, COLOMBIA
DURANTE LOS AÑOS 2009-2012**

MAGDA LORENA ORDUZ ZAMBRANO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2014**

**DETERMINACIÓN DE PATRONES GENÉTICOS DE *MYCOBACTERIUM*
TUBERCULOSIS EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER, COLOMBIA
DURANTE LOS AÑOS 2009-2012**

MAGDA LORENA ORDUZ ZAMBRANO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**DIRECTOR:
WELLMAN RIBÓN, MSC.
DOCENTE ESCUELA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2014**

DEDICATORIA

A papito Dios y mamita María quienes me dieron la fortaleza y sabiduría para afrontar este nuevo reto en mi vida y culminarlo con éxito.

A mis padres Susana y Luis Carlos quienes han sido mi guía, mi inspiración y me han ayudado siempre a cumplir mis metas.

A mis hermanitas Tatiana, Magaly por su apoyo y cariño incondicional y especialmente a mi hermanita Nikol por ser mi alegría y mi mayor fortaleza.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Wellman, mi director de tesis, por sus enseñanzas que me han permitido formarme no solo como profesional, sino como persona. Gracias por brindarme la oportunidad de iniciar mis estudios de Maestría, por a su apoyo, confianza y dedicación para finalizar este trabajo con éxito.

A mis compañeros del micogrupo por su invaluable ayuda y en especial a Ximena y Yesid, con quienes pude compartir este proceso de formación y a quienes ahora considero unos buenos amigos.

Al Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, Laboratorio Central de Investigaciones y *Mycobacterium*, Laboratorio de Investigación y Extensión por permitirme desarrollar mi trabajo en sus instalaciones.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1 LA ENFERMEDAD	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA	20
2.3 FORMAS CLÍNICAS	21
2.3.1 Tuberculosis pulmonar.	21
2.3.2 Tuberculosis extrapulmonar.	22
2.4 AGENTE ETIOLÓGICO	22
2.4.1 Características microscópicas.	23
2.4.2 Características morfológicas en cultivo	24
2.4.3 Características genotípicas.	25
2.4.3.1 Locus DR.	26
2.5 ESPECIES Y SUBESPECIES DEL COMPLEJO <i>M. tuberculosis</i>	27
2.5.1 <i>M. tuberculosis</i> .	27
2.5.2 <i>M. ovis</i>	27
2.5.3 <i>M. africanum</i> .	27
2.5.4 <i>M. bovis</i> BCG o bacilo de Calmette-Guerin (BCG).	27
2.5.5 <i>M. microti</i> .	28

2.5.6	M. canettii.	28
2.5.7	M. caprae.	28
2.5.8	M. pinnipedii.	28
2.5.9	M. mungii.	28
2.5.10	M. orygis.	29
2.6	FAMILIAS DE M. tuberculosis	29
2.6.1	Familia Haarlem (H).	29
2.6.2	Familia Latinoamérica y Mediterráneo (LAM).	29
2.6.3	Familia T.	29
2.6.4	Familia X.	30
2.6.5	Familia Este Africano Indio (EIA).	30
2.6.6	Familia Central Asiática (CAS).	30
2.6.7	Familia Beijing.	30
2.6.8	Familia MANU.	30
2.7	METODOLOGÍAS DE GENOTIPIFICACIÓN	31
2.7.2	Spoligotyping.	32
2.7.3	Metodología MIRU-VNTR.	35
3.	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GENERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4.	JUSTIFICACIÓN	37
5.	DISEÑO METODOLÓGICO	38
5.1	MUESTRAS	38

5.2	CEPAS DE REFERENCIA	38
5.3	CULTIVO DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS	39
5.4	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	39
5.5	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR <i>SPOLIGOTYPING</i>	40
5.5.1	Amplificación de los espaciadores por RCP	40
5.5.2	Hibridación y detección.	41
5.5.3	Almacenamiento de la membrana.	42
5.5.4	Lectura e interpretación de resultado	42
5.6	AGRUPACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS	43
5.7	ANÁLISIS FILOGENÉTICO	43
6.	RESULTADOS	44
6.1	CARACTERIZACIÓN MEDIANTE <i>SPOLIGOTYPING</i> DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE <i>M. tuberculosis</i>	44
6.2	RELACIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS IDENTIFICADOS Y CARACTERÍSTICAS SOCIO DEMOGRÁFICAS ASOCIADAS A LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS.	53
6.2.1	Familias con diferencias en sus patrones genéticos.	57
6.3	IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES CASOS DE REINFECCIONES, RECAÍDAS O APARICIÓN DE CEPAS ASOCIADAS A RESISTENCIA.	61
6.3.1	Caso 1.	61
6.3.2	Caso 2.	61
6.3.3	Caso 3.	62
6.3.4	Caso 4.	62
6.3.5	Caso 5.	63

6.3.6	Caso 6.	63
6.4	COMPARACIÓN DE LOS PATRONES GENÉTICOS OBTENIDOS EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER Y LO REPORTADO EN COLOMBIA Y EL MUNDO	64
6.5	COMPARACIÓN DATOS MUNDIALES	66
7.	DISCUSIÓN	70
8.	CONCLUSIONES	76
9.	DIVULGACIÓN	78
10.	ASPECTOS ETICOS	79
11.	PERSPECTIVAS	81
	BIBLIOGRAFÍA	82

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica	23
Tabla 2. Condiciones mezcla para RCP	40
Tabla 3. Condiciones de amplificación de la RCP	41
Tabla 4. Descripción de SIT identificados	10
Tabla 5. Descripción de SIT no reportados	48
Tabla 6. Sublinajes identificados distribuidos según género de los pacientes	53
Tabla 7. Distribución de sublinajes de acuerdo al resultado del cultivo	55
Tabla 8. Distribución de familias de acuerdo a la presentación clínica	56
Tabla 9. Diferencias de espoligotipos en las familias H1, H3, LAM2, LAM5, LAM6, U, T2	57
Tabla 10. Diferencias de espoligotipos en la familia LAM9	59
Tabla 11. Diferencias de espoligotipos en la familia MANU2	60
Tabla 12. Diferencias de espoligotipos en la familia T1	60
Tabla 13. Descripción de agrupamientos que contienen 5 o más aislamientos y su distribución mundial en la SITVIT2	65

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Bacilos ácido alcohol resistentes en una baciloscopia	23
Figura 2. Cultivo de <i>M. tuberculosis</i>	24
Figura 3. Locus DR	26
Figura 4. Membrana de <i>Spoligotyping</i> ubicada en miniblatter	33
Figura 5. Representación gráfica lectura espoligotipos	33
Figura 6. Familias de <i>M. tuberculosis</i> identificadas en Santander	44
Figura 7. Sublinajes identificados en el Departamento de Santander	51
Figura 8. Árbol de expansión mínima	52
Figura 9. Frecuencia edad	54
Figura 10. Diferencias de espoligotipos en la familia LAM9	59
Figura 11. Frecuencia familias predominantes en ciudades Colombianas	64
Figura 12. Frecuencia familias no dominantes y genotipos no reportados en ciudades Colombianas	66

LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. PREPARACIÓN MEDIO DE CULTIVO LÖWESTEIN JENSEN	92
ANEXO B. ESCALA SEMICUANTITATIVA PARA LECTURA DE CULTIVOS EN MEDIO SÓLIDO	95
ANEXO C. PREPARACION DE SOLUCIONES	96

RESUMEN

TITULO: determinación de patrones genéticos de *Mycobacterium tuberculosis* en el Departamento de Santander, Colombia durante los años 2009-2012*

AUTOR: Magda Lorena Orduz, Wellman Ribón**¹

PALABRAS CLAVES: linajes, *Spoligotyping*, *Mycobacterium tuberculosis*, Santander

DESCRIPCION:

El Departamento de Santander, Colombia se encuentra entre los departamentos con mayor número de casos de tuberculosis, para el año 2012 se reportaron un total de 463 casos nuevos. La implementación de metodologías de biología molecular como el *Spoligotyping* permite avanzar en la identificación de las especies y familias de *M. tuberculosis* circulantes en la región. El objetivo de este trabajo fue la determinación de los patrones genéticos de *M. tuberculosis* en el Departamento de Santander, Colombia durante los años 2009-2012. Se realizó extracción de ADN de 500 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* y caracterizados por *Spoligotyping*, para posterior análisis de los datos en la base de datos SITVIT WEB del Instituto Pasteur de la Guadalupe. Mediante la realización de este trabajo se logró identificar 14 familias de *M. tuberculosis* y como familias predominantes T, LAM y Haarlem y la identificación del primer caso de tuberculosis ocasionado por el genotipo Beijing en el oriente colombiano. Este trabajo constituye el primer acercamiento a la identificación y análisis de los patrones genéticos de *M. tuberculosis* en el Departamento de Santander contribuyendo de esta forma a la identificación de las dinámicas de transmisión como la detección de posibles casos de recaídas, reinfecciones y la circulación de nuevos genotipos, que apoyen las políticas de control de la enfermedad en el Departamento de Santander.

¹ *Proyecto de grado

**Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Wellman Ribón, Msc

SUMMARY

TITLE: determination of the genetic patterns of *Mycobacterium tuberculosis* from Santander, Colombia during the years 2009-2012

AUTHOR: Magda Lorena Orduz, Wellman Ribón**²

KEY WORDS: lineages, *Spoligotyping*, *Mycobacterium tuberculosis*, Santander

Description:

The Santander state, Colombia ranks among the states with the highest number tuberculosis cases, in 2012 a total 463 new cases were reported. Implementation of molecular biology such as Spoligotyping, allows progress in the identification of species and families of *M. tuberculosis* strains in the region. The objective of this study was to determine the genetic patterns of *M. tuberculosis* from Santander, Colombia during the years 2009-2012. Extracting DNA from 500 clinical isolates of *M. tuberculosis* was performed and characterized for Spoligotyping, later the data were analyzed in the SITVIT WEB database of the Institute Pasteur of Guadalupe. By performing this work was identified 14 families and as predominates families T, LAM and Haarlem and identification of the first case of tuberculosis caused by the Beijing genotype in eastern Colombia. This is the first approach to the identification and analysis of genetic patterns of *M. tuberculosis* in the Santander state thus contributing to the identification of the dynamics of transmission as detection of possible relapse cases, reinfection and circulation of new genotypes, supporting policies disease control in the Santander state.

² *Graduation project

**Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Wellman Ribón, Msc

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa producida por *Mycobacterium tuberculosis* que afecta principalmente los pulmones y es considerada la segunda causa de muerte por una enfermedad infecciosa después del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en el mundo. Según el Reporte Mundial de Tuberculosis 2013 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2012 se presentaron 8,6 millones de casos nuevos de la enfermedad y 1,3 millones de muertes por esta causa. Datos que muestran que a pesar de los múltiples esfuerzos de las organizaciones gubernamentales para el control de la enfermedad, ésta sigue siendo un gran problema de salud pública en el mundo.

En Colombia para el año 2013 el Instituto Nacional de Salud reportó 10.956 casos nuevos de la enfermedad y en el Departamento de Santander la situación no es menos preocupante dado que la tasa de incidencia de la enfermedad es de 21,2 casos.

En los últimos años las pruebas de biología molecular han logrado grandes avances que permiten el análisis de material genético de diferentes microorganismos como *M. tuberculosis*, con el análisis de la secuencia de inserción IS6110, el polimorfismo de las secuencias espaciadoras de la región Repetida Directa DR y el análisis de las unidades de repetición intergénica micobacterianas MIRU, permitiendo la tipificación de la bacteria y el conocimiento de los diferentes linajes de *M. tuberculosis* contribuyendo de esta forma al desarrollo de la epidemiología molecular. Una de las metodologías más usadas por su facilidad y alta reproducibilidad es la metodología de *Spoligotyping* desarrollada por Kamerberck que se basa en el polimorfismo de una secuencia espaciadora en la región repetida directa (DR) de cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. El presente trabajo tuvo como finalidad aplicar

metodologías de genotipificación como el *Spoligotyping* para la determinación de los patrones genéticos de *M. tuberculosis*, permitiendo la identificación de los linajes más prevalentes en el Departamento de Santander y la identificación de linajes asociados a multidrogorresistencia, que en un futuro contribuyan con las políticas de control de la enfermedad en el Departamento mediante el establecimiento de las dinámicas de trasmisión de la enfermedad, como el análisis de casos de transmisión reciente en comunidades determinadas, la identificación de nuevos linajes y en especial de aquellos asociados a resistencia a fármacos.

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La TB es un enfermedad infectocontagiosa producida por especies del complejo *M. tuberculosis*, generando cuadros clínicos diversos dentro de los que se encuentran la TB pulmonar y extrapulmonar, siendo la forma pulmonar la más frecuente con un 80-85% de los casos (Organización Panamericana de la Salud, 2008). A pesar de que actualmente se cuenta con numerosas medidas terapéuticas para la cura de la enfermedad, la TB pulmonar sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, debido a la falta de control de los casos infecciosos a través de un diagnóstico rápido y finalización del tratamiento; situación que está siendo intervenido con la puesta en marcha de planes estratégicos para el control de la enfermedad, con los cuales se ha logrado reducir en un 37% los casos nuevos de la enfermedad desde el año 1990 y se espera alcanzar la meta mundial de reducción del 50% en 2015, como lo plantea la OMS (World Health Organization, 2012).

