



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Desnaturalización térmica de productos de
amplificación para genotipificar las especies del
complejo *Mycobacterium tuberculosis***

Tesis que presenta

Mariel Idalid Domínguez Zepahua

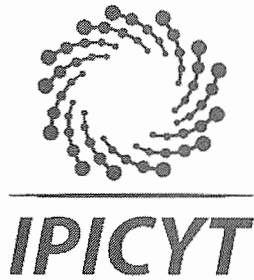
Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis:

Dr. Rubén Hipólito López-Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2019



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Desnaturalización térmica de productos de amplificación para genotipificar las especies del complejo Mycobacterium tuberculosis***" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mariel Idalid Domínguez Zepahua** y aprobada el veinte de septiembre del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Director de la tesis

Dr. J. Sergio Casas Flores
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Luisa Eugenia del Socorro Hernández Arteaga
Miembro del Comité Tutorial

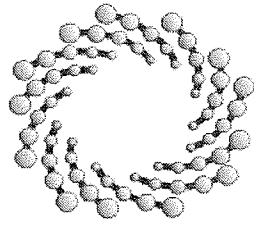
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No.250301) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 107 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 20 días del mes de septiembre del año 2019, se reunió a las 17:10 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Presidenta	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dra. Luisa Eugenia del Socorro Hernández Arteaga	Sinodal externo	UASLP
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Mariel Idalid Domínguez Zepahua

sobre la Tesis intitulada:

Desnaturalización térmica de productos de amplificación para genotipificar las especies del complejo Mycobacterium tuberculosis

que se desarrolló bajo la dirección de

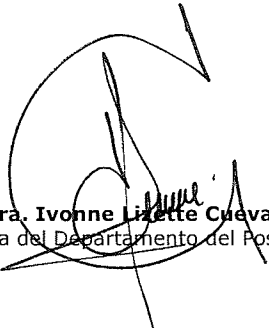
Dr. Rubén Hipólito López Revilla


El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:51 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 20 días del mes de septiembre de 2019.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mis padres y mis hermanos que siempre me motivaron para terminar esta etapa, a mí Alessandra que es el motor por el cuál no desistí durante este proceso y a Vini que con un par de palabras siempre simplificaba todo y me regresaba a la lucha de este logro.

Agradecimientos

Dr. Rubén López-Revilla, por ser mi maestro durante todos estos años y aceptarme como parte de su equipo de laboratorio.

Dr. Luisa Eugenia del Socorro Hernández Arteaga, por la capacitación en la técnica de qPCR y manejo del equipo.

Dr. Lina Riego Ruiz y al Dr. Sergio Casas Flores por sus comentarios para la mejora de la tesis.

Biol. Mireya Sánchez-Garza por toda la ayuda para resolver cuestiones técnicas y ayudarme a conseguir el material.

Dr. Estela López-Rocha quién me entrenó en las técnicas del laboratorio de Biología Molecular.

Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez (InDRE) que amablemente nos compartió DNA de las Cepas del InDRE para la validación de este trabajo.

Dr. Óscar E. Pizano (INIFAP) que nos dio DNA de las cepas de referencia M bovis AN5.

Q.F.B. Francisco Ortega (LESP) que donó DNA de cepas de M tuberculosis y M bovis humana y bovina de su laboratorio.

LANBAMA por el apoyo técnico y realización de la secuenciación.

IPICYT por aceptarme en su programa de Doctorado

CONACYT por la beca otorgada durante el doctorado.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio...Gracias!!!

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales.....	iii
Acta del examen	iv
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Abreviaturas	xii
Resumen	xiii
Abstract.....	xiv
Tuberculosis humana y bovina y el Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ..	1
Tuberculosis humana y bovina.....	1
Especies del CMTB	2
<i>Distribución global</i>	2
<i>Genomas del CMTB</i>	3
Amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de TB.....	5
PCR en tiempo real para la genotipificación del CMTB	6
Desnaturalización térmica para genotipificar las especies causantes de tuberculosis humana y bovina	9
Introducción	9
Justificación	10
Objetivo	10
Etapas del trabajo	11
Material y métodos.....	11
<i>Diseño del método</i>	11
<i>Genomas de referencia</i>	12
<i>Diseño de oligonucleótidos</i>	12
<i>Cepas de referencia</i>	14
<i>Productos de amplificación</i>	14
<i>Clonación de los cinco amplicones de interés</i>	14
<i>Caracterización de los insertos</i>	15
<i>Optimización del contenido de oligonucleótidos</i>	15
<i>Desnaturalización térmica de los productos de amplificación</i>	16
Genotipificación de las cepas del panel del InDRE y de aislados de casos de tuberculosis humana y bovina	16