La OMS en su Informe Mundial de Tuberculosis 2013 reportó que en el año 2012 se presentaron un total de 8,6 millones de casos nuevos de TB y 1,3 millones de muertes por la enfermedad. La mayor carga de TB corresponde a Asia (58%) y África (27%). Menor porcentaje de casos ocurren en la Región del Mediterráneo oriental (8%), la Región Europea (4%) y la Región de las Américas (3%) (World Health Organization, 2012). A pesar que las Américas representen una baja proporción de los casos, en países como Colombia donde para el año 2012, se notificaron 11.990 casos de TB, y una incidencia de 23,5 casos por 100.000 habitantes, la TB sigue considerándose uno de los principales problemas de salud pública en el País. En Colombia los departamentos con mayor número de casos de TB reportados para el 2012 fueron Antioquia, Valle, Cundinamarca, Atlántico, Risaralda y Santander. Este último con un total de 463 casos y una incidencia de

21.2 casos por 100.000 habitantes, considerado así como el sexto Departamento con mayor número de casos en el País (Informe de evento, 2012).

Los métodos diagnósticos bacteriológicos más usados en Colombia son la baciloscopia y el cultivo que evidencian la presencia del agente causal de la enfermedad. Actualmente se están implementando nuevas tecnologías diagnósticas más sensibles basadas en la detección del Acido Desoxirribonucleico (ADN) micobacteriano (Neonakis, 2008), y con las cuales se obtienen resultados en menos tiempo. Algunas de estas metodologías brindan la ventaja adicional de realizar procesos de genotipificación permitiendo la identificación de familias o linajes de *M. tuberculosis* presentes en la región y de esta forma apoyar las estrategias de control de la enfermedad con la detección de casos, recaídas, reinfecciones y circulación de nuevas cepas. En el Departamento de Santander aún no se cuenta con la información de los linajes de *M. tuberculosis* circulantes, por lo tanto con la ejecución de este proyecto se busca implementar metodologías basadas en la detección de ADN, que permitan establecer comparaciones y relaciones entre los linajes identificados y los circulantes en la región.

1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los patrones genéticos más frecuentes en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* presentes en el Departamento de Santander?

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LA ENFERMEDAD

La TB es una de las infecciones de mayor impacto a nivel mundial y es producida por miembros del complejo *M. tuberculosis* (Ministerio de la Protección Social Colombia, 2007). La TB es de las enfermedades más antiguas y ha acompañado al hombre durante su evolución, encontrándose evidencia de la presencia del agente etiológico de la enfermedad en esqueletos de 4000 años de antigüedad en Europa y Medio Oriente (Jordao, 2011).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

La TB es una enfermedad mundial, para el año 2012 la OMS en su reporte anual estimó cerca de 8,6 millones casos nuevos, siendo la regiones del sur este Asiático, África y la Región del Pacífico las más afectadas. Adicionalmente se estimaron cerca de 1,3 millones de muertes por la enfermedad, y a pesar de observarse una reducción en la tasa de mortalidad, llama la atención el aumento de muertes en niños y mujeres.

En Colombia para el mismo periodo se notificaron 11990 casos confirmados de TB de todas las formas. De estos, 10956 correspondían a casos nuevos para una incidencia 23,5 casos por 100.000 habitantes. Según la presentación clínica de la enfermedad se presentaron 80,4 % casos de tuberculosis pulmonar y 19,6% casos de tuberculosis extrapulmonar (Instituto Nacional de Salud, 2012).

Los Departamentos con mayor número de casos corresponden a Antioquia, Cundinamarca concentrando su alto número de casos en Bogotá, Valle del Cauca, Atlántico, Risaralda y Santander.

En el Departamento de Santander para el año 2012 se reportaron un total de 430 casos nuevos de TB para una incidencia 21,2 casos por 100.000 habitantes (Instituto Nacional de Salud, 2012), mostrando que se deben aumentar los esfuerzos e implementar nuevas estrategias que permitan el control de la enfermedad.

2.3 FORMAS CLÍNICAS

2.3.1 Tuberculosis pulmonar. Es la más común dado que es la forma en la cual puede producirse el contagio a otras personas. La infección se transmite en forma directa persona a persona, cuando una persona enferma tose, estornuda o escupe expulsa bacilos al aire que serán inhalados por las personas a su alrededor (World Health Organization, 2012).

Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene TB latente; es decir, están infectadas por el bacilo pero aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección. Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo del 10% de enfermarse de TB a lo largo de la vida. Sin embargo, este riesgo es mucho mayor para las personas que presentan deficiencia o compromiso del sistema inmunitario, como ocurre en casos de infección por el Virus de Inmunodeficiencia humana (VIH), desnutrición, diabetes, o consumidores de tabaco (World Health Organization, 2012).

Cuando la enfermedad se presenta, los síntomas (tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, entre otras) pueden ser leves por muchos meses. Como resultado, los pacientes tardan en buscar atención médica y transmiten la bacteria a otros. A lo largo de un año, un enfermo de TB puede infectar aproximadamente

10 a 15 personas por contacto estrecho. Si no reciben el tratamiento adecuado, hasta dos terceras partes de los enfermos con tuberculosis mueren (Ministerio de la Protección Social Colombia, 2007).

2.3.2 Tuberculosis extrapulmonar. Representa solo una pequeña proporción de los casos de TB, aproximadamente del 10-15%. Sin embargo los pacientes desarrollan las formas más graves de la enfermedad. Y dado que la enfermedad puede afectar cualquier órgano, el diagnóstico suele ser más difícil y demorado (Solovic, 2013). Las poblaciones más afectadas por la TB extrapulmonar son los niños y personas con inmunosupresión como aquellos que padecen leucemia, diabetes y que conviven con el VIH.

Según los criterios de la OMS, las formas de TB extrapulmonar se clasifican en severas y menos severas; las severas se consideran la meningitis, miliar, pericarditis, peritonitis, pleural extensiva o bilateral, intestinal, espinal, y genitourinaria. Las menos severas la de nódulos linfáticos, pleural unilateral, huesos (excepto columna vertebral) y piel (World Health Organization, 2003).

2.4 AGENTE ETIOLÓGICO

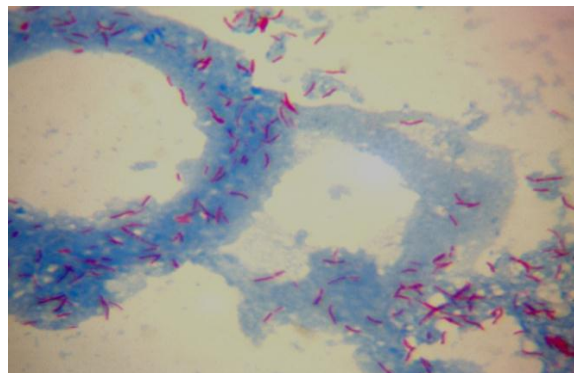
El género *Mycobacterium* se encuentra ubicado taxonómicamente en la familia *Micobacteriaceae* y está conformado por 150 especies (Dai,2011), dentro de las que se encuentran las especies del Complejo *M. tuberculosis* conformado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microtti*, *M. caprae*, *M. pinipedii*, *M. canetti*, *M. mungi* y *M. orygis* (Jordao, 2011).

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Reino	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Actinobacteria</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orden	<i>Actinomycetales</i>
Suborden	<i>Corynebacterineae</i>
Familia	<i>Mycobacteriaceae</i>
Género	<i>Mycobacterium</i>

2.4.1 Características microscópicas. Las dimensiones del bacilo son de aproximadamente 1-10 μm de largo (usualmente 3-5 μm) y 0,2 - 0,6 μm de ancho (Figura 1) (Cole, 1998). Posee una envoltura celular compleja, compuesta por una membrana celular y pared celular, esta última brinda soporte mecánico a la bacteria y le confiere su característica en tinción de ácido alcohol resistencia por el gran contenido de lípidos presentes en la misma (Palomino, 2007). La característica morfológica de presencia de cordón en la tinción de Zielh Neelsen es presuntiva de micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, la formación de cordón es atribuida al glicolípido trehalosa 6,6-dimicolato o factor cordón, compuesto de moléculas de ácidos micólicos (Ribón, 2012).

Figura 1. Bacilos ácido alcohol resistentes en una baciloscopia



2.4.2 Características morfológicas en cultivo. *M. tuberculosis* se caracteriza por ser un lento crecedor en medios sintéticos, dado que su tiempo de generación es de 18 a 24 horas. La baja tasa de crecimiento está asociada a la permeabilidad de la pared que limita la entrada de nutrientes (Palomino, 2007) y adicionalmente se ha observado que en las micobacterias se encuentran uno o dos operones *rrn*, manejados por los promotores P1 y P2. El operón *rrnA*, ubicado en el gen *murA* se encuentra en todas las especies, incluyendo *M. tuberculosis* y *M. leprae*. Pero en algunas especies como las de crecimiento rápido se encuentra un operón adicional *rrnB*, ubicado en el gen *tyrS* (Arving, 2005; Verma, 1999).

Los medios sintéticos utilizados para el aislamiento de *M. tuberculosis* contienen nutrientes como glicerol, fuente de carbono, asparagina e iones de amonio como fuente de nitrógeno y micronutrientes, además de albúmina, incorporada en los medios de cultivo con el agregado de huevos de gallina o seroalbúmina bovina. Las colonias características de *M. tuberculosis* desarrolladas en un medio sólido a base de huevos son habitualmente rugosas, sin pigmentación y secas (Figura 2) (OPS, 2008).

Figura 2. Cultivo de *M. tuberculosis*



2.4.3 Características genotípicas. Con la secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis*, cepa H37Rv, se generó mayor información genética de la bacteria, en total se obtuvo una secuencia de 4.411.529 pares de bases, que contiene alrededor de 4000 genes y un alto contenido de guanina + citosina (G+C) de 65,6 %.

El punto para el inicio de la numeración fue el codón de iniciación para el gen *dnaA*, una marca para el origen de replicación, *OriC*. El contenido de G+C es relativamente constante, y se detectaron varias regiones que muestran mayor contenido de G+C, que corresponden a secuencias que pertenecen a una gran familia de genes que incluye la secuencia polimórfica rica en G+C (PGRSs) (Cole, 1998).

El genoma es rico en ADN repetitivo, particularmente en secuencias de inserción, y en nuevas familias multigénicas, un ejemplo de estas es la presencia y distribución de secuencias de inserción (IS). De particular interés es IS6110, una secuencia de la familia IS3, ampliamente utilizada para la tipificación de cepas y epidemiología molecular debido a su variación en el sitio de inserción y el número de copias (Van Embden, 2003). En el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv se identificaron dieciséis copias de IS6110, algunos sitios de estos fueron agrupados en sitios con el nombre de inserción “*hot-spots*” (Palomino, 2007).

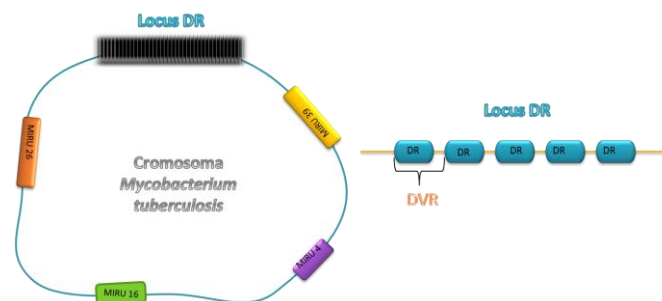
Dentro del cromosoma de *M. tuberculosis* se encuentra otra región repetitiva altamente conservada descrita recientemente, el locus DR (Groenen 1993, Kamerbeek 1997), miembro de las secuencias “*Clustered Regularly Interspersed Palindromic Repeats*” CRISP (Kamerbeek, 1997). Posterior al descubrimiento de la región DR, se encontraron el número variable de repeticiones en tándem (VNTR) (Frothingham, 1998), seguidamente se identificaron las unidades de repetición intergénica micobacterianas (MIRU) (Supply, 2000), que también se

señalan como análisis múltiple locus VNTR. La tipificación de secuencias multilocus (MLST) fue introducida como un método alternativo (Baker, 2004) y recientemente fue descrito el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (Filliol, 2006) seguido del polimorfismo de secuencia grande (LSP), este último se realiza ya sea por microarreglos o reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en tiempo real (Mostowy, 2005).

2.4.3.1 Locus DR. Contiene múltiples regiones repetidas DR de 36 pb intercaladas con secuencias espaciadoras no repetitivas de 34 a 41 pb que constituyen en conjunto los DVR (Figura 3); el tamaño del locus DR varía de 6 DVRs (0,6 kb) a 56 DVR (6 kb), y tanto la región DR como los espaciadores han mostrado poca variación en el orden de presentación entre cepas.

La región DR ha sido identificada como un *hot-spot* de integración del elemento de inserción IS6110 (Fang, 1998).

Figura 3. Locus DR



Los mecanismos que generan la variación entre las diferentes cepas son la delección de uno o más DVR (Groenen, 1993) y duplicación de los DVR. Estas delecciones y duplicaciones probablemente son mediadas por recombinación homóloga entre DR vecinos o distantes o por procesos de *Splicing* durante la replicación del ADN (Van Embden, 2000). Pero también se ha descrito el proceso

en el cual por la transposición del elemento IS6110 ocurre la delección un DR (Legrand, 2001). Todos estos cambios generados en el locus DR son el fundamento del desarrollo de la metodología de *Spoligotyping* (Kamerbeek 1997).

2.5 ESPECIES Y SUBESPECIES DEL COMPLEJO *M. tuberculosis*

2.5.1 *M. tuberculosis*. Fue descrita por el doctor Robert Koch en el año 1882 y es la especie más frecuentemente involucrada en el desarrollo de la TB pulmonar en humanos (Leao et al, 2004).

2.5.2 *M. bovis*. Es causante de TB en un amplio rango de animales salvajes y domésticos. *M. bovis* es naturalmente resistente a la pirazinamida, una droga de anti-TB de primera línea (Vasconcellos et al, 2010). Su importancia epidemiológica radica en la transmisión zoonótica de *M. bovis* a humanos debido al contacto con animales infectados, o al consumo de productos provenientes de estos animales.

2.5.3 *M. africanum*. Es la especie que más causa TB en humanos en el occidente de África (De Jong, 2010). Hay dos grandes variantes de *M. africanum*, la variante Africana I, aislada en el este de África y la variante II al oeste de África (Leao, 2004). Además, *M. africanum* tipo I ha sido recientemente subdividida en *M. africanum* tipo I, este africana I (MAF1), prevalente alrededor del Golfo de Guinea y *M. africanum* tipo I, este africana 2 (MAF2), prevalente en el sureste de África. *M. africanum* tipo II ha sido reclasificado en *M. tuberculosis* e indicado como genotipo “Uganda” (De Jong, 2010).

2.5.4 *M. bovis* BCG o bacilo de Calmette-Guerin (BCG). Es la cepa de la vacuna, y es una variante viva atenuada de *M. bovis*. Su spoligotipo es característico por la ausencia de los espaciadores 3, 10, 17,22 y 39 al 43 (Brand et al 2002).

2.5.5 M. microti. Es causante de enfermedad en ratones de campo y musarañas. Su aislamiento es raro en muestras clínicas humanas, pero recientemente han sido caracterizados aislamientos provenientes de humanos. El análisis de los espoligotipos de los aislados revela presencia única de los espaciadores 37 y 38 (Cavanagh, 2002).

2.5.6 M. canettii. *M. canettii* fue agregado a la lista del complejo *M. tuberculosis* en 1997. Y hasta la fecha se han realizado pocos reportes de casos de TB por esta subespecie y se piensa que los animales son los hospederos naturales de la bacteria (Van Soolingen et al, 1997).

2.5.7 M. caprae. Esta subespecie ha sido aislada principalmente de cabras en España (Leao, 2004), pero también se ha encontrado en jabalís, cerdos y algunos casos de personas relacionadas con la cría de cabras (Aranaz, 2003). La huella genética obtenida por *Spoligotyping* se caracteriza por la ausencia de los espaciadores 1, 3-16, 10-33 y 39-43 (Aranaz et al, 2003).

2.5.8 M. pinnipedii. Fue originalmente aislada de casos de TB en pinnípedos como los leones marinos y focas y recientemente se describieron casos en animales terrestres como el tapir brasileño. Su espoligotipo presenta los espaciadores 25 a 38 únicamente (Cousins et al, 2003).

2.5.9 M. mungii. Fue identificado en el 2010 como un patógeno del Complejo *M. tuberculosis*, como agente causal de TB en las mangostas rayadas que viven cerca a humanos en el distrito de *Chobe* en *Botswana*, porque estos animales viven en estructuras hechas por los humanos y limpian los desechos humanos incluidas las heces (Alexander et al, 2010).

El patrón de espoligotipo de los aislados de *M. mungii* se caracteriza por ausencia de los espaciadores 3, 7, 9, 12-36 y 39, se determinó que este patrón es

conservado en los aislados descritos pero aún no se encuentra incluido en las bases de datos internacionales (Alexander *et al*, 2010).

2.5.10 M. orygis. Especie descrita recientemente, en el año 2012 por Van Ingen y colaboradores. Ha sido aislado de miembros de la familia *Bovidae como oryxes*, gacelas, antílopes, búfalos y se han descrito casos en humanos. Su patrón de espoligotipo se caracteriza por la ausencia de los espaciadores 4-9, 14-24,35, 36 y 39, y al igual que *M. mungi* no se encuentra incluido en la SITVIT WEB (Van Ingen, 2012).

2.6 FAMILIAS DE M. tuberculosis

2.6.1 Familia Haarlem (H). Caracterizada por que su patrón presenta ausencia del espaciador 31 y la presencia de al menos un espaciador entre 1 a 30. Es altamente prevalente en el Norte de Europa y menos extendida en el Caribe y África Central, donde se cree fue introducida por la colonización Europea (Filliol, 2003).

2.6.2 Familia Latinoamérica y Mediterráneo (LAM). Caracterizada por la ausencia de los espaciadores 21 a 24, 33 a 36 y la presencia de al menos un espaciador entre 1 a 30. Frecuente en países del Mediterráneo y América Latina. Algunos genotipos han mostrado fuertes asociaciones geográficas como por ejemplo la LAM10-Cameroon o la LAM7-Turkey que inicialmente fueron catalogados como LAM, aunque no se ha encontrado asociación filogenética con otros espoligotipos (Niobe-Eyangoh 2003, Zozio 2005).

2.6.3 Familia T. Son las cepas modernas de TB, está caracterizada “*by default*” e incluye cepas que son difíciles de clasificar en otros grupos (Palomino, 2007) Presenta ausencia de los espaciadores 33 a 36 y presencia de al menos un

espaciador entre 1 a 30, además de la presencia del espaciador 9 o 10 y 31, y la presencia de al menos un espaciador entre 21 a 24 (Brudey et al, 2006).

2.6.4 Familia X. Su patrón presenta ausencia de los espaciadores 18 y del 33 al 36. Identificado en ciudades anglosajonas y altamente prevalente en Suráfrica y menos en América Latina. Pero hay una alta presencia de este genotipo en México que puede ser explicado por su cercanía con Estados Unidos. La familia X fue el primer grupo identificado en Guadalupe (Sola, 1997) y la Polinesia Francesa (Torrea, 1995).

2.6.5 Familia Este Africano Indio (EIA). Ausencia de los espaciador 29 a 32 y 34 y la presencia de al menos un espaciador entre el 1 a 30. Frecuente en el Sur Este Asiático, India y África Occidental (Brudey et al, 2006).

2.6.6 Familia Central Asiática (CAS). Ausencia de los espaciadores del 4 a 27 y del 23 a 34. Altamente prevalente en países subsaharianos y Pakistán. Este linaje también ha mostrado ser endémico en Sudán, países subsaharianos y Pakistán. Este espoligotipo presenta numerosas variantes y subgrupos como CAS1-Kili (por Kilimanjaro), CAS-Dar (por Dar-es-Salaam) y CAS-Dehli (Brudey et al, 2006).

2.6.7 Familia Beijing. Este genotipo presenta ausencia de los espaciadores 1 a 33 y presencia de los espaciadores 34 a 43; en términos de salud pública continua siendo un problema serio para el control de TB debido a su alta virulencia y asociación con multidrogoresistencia (Palomino, 2007).

2.6.8 Familia MANU. Puede ser el clon ancestral de las cepas del grupo genético 1, fue subdividido en Manu1 (ausencia del espaciador 34), Manu2 (ausencia de los espaciadores 33-34 y Manu3 (ausencia de los espaciadores 34 a 36). Es una nueva familia de la India (Brudey et al, 2006).

2.7 METODOLOGÍAS DE GENOTIPIFICACIÓN

Las metodologías de genotipificación basadas en regiones repetitivas del cromosoma de *M. tuberculosis* más usadas a nivel mundial son:

- Análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción basados en IS6110 (RFLP)
- ***Spoligotyping***
- Análisis unidades de repetición intergénica micobacterianas (MIRU)

2.7.1 Metodología IS6110-RFLP. La identificación del IS6110 fue un gran desarrollo para la epidemiología de la tuberculosis (Van Soolingen, 1991). El IS6110 es una secuencia de inserción, conformada por 1361 bp, capaces de hacer copias de ellos y luego insertar las copias en un lugar del genoma en un proceso conocido como transposición (National Tuberculosis Controllers Association /Centers for Disease Control and Prevention Advisory Group on Tuberculosis Genotyping, 2004). El análisis de IS6110 por polimorfismo de fragmentos de restricción ha sido considerado el método *gold standard* para genotipificación de *M. tuberculosis* (Thierry, 1990; Burgos, 2002). Las cepas de *M. tuberculosis* difieren en el número de copias de IS6110 y su distribución es altamente variable en el genoma (Van Embden, 1993).

El primer paso en la realización del RFLP es la purificación de ADN a partir de un cultivo de *M. tuberculosis*, posteriormente la enzima de restricción *PvuII* corta el ADN en secuencias específicas en cientos de fragmentos diferentes. Los fragmentos se separan por tamaño en un gel de agarosa y son transferidos a una membrana. Una sonda es utilizada para detectar fragmentos que contienen IS6110, la imagen se captura en una película y cada copia de IS6110 produce una banda. Los patrones de RFLP con siete o más bandas proporcionan más especificidad para la discriminación de los aislamientos, contrario a las cepas con patrones de seis o menos bandas en la cual se presenta una discriminación

menor. Usualmente, hay 8 a 18 copias por cepas, pero el número puede variar de 0 a 25 (Bauer, 1999).

Hay un pequeño número de cepas de *M. tuberculosis* que no contienen la secuencia del IS6110 por lo cual en el análisis se obtendrá una huella sin bandas o aquellas que contiene bajo número de copias muestran menos polimorfismo que las que contienen alto número de copias. La principal desventaja de esta metodología es la complejidad del procedimiento que tiene una duración de aproximadamente 5 días; la cantidad de ADN necesaria para la digestión con enzimas de restricción, esto exige que se obtengan cultivos con suficiente crecimiento para realizar la extracción de ADN a diferencia de métodos basados en RCP como MIRU y *spoligotyping* (National Tuberculosis Controllers Association /Centers for Disease Control and Prevention Advisory Group on Tuberculosis Genotyping, 2004; Kanduma, 2003)

2.7.2 Spoligotyping. Es un método para detección y tipificación del Complejo *M. tuberculosis*, basado en RCP, usando un locus cromosomal único con alto polimorfismo, la región repetida directa DR. La cual consiste en una secuencia de 36 pb que están separados por 43 espaciadores no repetidos, cada uno de los cuales contienen de 36 a 41 pares de bases (Kamerbeek,1997).

Por medio de la RCP se lleva a cabo la amplificación del locus DR, utilizando iniciadores, uno de los cuales está marcado con biotina. Los productos de la PCR se hibridan en forma perpendicular a la membrana que contiene 43 oligonucleótidos de secuencia conocida (Figura 4). La membrana se incuba con conjugado de estreptavidina-peroxidasa que se une a la biotina de los productos de RCP. La detección de las señales de hibridación se realiza por un sistema de quimioluminiscencia (ECL). Cuando se comparan las regiones DR de varias cepas, el orden de los espaciadores es casi el mismo en todas las cepas, pero se

Para simplificar esta numeración, el código binario de 43 dígitos se convierte a un código octal de 15 dígitos (es decir, los dígitos 0-7). Cada conjunto binario de 3 dígitos se convierte en su equivalente octal, y al final el dígito restante será 1 o 0. La traducción de los números binarios a números octales se realiza: 000 = 0; 001 = 1; 010 = 2; 011 = 3; 100 = 4; 001 = 5; 110 = 6; 111 = 7. Cada designación octal es única, lo que representa un patrón específico de bandas (National Tuberculosis Controllers Association /Centers for Disease Control and Prevention Advisory Group on Tuberculosis Genotyping, 2004). Finalmente este código es ingresado en la base de datos internacional SITVIT WEB que presenta información de los diferentes linajes y su distribución mundial, contiene información de la diversidad genética del complejo *M. tuberculosis* basada en 62.582 aislados clínicos de 153 países (Demay et al, 2012).

El *Spoligotyping* ofrece grandes ventajas como su gran utilidad en la genotipificación de cepas de *M. tuberculosis* que contienen pocas secuencias IS6110 (Bauer, 1999); el uso de la metodología directamente con muestras clínicas (Kamerbeek *et al*, 1997), lo que permitiría el diagnóstico y tipificación simultánea de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y diferenciación de las especies que conforman el Complejo *M. tuberculosis*. Los estudios realizados con muestras clínicas mostraron patrones únicos de hibridación, mientras que cepas de un brote compartieron el mismo patrón. Los patrones obtenidos a partir del examen directo de muestras clínicas fueron idénticos a los obtenidos mediante el uso de ADN de los cultivos de estas muestras (Kamerbeek *et al*, 1997). Con el objetivo de aumentar el poder de discriminación de la prueba se propuso el uso de una membrana de *spoligotyping* de segunda generación utilizando 51 oligonucleótidos de espaciadores (van der Zanden *et al*, 2002).

Mediante el uso del *Spoligotyping*, con base en los patrones obtenidos por hibridación se pueden clasificar las especies y subespecies que conforman el

complejo *M. tuberculosis* y a su vez los diversos linajes la especie *M. tuberculosis* (Palomino, 2007).

2.7.3 Metodología MIRU-VNTR. Las unidades de repetición intergénica micobacterianas son loci en el genoma de *M. tuberculosis* que contienen un número de repeticiones variables en tándem (Supply, 2000). El largo de los MIRU está en el rango de 50-100 pb y pertenecen a la categoría de VNTR “minisatelites” (Supply, 2000). Se han identificado 41 loci de este tipo en *M. tuberculosis*, entre ellos 12 loci han demostrado que varían en el número de repeticiones en tándem y la mayoría entre las unidades de repetición.

Es un método basado en RCP que utiliza estas 12 diferentes regiones intergénicas para la genotipificación. El cálculo para determinar el número de repeticiones se basa en el tamaño del amplicon. Los resultados se reportan como 12 números cada uno correspondiente al número de repeticiones. El poder de discriminación de las 12 regiones MIRU-VNTR es mucho mayor que la de *Spoligotyping* y cerca del IS6110 RFLP para la tipificación de cepas de *M. tuberculosis*. Recientemente, se propuso un sistema que incluye la tipificación de MIRU-VNTR de 24 loci, que combina el análisis RCP multiplex o un analizador de ADN basado en fluorescencia con la automatización computarizada de la genotipificación (Supply, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los patrones genéticos de *M. tuberculosis* presentes en el Departamento de Santander, Colombia durante los años 2009-2012.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar mediante *Spoligotyping* aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* del Departamento de Santander.
- Establecer relaciones entre los genotipos identificados y características socio demográficas asociadas a los aislamientos clínicos.
- Identificar posibles casos de reinfecciones, recaídas o aparición de cepas asociadas a resistencia.
- Realizar comparación de los patrones genéticos obtenidos en el Departamento de Santander con lo reportado en Colombia y el mundo.

4. JUSTIFICACIÓN

El Plan Estratégico para el Control de la Tuberculosis Colombia 2010-2015, plantea que durante los últimos 10 años Colombia ha mantenido altas tasas de incidencia de TB de aproximadamente 25 casos por 100.000 habitantes por año, con brechas entre los departamentos, como es el caso del Departamento de Santander que presenta una tasa de incidencia de 21,2 por 100.000 habitantes, cercana a la tasa nacional, es por esto que se hace necesario la implementación de nuevas metodologías y estudios que contribuyan al control y manejo de la TB en el Departamento.

Con el desarrollo de esta propuesta se buscará realizar el primer acercamiento a la identificación de las especies del Complejo *M. tuberculosis* involucradas en la enfermedad en el Departamento de Santander y la tipificación de los patrones genéticos de *M. tuberculosis* que permitan obtener información de las dinámicas de transmisión, mediante la identificación de nuevas cepas circulantes en la región, de casos de TB causados por *M. bovis* considerado como zoonosis, de pacientes cuya enfermedad sea resultado de reactivación de TB adquirida en el pasado o producto de una reinfección e identificación de cadenas de transmisión mediante vínculos epidemiológicos.

Todas estas variables pueden ser estudiadas con la realización del *Spoligotyping*, metodología ampliamente utilizada en la identificación y genotipificación de especies del complejo *M. tuberculosis*, por su baja complejidad, dado que no requiere el uso de grandes cantidades de ADN, se puede aplicar en cepas con pocas secuencias de inserción y está basada en la RCP, lo cual genera una ventaja adicional y es su uso para diagnóstico de TB, en menos tiempo que las metodologías convencionales y en casos de difícil manejo como la TB extrapulmonar.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones de *Mycobacterium*, Laboratorio de Investigación y Extensión de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico y el Laboratorio Central de Investigaciones adscrito al Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la Universidad Industrial de Santander.

5.1 MUESTRAS

Se incluyeron 500 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos por el *Mycobacterium*, Laboratorio de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander (UIS) durante los años 2009-2012, por actividades de venta de servicios del Laboratorio con otras instituciones y que se encuentran almacenados en criopreservación a -70°C en la colección microbiológica de micobacterias del Laboratorio.

5.2 CEPAS DE REFERENCIA

Para el desarrollo del trabajo se emplearon como control, el ADN de las cepas de referencia que se encuentran incluidas en el Kit IM9702 de Ociumbium Solutions:

- *M. tuberculosis* H37Rv (10 ng/μL)
- *M. bovis* BCG P3 (10 ng/μL)

5.3 CULTIVO DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS

Con el fin de obtener un crecimiento bacteriano se realizó siembra a dos tubos de medio de cultivo Löwestein-Jensen (Anexo A). A los cultivos con crecimiento de tres cruces según la escala de lectura para cultivos de micobacterias (Anexo B), se les realizó raspado de la masa bacilar y homogenizado en frasco de vidrio con perlas en 1 ml de agua destilada estéril para una nueva siembra a cinco tubos de medio de cultivo Löwestein Jensen, los cuales se incubaron a 37°C por 15 días. De los tubos con crecimiento masivo se realizó raspado de la masa bacilar y homogenizado para obtener 4 alícuotas del homogenizado de 500 microlitros para extracción de ADN.

De los aislamientos clínicos con cultivo negativo se extrajo una alícuota de 500 µl de los sedimentos de las muestras almacenadas para posterior extracción de ADN.

5.4 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de ADN genómico de *M. tuberculosis* se llevó a cabo mediante el protocolo descrito previamente por Van Soolingen; en el cual como primer paso se realizó la preparación e inactivación de las suspensiones bacterianas y muestras clínicas a 100°C en placa de calentamiento *peqlab*. Posteriormente se realizó lisis enzimática con 50 µl de Lisozima (10 mg/ml)(*Sigma-Aldrich*) a 37°C durante 12 horas, seguido de la degradación proteica con 10 µl proteinasa K (10 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*) y 70 µl de Sodio Duodecil Sufato 10% (*Sigma-Aldrich*) a 65°C por 10 minutos; degradación orgánica con 100 µl NaCl 5 M (*Sigma-Aldrich*) y 100 µl N-acetyl-N,N,N-trimetil bromuro amónico(CTAB) (*Sigma-Aldrich*) a 65°C por 10 minutos y separación de los ácidos nucleicos con la adición de 750 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (*Sigma-Aldrich*) mediante centrifugación a 4°C por 45 minutos. Finalmente se retiró la capa orgánica a un vial eppendorf de

1,5 ml para precipitación de ADN con la adición de 450 μ l de isopropanol (*Merck*) durante 12 horas a -20° C y purificación mediante tres lavados con 1 ml con etanol 70% (*Merck*) a 4° C por 45 minutos. (Anexo C, preparación de reactivos).

5.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR SPOLIGOTYPING

5.5.1 Amplificación de los espaciadores por RCP. La metodología de *Spoligotyping* se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones previamente descritas por Kamerbeek. Para la realización de la prueba se realizó como primer paso la amplificación de los espaciadores de la región DR mediante RCP con condiciones descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones mezcla para RCP

mezcla RCP	
Reactivo	Cantidad por reacción
Buffer 10X (<i>Invitrogen</i>)	2,5 μ l
MgCl ₂ (10 μ M) (<i>Invitrogen</i>)	1,5 μ l
dNTP (2,5 μ M) (<i>Sigma-Aldrich</i>)	2 μ l
Dra (Biotin-GGT TTT GGG TCT GAC GAC) (25 μ M)	2 μ l
Drb (CCG AGA GGG GAC GGA AAC) (25 μ M)	2 μ l
Taq platinum polimerasa (5U/ μ l) (<i>Invitrogen</i>)	0,2 μ l
Agua	12,8 μ l
ADN	2 μ l
Volumen final	25 μ l

Los viales de RCP se colocaron en el termociclador *C-TOUCH 1000 BIO-RAD* con condiciones de amplificación descritas en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de amplificación de la RCP

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96°C	3 minutos	1
96°C	1 minuto	30
55°C	1 minuto	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1

5.5.2 Hibridación y detección. El producto amplificado se desnaturalizó a 99°C con 150 microlitros de SSPE 2X (*Sigma-Aldrich*) 0,1% SDS/60° C y enfriados inmediatamente con hielo por 10 minutos. Posteriormente los productos de RCP fueron hibridados en una membrana Byodyne C activada previamente con una solución SSPE 2X 0,1% SDS a 60° C por 5 minutos, en un sistema miniblatter (MN45 Inmunetics) durante 1 hora. Luego de la hibridación de los productos de RCP a la membrana se realizaron dos lavados de la membrana con SSPE 2X 0.5% SDS a 60°C, y posterior incubación con 10 ml de SSPE 2X 0.5% SDS y 2,5 µl de conjugado estreptavidina-peroxidasa a 42°C por 1 hora y finalmente dos lavados con SSPE 2X 0.5% SDS a 42°C y dos con SSPE 2X. Para la detección de la hibridación se colocó la membrana durante tres minutos en 6 ml de reactivo quimiolumiscente ECL (Amersham), seguido de la exposición a una película de rayos X (Hyperfilm ECL; Amersham) por 20 minutos y revelado con revelador y fijador kodak durante 5 minutos en cada reactivo (Kamerbeek *et al*, 1997).

5.5.3 Almacenamiento de la membrana. Se lavó la membrana dos veces con SDS 1% a 80°C por 45 minutos y 6 rpm, y posteriormente con EDTA 20 mM pH 8 durante 15 minutos a temperatura ambiente.

5.5.4 Lectura e interpretación de resultado. la película se generó un patrón de 43 cuadros de color que indica la presencia del espaciador o sin color que determinan la ausencia de los espaciadores de la región DR en la cepa genotipificadas. A cada uno de los 43 espaciadores se le asigna un código numérico binario 1 o 0. Para simplificar esta numeración, el código binario de 43 dígitos se convirtió a un código octal de 15 dígitos (es decir, los dígitos 0-7). Cada conjunto binario de 3 dígitos se convirtió en su equivalente octal, y al final el dígito restante fue 1 o 0. La traducción de los números binarios a números octales se realizó: 000 = 0; 001 = 1; 010 = 2; 011 = 3; 100 = 4; 001 = 5; 110 = 6; 111 = 7. Finalmente este código fue ingresado en la base de datos internacional SITVIT WEB 2 del Instituto Pasteur de la Guadalupe disponible en red en la página http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/query, obteniendo información como el *Spoligotype International Type* (SIT), familias del complejo *M. tuberculosis*, sublinajes y su distribución mundial.

5.5.5 Análisis de los patrones genéticos . Con el fin de agrupar la información obtenida en cada placa, se construyó una base datos en Microsoft Excel 2010 en la cual se incluyeron las siguientes variables de cada aislamiento: código binario, código octal, SIT, linaje y distribución mundial presentada en la SITVIT WEB del Instituto Pasteur de la Guadalupe.

5.6 AGRUPACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLOGICOS

Se realizó la creación de una base de datos en Microsoft Excel 2010 para agrupar la información obtenida de las características socio demográficas asociadas a cada aislamiento clínico como edad, género y presentación clínica.

5.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los datos obtenidos de la realización del *Spoligotyping* de los aislamientos se ingresaron en el programa MIRU-VNTR plus disponible en línea en <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces> y TB-Lineage disponible en línea en [http://tbinsight.cs.rpi.edu/run tb lineage.html](http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_tb_lineage.html), que permitieron la construcción del dendograma, árbol de expansión mínima y el análisis de los genotipos más frecuentes en el Departamento de Santander.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN MEDIANTE SPOLIGOTYPING DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *M. tuberculosis*

Se realizó la caracterización genética de 500 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* obteniendo los respectivos patrones moleculares, datos agrupados en el las tablas 4 y 5.

Del análisis realizado se identificaron 96 espoligotipos, de los cuales 70 se encontraban previamente reportados en la base de datos de la SITVIT2 (Tabla 4) y los restantes 26 no presentaron relación con otros previamente reportados en la SITVIT2 (Tabla 5).

Las familias identificadas en mayor proporción corresponden a la T y Latino Americano y Mediterráneo (LAM) con un porcentaje de 32,6% y 32% respectivamente, seguida de la familia Haarlem con 15,6% como se observa en la figura 6.

Figura 6. Familias de *M. tuberculosis* identificadas en Santander

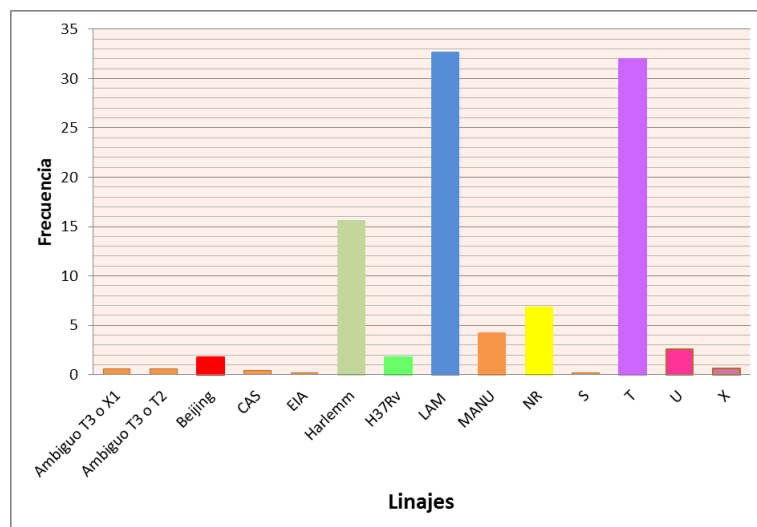
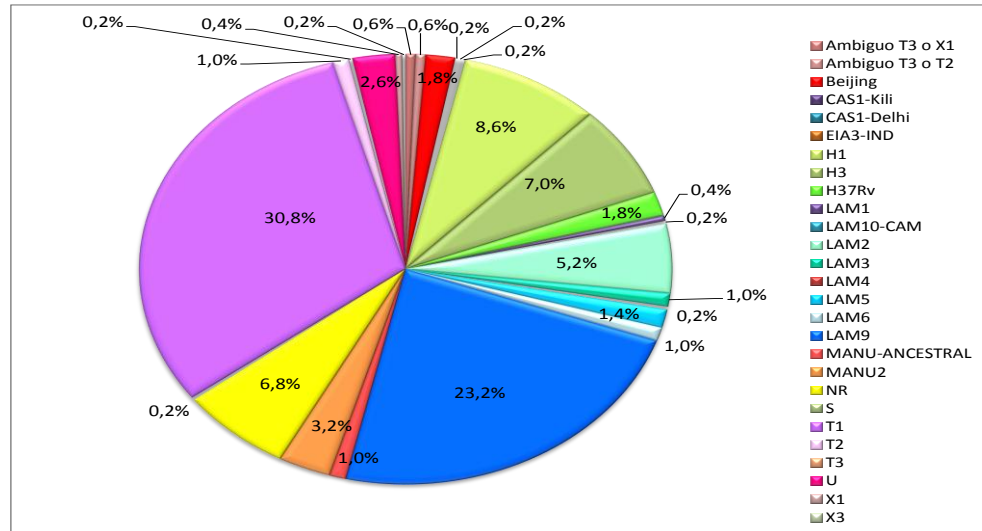


Figura 7. Sublinajes identificados en el Departamento de Santander



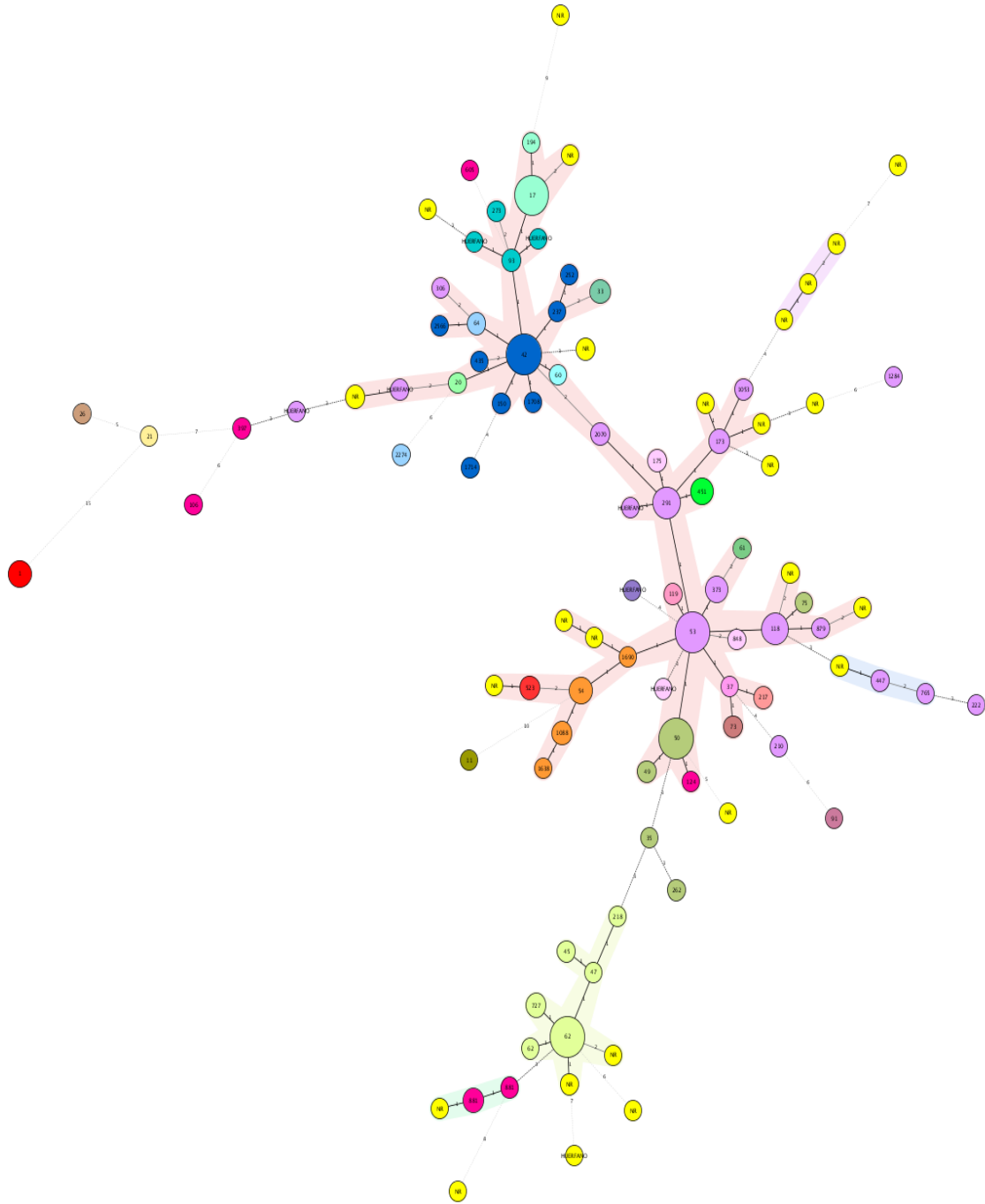
Adicionalmente se lograron identificar 38 *cluster* o agrupamientos, que se observan en el dendograma (Anexo D) y que están definidos como aquellas agrupaciones en los que dos o más aislamientos clínicos presentaron igual patrón molecular.

El agrupamiento con mayor número de muestras es el SIT 42 (LAM9) con 107 aislados correspondiente al 21,4 % de los aislados clínicos evaluados, seguido del SIT 53 (T1) que agrupa 91 aislados clínicos, representando el 18,2% del total evaluado. Otros agrupamientos con más de 20 aislamientos clínicos fueron el SIT 62 (H1), SIT 50 (H3) y 17 (LAM2).

El Árbol de expansión mínima muestra las distancias genéticas entre los diferentes sublinajes y basado en los patrones de espilogotipo, muestra que los 3 mayores agrupamientos son los pertenecientes a los sublinajes de las familias LAM, T y Haarlem, representado en los SIT 42, 53 y 62 respectivamente, (Figura 8).

Se observaron 53 aislamientos clínicos no agrupados, 32 de ellos con único SIT y 21 no reportados en la SITVIT2 que corresponden a un porcentaje de 10,6%.

Figura 8. Árbol de expansión mínima



Lineage					
AMBIGUO T3 -X1	AMBIGUO: T3 o T2	BEIJING	CAS1-DELHI	CAS1-KILI	EIA3-IND
H1	H3	H37RV	H37RV	LAM1	LAM10-CAM
LAM2	LAM3	LAM4	LAM5	LAM6	LAM9
MANU- ANCESTOR	MANU2	NR	S	T1	T2
T3	U	X1	X3		

6.2 RELACIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS IDENTIFICADOS Y CARACTERÍSTICAS SOCIO DEMOGRÁFICAS ASOCIADAS A LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS.

Se logró establecer que de los datos disponibles (316), 193 muestras fueron aisladas de hombres y 123 de mujeres.

Analizando la frecuencia de las familias de *M. tuberculosis* de acuerdo al género de los pacientes de las cuales fueron aisladas las muestras, no se encontró alta frecuencia de alguna de las familias en ninguna de las dos variables analizadas (Tabla 6).

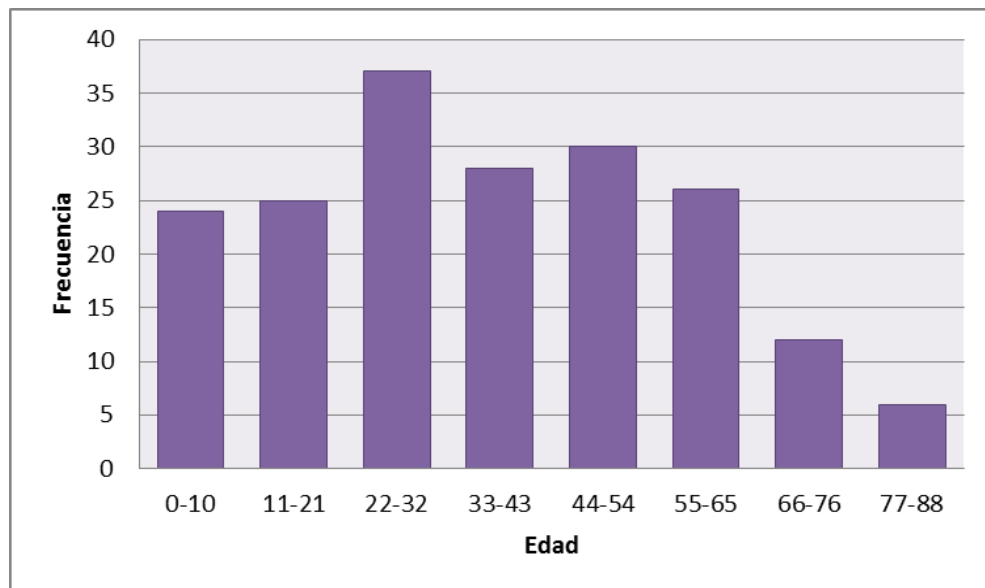
Tabla 6. Sublinajes identificados distribuidos según género de los pacientes

Familia	Género		
	F	M	Sin dato
AMBIGUO T3 -X1	3		
AMBIGUO: T3 o T2	1	1	1
BEIJING		1	8
CAS1-DELHI			1
CAS1-KILI			1
EIA3-IND			1
H1	5	14	24
H3	5	16	14
H37RV		1	8
LAM1			2
LAM10-CAM			1
LAM2	3	10	13
LAM3	1	3	1
LAM4	1		
LAM5	3	3	1
LAM6		2	3
LAM9	31	39	46
MANU-ANCESTOR	1	4	

MANU2	3	10	3
NR	9	17	8
S			1
T1	53	66	35
T2	2	2	1
T3		1	
U	2	3	8
X1			2
X3			1
Total	123	193	184

Del total de aislados clínicos, 189 contenían datos relacionados con la edad del paciente del cual fueron aislados, encontrando que el rango de edad estuvo entre 0 y 88 años, con una media de 37 años, una mediana de 36 y moda de 26 (Figura 9).

Figura 9. Frecuencia edad



De las 500 muestras analizadas, 392 fueron cultivo positivo (muestras multibacilares), 103 cultivo negativo y 5 muestras de biopsias obtenidas de tejidos incluidos en parafina (muestras paucibacilares). En la tabla 7, se observa la relación de las familias identificadas y el resultado del cultivo (positivo, negativo y no aplica que hace referencia a las biopsias embebidas en parafina), se logró determinar que se presenta una alta frecuencia de los sublinajes T1 y MANU2 en las muestras paucibacilares en comparación con los demás sublinajes identificados en este tipo de muestras.

Tabla 7. Distribución de sublinajes de acuerdo al resultado del cultivo

Familia	Resultado cultivo			Total
	No aplica	Negativo	Positivo	
AMBIGUO T3 -X1			3	3
AMBIGUO T3 o T2			3	3
BEIJING			9	9
CAS1-DELHI			1	1
CAS1-KILI			1	1
EIA3-IND			1	1
H1			43	43
H3			35	35
H37RV			9	9
LAM1			2	2
LAM10-CAM			1	1
LAM2		1	25	26
LAM3			5	5
LAM4			1	1
LAM5		1	6	7
LAM6			5	5
LAM9		6	110	116
MANU-ANCESTOR		3	2	5
MANU2		11	5	16
NR		10	24	34
S			1	1
T1	5	71	78	154

T2			5	5
T3			1	1
U			13	13
X1			2	2
X3			1	1
Total	5	103	392	500

De acuerdo a la presentación clínica de la enfermedad se logró determinar que de 268 muestras que contenían este dato, 166 casos correspondían a TB pulmonar y 101 a casos de TB extrapulmonar. En la tabla 8 se estableció la comparación entre la presentación clínica de la TB y las familias de *M. tuberculosis* identificadas, observándose una alta frecuencia de las familias LAM y Haarlem en la presentación clínica pulmonar.

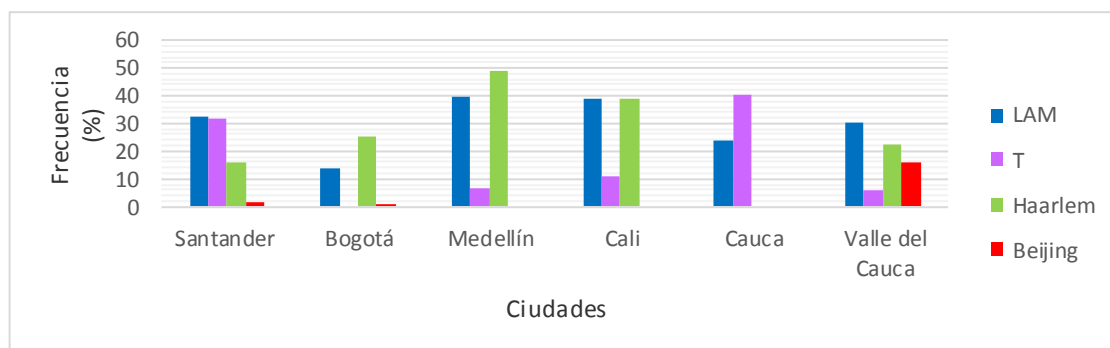
Tabla 8. Distribución de familias de acuerdo a la presentación clínica

Familia	Presentación clínica			Total
	Pulmonar	Extrapulmonar	No dato	
AMBIGUO T3 - X1	2		1	3
AMBIGUO: T3 o T2	3			3
BEIJING	1		8	9
CAS1-DELHI			1	1
CAS1-KILI			1	1
EIA3-IND			1	1
H1	15	2	26	43
H3	11	2	22	35
H37RV	2		7	9
LAM1			2	2
LAM10-CAM			1	1
LAM2	10	2	14	26
LAM3	3	1	1	5
LAM4	1			1
LAM5	4	2	1	7
LAM6	2		3	5

6.4 COMPARACIÓN DE LOS PATRONES GENÉTICOS OBTENIDOS EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER Y LO REPORTADO EN COLOMBIA Y EL MUNDO

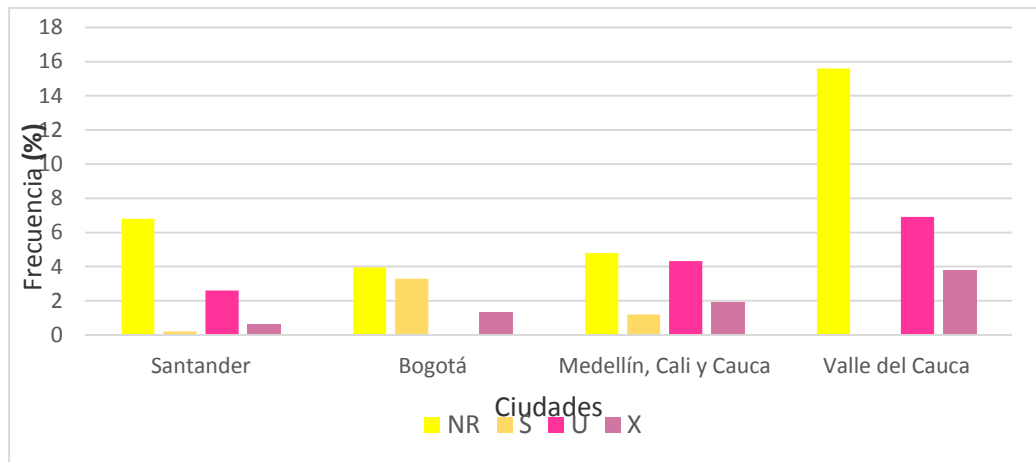
Los principales genotipos identificados en el Departamento de Santander son el T, LAM y Haarlem; al realizar la comparación con lo reportado en Colombia se observa el mismo comportamiento con algunas variaciones en el porcentaje como por ejemplo en la familia T, la cual en el Departamento se encuentra en un porcentaje del 32%, a diferencia del Departamento del Cauca donde se reporta en porcentaje del 40% y menos del 20% en Medellín, Cali y Valle del Cauca (Figura 10).

Figura 10. Frecuencia familias predominantes en ciudades Colombianas



En relación con otros genotipos encontrados en menor proporción en el Departamento de Santander y aquellos no reportados en la SITVIT2, se encuentran datos de estudios realizados en Bogotá, Buenaventura y otro común para las ciudades de Medellín, Cali y el Departamento de Cauca, como se observan en la Figura 11.

Figura 11. Frecuencia familias no dominantes y genotipos no reportados en ciudades Colombianas



6.5 COMPARACIÓN DATOS MUNDIALES

En la tabla 13 se presentan los datos de los agrupamientos que contiene 5 o más aislamientos, su frecuencia en el Departamento de Santander, y la distribución en los países y regiones que contienen un porcentaje igual o mayor de 3, según lo reportado en la SITVIT2, constatando de esta forma que las familias identificadas en el Departamento de Santander pertenecen al linaje Euro-Americano y los porcentajes de frecuencia mayores del 3% se observa en los países Latinoamericanos y Europa a excepción del genotipo Beijing frecuente en países asiáticos y Norte América.

7. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo del estudio se lograron identificar como familias frecuentes en el Departamento de Santander a la T (32,6%), LAM (32%) y Haarlem (15,6%), datos similares a lo descrito en Colombia en el estudio realizado por Puerto y colaboradores, quienes reportaron una frecuencia del 38,6% para la familia LAM, y 31,4% en la familia Haarlem, de igual forma Realpe y colaboradores, describen como familias prevalentes en Medellín y Cali, la LAM y Haarlem con un 82,8%. Otro estudio realizado en Bogotá, identificó a las familias LAM, Haarlem y T con una frecuencia de 49,3%, 25% y 13,8% respectivamente (Cerezo *et al*, 2008).

Un comportamiento similar a lo observado en el Departamento de Santander se encontró en el Departamento del Cauca donde la familia dominante es la T, con un 40%, Realpe y colaboradores relacionan este alto porcentaje con el origen humano de los aislados, alta presencia de población indígena en este Departamento, datos que no guardan relación con los aislados analizados en el Departamento de Santander ya que estos no provenían de este tipo de población y podría tratarse de un linaje ubicuo de nuestra población.

Un hallazgo de gran importancia es la aparición de cepas del genotipo Beijing en el Departamento de Santander en el año 2009 y casos posteriores en el año 2010. En la ciudad de Bogotá en el año 2008 se realiza el reporte del primer caso de TB MDR ocasionada por este genotipo y el estudio nacional desarrollado por Puerto y colaboradores encontró una frecuencia del 0,5% a nivel nacional. Pero contrario al comportamiento encontrado en Santander y Bogotá en las ciudades de Medellín, Cali y Cauca no han sido identificados casos de TB ocasionados por este genotipo. A diferencia de todas estas ciudades en Buenaventura, el principal puerto sobre el pacífico Colombiano, el genotipo Beijing se observa en un porcentaje del 15,6 % de los cepas evaluadas, en tercer lugar después de las

familias LAM y Haarlem. El genotipo Beijing fue descrito por primera vez en Colombia en el año 1998 (Laserson *et al*, 1998) y la mayoría de aislamientos de esta familia pertenecen a pacientes de esta ciudad u oriundos de la misma. Esta familia es frecuente en ciudades Asiáticas; su presencia en nuestro País y principalmente en la ciudad de Buenaventura, muestra que la puerta de entrada de estas cepas se produjo por este puerto sobre el pacifico y las actividades comerciales y de turismo de este puerto han contribuido a la diseminación de este genotipo a otras regiones de Colombia (Ferro *et al*, 2011).

La aparición de este genotipo en el Departamento representa un desafío en términos de Salud Pública por su relación con epidemias de TB y especialmente con resistencia a fármacos, como los casos de TB-MDR (Parwati I *et al*, 2010).

Al realizar la comparación de los diferentes sublinajes y SIT obtenidos se observa que los identificados en mayor proporción en Santander corresponden al SIT42 (LAM9) en un 21,4%, SIT53 (T1) 18,2%, SIT62 (H1) 6,8%, SIT50 (H3) 5,6%. Un comportamiento similar se reportó en Bogotá donde se identificaron el SIT42 (LAM9) con un porcentaje del 27,6%, SIT53 (T1) 11,2%, SIT62 (H1) 8,5% y SIT50 (H3) 4,6% (Cerezo *et al*, 2008). Pero en el estudio realizado en Medellín, Cali y Cauca se presentan los mismos sublinajes pero con diferencia en el porcentaje de presentación, SIT42 (LAM9) en un 29,95%, seguido del SIT62 (H1) 23,43% y finalmente el SIT53 (T1) 5,07% (Realpe *et al*, 2014).

Además durante el análisis de los resultados se identificaron 26 genotipos de *M. tuberculosis* no reportados en la base de datos SITVIT2 que corresponden al 6,8% de los casos del estudio. A nivel nacional, el estudio realizado por Puerto y colaboradores en la evaluación de 900 aislamientos se reportó 16,5% de aislamientos no reportados en la SPOLDB4 (versión anterior de la SITVIT2) (Puerto *et al*, 2010). En el estudio realizado en Medellín, Cali y Cauca (Realpe *et al*, 2014), encontraron 20 genotipos no reportados de un total de 414 aislamientos

evaluados y en Bogotá se encontraron 6,58% de este tipo de aislamientos (Cerezo *et al*, 2008).

El análisis de la relación de las variables sociodemográficas con los diferentes sublinajes de *M. tuberculosis* identificados muestra que no se observó alta frecuencia de algunos de los sublinajes con relación al género del paciente. En general la mayoría de los casos de TB se presentan en hombres, dado que ellos son considerados como la mayor parte de la población laboralmente activa.

La mayoría de casos de TB documentados en el presente trabajo se presentaron en pacientes en las edades de 22-65 años y especialmente en el rango 22-32 años. Dato previamente reportado en el cual la enfermedad se desarrolla en un alto porcentaje en la población económicamente activa.

En la relación entre las familias de *M. tuberculosis* y el resultado del cultivo se observa una alta frecuencia del sublinaje T1 entre las muestras paucibacilares. Dato documentado por Abadia y colaboradores, en Venezuela quienes relacionan este sublinaje con casos de TB baciloscopia negativa, pero concluyen que es necesario un mayor número de datos para confirmar que el dato es estadísticamente significativo, con lo cual nuestro trabajo apoyaría los hallazgos de estos autores (Abadia *et al*, 2009).

Por otra parte se observa que las familias LAM y Haarlem se ven más relacionadas con la presentación clínica pulmonar. Dato documentado por Cerezo y colaboradores, quienes realizaron este análisis con casos de TB en Bogotá, y observaron que los casos de TB pulmonar eran más frecuentes en pacientes infectados con la familia Haarlem, pero al final concluyen que este dato no es estadísticamente significativo (Cerezo *et al*, 2008). De igual forma en el estudio realizado en Medellín, Cali y Cauca en pacientes con TB pulmonar los linajes identificados con mayor frecuencia son el LAM y Haarlem, sin embargo no realizaron un análisis de asociación entre las dos variables que permitiera establecer la relación (Realpe *et al*, 2014).

La identificación molecular de los aislados de *M. tuberculosis* en el Departamento de Santander 2009 - 2012, permitió la generación de una base de datos de las familias identificadas, con lo cual se realizó la detección de posibles casos de reinfección, recaídas y heteroinfección, como los casos documentados 1,2,3,4,5; a pesar de la ventaja de los estudios moleculares se resalta la importancia de realizar estudios de epidemiología clásica simultáneos que permitan establecer en el caso de las recaídas si verdaderamente se trata de estos casos, o si por el contrario son casos de abandono o fracaso al tratamiento. Y en el caso de las heteroinfecciones se recomienda el análisis de los casos mediante metodologías de mayor poder de discriminación como el MIRU-VNTR que permita establecer la presencia de dos cepas en el mismo paciente simultáneamente. Se pudo establecer que los estudios de genotipificación realizados en el País no evaluaron estas condiciones de gran importancia para el manejo clínico y farmacológico del paciente.

Sin embargo cabe resaltar que la falta de datos demográficos asociados a los aislamientos clínicos no permitieron realizar un análisis más minucioso, por lo cual para el establecimiento de la base de datos se espera mayor participación y aprovechamiento de los datos por los entes de control Departamentales, como el Programa de Control de la Tuberculosis.

Al realizar la comparación de los datos obtenidos en este estudio con datos mundiales, según lo reportado en la SITVIT2; en el Caribe, las familias Haarlem, LAM y T están presentes en idénticas proporciones (29,2%, 27,7%, 27,7%). Y en Suramérica, la familia LAM es la más prevalente con 49,3%, seguido de la familia T (26,7%) y Haarlem (15,7%) (Demay *et al*, 2012). Datos que se constatan en los estudios realizados en países como Brasil, Venezuela y Perú, que adicionalmente son de importancia en el trabajo por ser países limítrofes con Colombia. La familia LAM a nivel mundial es el más prevalente en las subregiones de África (Demay *et*

al, 2012) y la más común en Venezuela (53%), Brasil (46%) y Perú (28,3%) (Abadia *et al*, 2009; Gomes *et al*, 2012; Sheen *et al*, 2013).

La familia T por su parte es la más representativa en Europa y el oeste asiático y segunda en frecuencia en Brasil (18,6%), Venezuela (10,6%), y Perú (20,3%) (Demay *et al*, 2012; Abadia *et al*, 2009; Gomes *et al*, 2012; Sheen *et al*, 2013).

Finalmente la familia Haarlem es la segunda más representativa en Europa y en Perú (28,7%), Brasil (12,2%) y Venezuela (5%), ocupa el tercer y cuarto lugar en frecuencia respectivamente (Demay *et al*, 2012; Abadia *et al*, 2009; Gomes *et al*, 2012; Sheen *et al*, 2013).

Las familias identificadas en frecuencias menores al 1%, como EIA, CAS, X, S en el Departamento de Santander han sido reportados previamente en América Latina en similares proporciones, la familia EIA se presenta en países como Perú (0,13%), Venezuela (0,2%) y Brasil (0,85%). La familia CAS no ha sido identificada en Venezuela y Perú, pero en Brasil se presenta en una frecuencia menor al 1% y es la familia más frecuente al sur y oeste asiático. La familia X se ha identificado en Perú (4,94%), Brasil (4,7%) y Venezuela (1,2%) y la familia S en Venezuela y Brasil en un porcentaje de 1,9% y en Perú 0,90% (Abadia *et al*, 2009; Gomes *et al*, 2012; Sheen *et al*, 2013).

El linaje MANU se identificó en un porcentaje del 4,8% en el Departamento de Santander, pero en otros estudios realizados en Colombia no se ha identificado su presencia, lo cual lleva a pensar en la posibilidad que sea una familia que se ha mantenido específicamente en nuestra región. El análisis realizado con los estudios realizados en algunos países Latinoamericanos, muestra su ausencia en Venezuela y en Perú y Brasil representan menos del 1% de los aislados (Abadia *et al*, 2009; Gomes *et al*, 2012; Sheen *et al*, 2013).

La familia U se identificó en una frecuencia del 2,6 % en el Departamento de Santander, y en Colombia se ha identificado en 6,9% en Valle del Cauca, 4,33% en Medellín, Cali y Cauca y no ha sido identificada en la ciudad de Bogotá (Ferro *et al*, 2011; Realpe *et al*, 2014; Cerezo *et al*, 2008), e identificada en los países fronterizos, Venezuela (9,7%) Perú (8,5%) y no identificada en Brasil (Abadia *et al*, 2009; Gomes *et al*, 2012; Sheen *et al*, 2013).

8. CONCLUSIONES

Con el desarrollo del presente trabajo se pudo concluir que las familias de *M. tuberculosis* de mayor prevalencia en el Departamento de Santander son la T, LAM y Haarlem, constatando de esta forma lo anteriormente encontrado por otros autores en diferentes regiones del País.

Con la genotipificación de los aislados de *M. tuberculosis* en el Departamento de Santander se generó una base de datos que permite la identificación de dinámicas de transmisión de la enfermedad, como es la detección de posibles casos de recaídas identificada en los casos 2 y 4 del trabajo, reinfección en el caso 5 y heteroinfección en los casos 1 y 3 y finalmente la identificación de genotipos asociados a resistencia a fármacos como el genotipo *Beijing*, el cual se constituye en el primer hallazgo de este tipo en el oriente colombiano y hasta ahora documentado solo en el sur occidente del País, generando una alerta de la entrada de este nuevo genotipo al Departamento.

Mediante el uso de la metodología molecular de *Spoligotyping* se pudo identificar que los casos diagnosticados como TB por el Programa de Control de la Tuberculosis de Santander, se trataban de casos causados por *M. tuberculosis* y no por otras especies del Complejo *M. tuberculosis*.

La rápida identificación y genotipificación de familias de *M. tuberculosis* a través de la metodología implementada en casos de TB multibacilar, causantes de la rápida propagación de la enfermedad en comunidad permite disminuir los tiempos de inicio del tratamiento adecuado. Adicionalmente se realizó la aplicación de la metodología de *Spoligotyping* en casos paucibacilares permitiendo realizar un apoyo al diagnóstico rápido en casos de tuberculosis extrapulmonar, y a su vez la identificación de la especie del complejo *M. tuberculosis* involucrado en la infección, que apoyan al clínico en el direccionamiento del tratamiento.

A través de la comparación de los patrones genéticos obtenidos en el Departamento de Santander con lo reportado en Colombia y el mundo, se pudo determinar que los patrones genéticos identificados en el Departamento, T, LAM y Haarlem, se encuentran en mayor proporción en países Europeos, de donde se generaron las rutas de conquista y colonización de los países Latinoamericanos. Además se identificaron estos genotipos en porcentajes entre el 10-30% en Colombia, América Latina y el Caribe.

9. DIVULGACIÓN

International Congress Tuberculosis, Leprosy and Micobacteriosis: back to biblical time, today solutions. VI meeting of the SLAMTB 2012. Bucaramanga, Septiembre de 2012. Ponencia: Determination of genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Santander.

International Congress Tuberculosis, Leprosy and Micobacteriosis: back to biblical time, today solutions. VI meeting of the SLAMTB 2012. Bucaramanga, Septiembre de 2012. Poster: Genetic profiles of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in the department of Santander.

10. ASPECTOS ETICOS

De acuerdo con los principios establecidos en la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud de la Republica de Colombia y debido a esta se consideró una investigación sin riesgo, este estudio fue desarrollado conforme a los siguientes criterios:

- Para la ejecución de actividades correspondientes al logro de los objetivos, no fue necesaria la interacción con pacientes, por lo cual ésta investigación no requirió aplicación del consentimiento informado, ya que los datos sociodemográficos fueron recolectados dentro del manejo programático de la enfermedad, como cumplimiento de la circular 058 de 2009, para la realización de pruebas de identificación, susceptibilidad, investigación y documentación del caso.
- Adicionalmente se tomó en cuenta lo descrito en el título IV y capítulo I: de la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos.
- Para la correcta manipulación de los aislamientos clínicos y la cepa ATCC de *M. tuberculosis*, incluidos como microorganismos pertenecientes al grupo de riesgo III, las actividades se llevaron a cabo en el *Mycobacterium*, Laboratorio de Investigación y Extensión de la Facultad de Salud de la UIS, siguiendo los reglamentos específicos para el manejo de este tipo de microorganismos publicados por la OMS, el CDC de Atlanta y el Ministerio de Salud y Protección Social.
- El personal investigador contó con el equipo básico de protección personal que incluyó bata de laboratorio desechable en material antifluido, máscara respiratoria N-95, guantes y polainas, así como con

una póliza de accidentes juveniles (en el caso de ser estudiante) o afiliación a una aseguradora de riesgos profesionales (ARP) y en todos los casos con el cubrimiento en salud por parte de una Entidad Promotora de Salud (EPS).

- La Escuela de Bacteriología de la UIS, lugar en el que se realizaron los procedimientos respectivos, contó con la infraestructura requerida para garantizar la bioseguridad y biocontención del microorganismo.
- Los profesionales participantes en este estudio tenían la experiencia en las actividades propias de los laboratorios de investigación y recibieron el acompañamiento y asesoría del director del proyecto quien cuenta con experiencia en la conducción de estudios relacionados con *M. tuberculosis*.
- La investigación se llevó a cabo previa autorización del Comité de Ética para la Investigación Científica de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander (Anexo E)

11. PERSPECTIVAS

- ✚ Complementar el estudio de genotipificación con la aplicación de técnicas con mayor poder de discriminación como MIRU-VNTR.
- ✚ Generación de una base de los patrones obtenidos durante el análisis de *Spoligotyping* y MIRUS, mediante invitación y compromiso de la Secretaría de Salud de Santander y el Programa de Control de la Tuberculosis en Santander.

BIBLIOGRAFÍA

ABADÍA, E., SEQUERA, M., ORTEGA, D., MÉNDEZ, MV., ESCALONA, A., Da MATA, O., et al. *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. *BMC Infectious Diseases*, 2009; 9:122 doi:10.1186/1471-2334-9-122. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/122>

ALEXANDER, KA., LAVER, PN., MICHEL, AN., WILLIAMS, M., van HELDEN, P., WARREN, RM., and GEY van PITTIUS, NC. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*, 2010; 16(8). DOI: 10.3201/eid1608.100314

ARNVIG, KB., GOPAL, B., PAPA VINASASUNDARAM, KG., COX, RA. , COLSTON, J. The mechanism of upstream activation in the *rrnB* operon of *Mycobacterium smegmatis* is different from the *Escherichia coli* paradigm *Microbiology*, 2005; 151: 467–473

ARANAZ, A., COUSINS, D., MATEOS, A. and DOMÍNGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003; 53: 1785–1789

BAUER, J., ANDERSEN, A.B., KREMER, K., MIORNER, H. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J. Clin. Microbiol*, 1999; 37: 2602–2606.

BAKER, L., BROWN, T., MAIDEN, MC., DROBNIEWSKI, F. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*, 2004; 10: 1568-77.

BRANDT, L., FEINO, J., WEINREICH, A., CHILIMA, B., IRSCH, P., APPELBERG, R., AND ANDERSEN, P. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine: Some Species of Environmental Mycobacteria Block Multiplication of BCG and Induction of Protective Immunity to Tuberculosis. *Infection and immunity*, 2002; 70(2): 672–678

BRUDEY, K., DRISCOLL, JR., RIGOUTS, L., et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*, 2006; 6: 23

BURGOS, M., MÉNDEZ, JC. y RIBON, W. Molecular epidemiology of tuberculosis: methodology and applications. *Biomedica*, 2004; 24(Supl.): 188-201

CAVANAGH, R., BEGON, M., BENNETT, M., ERGON, T., GRAHAM, IM., de HAAS, PE., HART, CA., KOEDAM, M., KREMER, K., LAMBIN, X., ROHOLL, P., and VAN SOOLINGEN, D. *Mycobacterium microti* Infection (Vole Tuberculosis) in Wild Rodent Populations. *J Clin Microbiol*, 2002; 40(9): 3281–3285. doi:

CEREZO, I., JIMÉNEZ, Y., HERNÁNDEZ J., ZOZIO, T., MURCIA, MI., RASTOGI, N. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogotá, Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012; 12: 657–663.. doi:10.1016/j.meegid.2011.07.006

COLE, ST., BROSCH, R., PARKHILL, J. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998; 393: 537-44.

COUSINS, D., BASTIDA, R., CATALDI, A., QUSE, V., REDROBE, S., DOW, S. *et al.* Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003; 53: 1305–1314

DAI, J., CHEN, Y. y LAUZARDO M. Web-Accessible Database of *hsp65* Sequences from *Mycobacterium* Reference Strains. *J Clin Microbiol*, 2011; 49: 2296–2303

DEMAY, C., LIENS, B., BURGUIÈRE, T., HILL, V., COUVIN, D., MILLER, J., MOKROUSOV, I., SOLA, C., ZOZIO, T., RASTOGI N. SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012; 12: 755–766

de JONG, BC., ANTONIO, M., GAGNEUX, S. *Mycobacterium africanum*—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010; 4(9): e744. doi:10.1371/journal.pntd.0000744

FANG, Z., MORRISON, N., WATT, B., DOIG, C., and FORBES, KJ. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Bacteriol*, 1998; 180:2102–2109.

FERRO, BE., NIETO, LM., ROZO, JC., FORERO, L., and van SOOLINGEN, D. Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Southwestern Colombia *Emerging Infectious DiseaseS*, 2011;17(7). DOI: 10.3201/eid1707.101797

FILLIOL, I., DRISCOLL, JR., van SOOLINGEN, D, 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: 1963-70.

FILLIOL, I., MOTIWALA, AS., CAVATORE, M. et al. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol*, 2006; 188: 759

FROTHINGHAM, R., MEEKER-O'CONNELL, WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*, 1998; 144: 1189-96.

GOMES, HM., RIBEIRO, A., CARDOSO, MA., Da SILVA, MA., ONOFRE, FF., MARSICO, AG., et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012; 12: 649–656

GROENEN, PMA., BUNSCHOTEN, AE., van SOOLINGEN, D. and van EMBDEN, JD. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*: application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol*, 1993; 10:1057–1085

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Informe de evento tuberculosis, hasta el periodo epidemiológico 13 del año 2012. 2012

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, Subdirección Red Nacional de Laboratorios. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis y micobacteriosis. 2012. ISBN 978-958-13-0161-4

JORDAO, L. and VIEIRA, O. Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. International Journal of Cell Biology, 2011. Article ID 403623. doi:10.1155/2011/403623

KAMERBEEK, J., SCHOOLS, L., KOLK, A., van AGTERVELD, M., van SOOLINGEN, D., KUIJPER, S., BUNSCHOTEN, A., MOLHUIZEN, H., SHAW, R., GOYAL, M., van EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol, 1997; 35: 907–914.

KANDUMA, E., MCHUGH, TD. AND GILLESPIE, SH. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a user guide. Journal of Applied Microbiology, 2003; 94: 781–791

LASERSON, KF., OSORIO, L., SHEPPARD, JD., HERNÁNDEZ, H., BENÍTEZ, AM., BRIM, S., et al. Clinical and programmatic mismanagement rather than community outbreak as the cause of chronic, drug-resistant tuberculosis in Buenaventura, Colombia, 1998. Int J Tuberc Lung Dis, 2000; 4(7):673–683

LEAO, S., MARTIN, A., MEJIA, GI., PALOMINO, JC., ROBLEDO, J., DA SILVA TELLES, MA., PORTAELS, F. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. 2004

LEGRAND, E., FILLIOL, I., SOLA, C., and RASTOGI, N. Use of Spoligotyping to Study the Evolution of the Direct Repeat Locus by IS6110 Transposition in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol, 2001; 39 (4):1595. DOI: 10.1128/JCM.39.4.1595- 1599.2001.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Guía de atención de la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. Guía 11 Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública. Programa de Apoyo a la Reforma de

Salud/PARS.2007, Disponible en:
<http://www.nacer.udea.edu.co/pdf/libros/guiamps/guias11.pdf>

MOSTOWY, S., INWALD, J., GORDON, S. et al. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. J Bacteriol, 2005; 187: 6386-95.

NATIONAL TUBERCULOSIS CONTROLLERS ASSOCIATION /CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION ADVISORY GROUP ON TUBERCULOSIS GENOTYPING. Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis Prevention and Control Handbook for TB controllers, Epidemiologists, Laboratorians, and Other Program Staff June 2004. Disponible en:
http://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/images/TBGenotypingGuide_June2004.pdf

NEONAKIS, I., GITTI, Z., KRAMBOVITIS, E., SPANDIDOS, D. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. Journal of Microbiological Methods, 2008; 75: 1-11

NIOBE-EYANGO, SN., KUABAN, C., SORLIN, P., et al. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. J Clin Microbiol, 2003; 41: 2547-53.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual para el diagnóstico Bacteriológico de la tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Parte I baciloscopia. 2008. Disponible en <http://files.sld.cu/tuberculosis/files/2009/12/tb-labs-baciloscopia1.pdf>

12. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Tuberculosis Nota descriptiva N°104. Octubre de 2012. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.html>

PALOMINO, J., LEÑO, S., RITACCO, V. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care. First Edition. 2007. Disponible en línea: www.TuberculosisTextbook.com

PARWATI, I., van CREVEL, R., van SOOLINGEN, D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. Lancet Infect Dis. 2010;10:103–11. doi:10.1016/S1473-3099(09)70330-5

PUERTO, G., CORREA, N., CASTRO, C., GARZÓN, MC., ANGEE, D., LLERENA, C., ORJUELA, D., et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains prevalent in Colombia and their association with drug resistance. Molecular epidemiology. Rev. Salud pública, 2010; 12 sup (2): 34-38

REALPE, T., CORREA, N., ROZO, JC., FERRO, BE., GOMEZ, V., et al. Population Structure among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Colombia. PLoS ONE, 2014; 9(4): e93848. doi:10.1371/journal.pone.0093848

SOLA, C., HORGEN, L., GOH, KS., RASTOGI, N. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* on a Caribbean island with IS6110 and DRr probes. J Clin Microbiol, 1997; 35:843-6.

SOLOVIC, I., JONSSON, J., KORZENIEWSKA- KOSEŁA, M., CHIOTAN, DI., PACE-ASCIAC, A., SLUMP, E. et al. Challenges in diagnosing extrapulmonary tuberculosis in the European Union, 2011. Euro Surveill. 2013; 18(12): pii=20432. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20432>

SHEEN, P., COUVIN, D., GRANDJEAN, L., ZIMIC, M., DOMINGUEZ, M., et al. Genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru and Exploration of Phylogenetic Associations with Drug Resistance. PLoS ONE, 2013; 8(6): e65873. doi:10.1371/journal.pone.0065873

SUPPLY, P., MAZARS, E., LESJEAN, S., VINCENT, V., GICQUEL, B., LOCHT, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol. Microbiol, 2000; 36: 762–771.

SUPPLY, P., ALLIX, C., LESJEAN, S., CARDOSO-OELEMANN, M., RUSCHGERDES, S., WILLERY, E., et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* . J. Clin. Microbiol, 2006; 44: 4498–4510

THIERRY, D., BRISSON-NOEL, A., VINCENT-LEVY-FREBAULT, V., NGUYEN, S., GUESDON, J.L., GICQUEL, B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J. Clin. Microbiol, 1990; 28: 2668–2673.

TORREA, G., LEVEE, G., GRIMONT, P., MARTIN, C., CHANTEAU, S., GICQUEL, B. Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. J Clin Microbiol, 1995; 33: 1899-904.

van der ZANDEN, AG., KREMER, K., SCHOULS, LM., CAIMI, K., CATALDI, A., HULLEMAN, A., NAGELKERKE, NJ., van SOOLINGEN, D. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 4628–4639.

van EMBDEN, J.D., CAVE, M.D., CRAWFORD, J.T., DALE, J.W., EISENACH, K.D., GICQUEL, B., HERMANS, P., MARTIN, C., MCADAM, R., SHINNICK, T.M., et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 406–409.

van EMBDEN, JD., van GORKOM, T., KREMER, K., JANSEN, R., van DER ZEIJST, BA. and SCHOULS, LM. Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria. J. Bacteriol, 2000; 182(9): 2393. DOI: 10.1128/JB.182.9.2393-2401.2000

van INGEN, J., RAHIM, Z., MULDER, A., BOEREE, MJ., SIMEONE, R., BROSCHE, R., and van SOOLINGEN D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. Emerging Infectious Diseases, 2012; 18(4). DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1804.110888>

van SOOLINGEN, D., HERMANS, P.W., DE HAAS, P.E., SOLL, D.R., van EMBDEN, J.D. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol, 1991;29: 2578–2

van SOOLINGEN, D., HOOGENBOEZEM, T., de HAAS, PE., HERMANS, PW., KOEDAM, MA., TEPPEMA, K. et al. A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. International Union of Microbiological Societies, 1997; 47(4): 1236-1245

VASCONCELLOS, SE., HUARD, RC., NIEMANN, S., KREMER, K., SANTOS, A., SUFFYS PN., Ho, J. Distinct genotypic profiles of the two major clades of

Mycobacterium africanum. BMC Infectious Diseases 2010, 10:80
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/80>

VERMA, A., AVINASH, K., WAMI, JS. *Mycobacterium tuberculosis rrn* Promoters: Differential Usage and Growth Rate-Dependent Control. Journal of Bacteriology, 1999; 181(4): 4326–4333

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global tuberculosis report 2012. ISBN 978 92 4 156450 2.
http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_main.pdf

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes. Third edition. Geneva 2003

ZOZIO, T., ALLIX, C., GUNAL, S, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in two cities of Turkey: description of a new family of genotypes that is phylogeographically specific for Asia Minor. BMC Microbiol, 2005; 5: 44.

1. **ANEXOS**

ANEXO A. PREPARACIÓN MEDIO DE CULTIVO LÖWESTEIN JENSEN

a. Preparar el siguiente material estéril

- Tubos 13 x 125 mm
- Frasco de vidrio tapa rosca de 2000 ml
- 2 probetas de 500 ml
- 2 embudos con gasa
- Pipetas de 10 ml
- 2 varillas de vidrio estériles
- 2 vasos de precipitado de 50 ml
- 2 vasos de 250 ml
- 1 vaso de 500 ml

b. Preparar la solución de sales y verde de malaquita 2% de acuerdo a la cantidad de tubos a preparar y llevar a la autoclave a 121 ° C durante 20 minutos.

Tubos de medio	200
Sales	600 ml
Agua destilada (volumen mayor por el volumen que se evapora al autoclavar)	700 ml
Fosfato mono potásico anhidro KH_2PO_4 (Merck)	2,8 g
*Citrato de magnesio $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Mg}_3 \cdot 14\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	0,7 g
Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	0,28 g
L-Asparagina $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ (Sigma-Aldrich)	4,2 g
Glicerol $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ (Sigma-Aldrich)	14 g
Verde de Malaquita 2%	20 ml
Verde de Malaquita (Merck)	0,6 g
Agua destilada	30 ml

c. Preparar el homogenizado de huevo y mezcla

- Colocar los huevos en agua con jabón durante 15 minutos y limpiar con una gasa uno a uno
- Enjuagar con abundante agua y secar en un recipiente
- Rociar los huevos con alcohol al 70% y taparlos con gasa durante 20min.
- Adicionar en un vaso de precipitado cada huevo para visualizar la yema completa, firme, redonda y sin restos de sangre.
- Agregar cada huevo a un vaso de precipitado de 250 ml hasta completar tres huevos, y homogenizar con varillas de vidrio.
- Filtrar el homogenizado de huevo sobre un erlenmeyer o probeta a través de un embudo cubierto con la gasa.
- Pasar el homogenizado de huevo a un frasco de 2000 ml hasta completar la cantidad deseada y añadir los demás soluciones en las siguientes proporciones

Tubos de medio	200
Homogenizado de huevo	1250
Sales	750
Verde de Malaquita 2%	25

- Agitar cuidadosamente evitando la formación de burbujas.
- Dispensar 9 ml de medio en tubos 20 x 125 mm.
- Eliminar las burbujas formadas en el tubo
- Llevar al coagulador de Koch a 78 +/- 2°C durante 45 minutos, controlando la adecuada coagulación del medio.

ANEXO B. ESCALA SEMICUANTITATIVA PARA LECTURA DE CULTIVOS EN MEDIO SÓLIDO

Negativo	No se observan colonias
Cultivo positivo (número de colonias) para BAAR	1 a 20 colonias
+	20 a 100 colonias
++	Más de 100 colonias separadas
+++	Colonias confluentes
Contaminado	Desarrollo de microorganismos ácido alcohol sensibles

Tomado de: Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis y micobacteriosis. 2012.

ANEXO C. PREPARACION DE SOLUCIONES

✚ Solución de lisozima (10 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*)

Pesar 10 mg de lisozima y disolver en 1 ml de agua destilada.
Almacenar a -20°C

✚ Solución de proteinasa K (10 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*)

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

✚ SDS 10% (*Sigma-Aldrich*)

Pesar 10 g de SDS y disolver en 100 ml de Agua destilada

✚ Solución de Bromuro de N-hexadecil N,N,N- trimetilamonio (CTAB) (*Sigma-Aldrich*)/NaCl(*Merck*)

Pesar 4.1 g de NaCl y 10 g de CTAB y disolver en 80 ml de Agua destilada (calentando a 65°C). A justar a 100 ml con agua destilada y almacenar a temperatura ambiente.

✚ Etanol 70% (*Merck*)

Mezclar 70 ml de etanol absoluto con 30 ml de agua ultrapura.
Almacenar a 4°C.

✚ Solución amortiguadora de pH de carga de muestra (5X)


Pesar 0.3 g de Tris-Base, 0,1 de EDTA y 25 mg de azul de bromofenol.
Disolver en 3 ml de agua destilada. Añadir 5 ml de glicerol. Ajustar el pH= 8 y llevar a 10 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave por 15 min.

✚ Solución amortiguadora TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X (*Sigma-Aldrich*)


Diluir 1000 ml de solución amortiguadora de TBE 5X EN 4000 ml de agua destilada.

 **EDTA 20 mM, ph 8 (*Sigma-Aldrich*)**


Tomar 20 ml de EDTA 0.5 M y completar a 500 ml con agua destilada

 **SSPE 2X (*Sigma-Aldrich*)**

Tomar 50 ml de SSPE 20X y completar a 500 ml con agua destilada.

 **SSPE 2X, SDS 0,1%**

Agregar 50 ml de SSPE 20X y 0,5 g de SDS y completar a 500 ml de agua destilada

 **SSPE 2X, SDS 0,5%**

Agregar 50 ml de SSPE 20X y 2,5 g de SDS y completar a 500 ml de agua destilada

ANEXO D