Resultados.....	17
<i>Diseño y selección de oligonucleótidos</i>	17
<i>Validación de las parejas de oligonucleótidos</i>	19
<i>Clonación de los cinco amplicones de interés</i>	19
<i>Caracterización de los insertos clonados</i>	19
<i>Optimización de la concentración de los oligonucleótidos</i>	19
Desnaturalización térmica de los productos de amplificación.....	20
<i>Identificación de las muestras del panel de InDRE</i>	28
<i>Identificación de 13 cepas del CMTB aisladas de casos de tuberculosis humana y bovina</i>	34
Discusión	39
Referencias	42
Anexo	49

Lista de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados	18
Tabla 2. Amplicones esperados y coordenadas de las parejas de oligonucleótidos en el genoma	21
Tabla 3. Secuencias de los insertos.....	22
Tabla 4. Concentraciones de oligonucleótidos optimizadas	23
Tabla 5. Valores de Tm de los amplicones en las cepas de referencia y en los insertos..	24
Tabla 6. Valores de Tm de los amplicones en el panel del InDRE	29
Tabla 7. Concordancia entre la identidad asignada a las cepas del panel y el genotipo derivado del patrón de amplicones	30
Tabla 8. Genotipos identificados y concordancia con el panel del InDRE	32
Tabla 9. Concordancia y genotipos identificados en las 13 cepas del CMTB	35

Lista de figuras

Fig. 1. Amplicones y oligonucleótidos en las mezclas de reacción del método previo y el nuevo método de genotipificación del CMTB basado en la desnaturalización térmica de amplicones de las regiones de diferencia.....	8
Fig. 2. Algoritmo para el análisis de los perfiles de desnaturalización térmica de muestras sospechosas de tuberculosis humana y bovina	13
Fig. 3. Perfiles de desnaturalización térmica y electroferograma de los amplicones de rDNA 16S de referencia.....	25
Fig. 4. Perfiles de desnaturalización térmica y electroferogramas de los amplicones RD9+ y RD1- de referencia	26
Fig. 5. Perfiles de desnaturalización térmica y electroferogramas de los amplicones RD4+ y RD4- de referencia	27
Fig. 6. Genotipos identificados a partir de los patrones de desnaturalización térmica de los amplicones de las 44 muestras del panel incluidas	33
Fig. 7. Electroferogramas de los amplicones generados en las mezclas de qPCR de los 13 aislados de TB humana y bovina	36
Fig. 8. Perfiles de desnaturalización térmica de los amplicones de seis cepas del CMTB aisladas de tres infecciones humanas y tres bovinas.....	37
Fig. 9. Amplicones generados a partir de DNA humano y de las tres cepas de referencia y las 13 cepas de infecciones humanas y bovinas	38

Anexos

Anexo 1. Artículo publicado y generado del trabajo de tesis que muestra la validación del método de qPCR diseñado para identificar a las especies principales que causan Tuberculosis en humanos, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*.....**49**

Abreviaturas

BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CMTB	complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Cq	Ciclo de la qPCR
DR	Repetidos directos (<i>direct repeats</i>)
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
<i>inhA</i>	Gen de la enoil-[ACP] reductasa dependiente de NAD/NADH
IS	Secuencia de inserción (<i>insertion sequence</i>)
<i>katG</i>	Gen de la catalasa-peroxidasa
<i>mtp40</i>	Gen del antígeno MTP40
NTC	Aislado que no pertenece al CMTB
OMS	Organización Mundial de la Salud (<i>World Health Organization</i>)
<i>oxyR</i>	Probable activador genético inducible por peróxido de hidrógeno
pb	Pares de bases
pDZ101	Plásmido con el inserto de rDNA 16S (445 pb)
pDZ107	Plásmido con el inserto RD4- (172 pb) de <i>M. bovis</i> BCG str. Mexico
pDZ108	Plásmido con el inserto RD4- (172 pb) de <i>M. bovis</i> AN5
pDZ110	Plásmido con el inserto RD4+ (401 pb)
pDZ205	Plásmido con el inserto RD1- (222 pb)
pHE102	Plásmido con el inserto RD9+ (361 pb)
<i>pncA</i>	Gen de la pirazinamidasasa
qPCR	PCR cuantitativa (<i>quantitative PCR</i>)
RD	Región de diferencia (<i>region of difference</i>)
rDNA 16S	DNA ribosomal 16S
RFU	Unidades de fluorescencia relativa
<i>rpoB</i>	Gen de la subunidad beta de la RNA polimerasa
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
TB	Tuberculosis
Tm	Temperatura de fusión
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
ΔCq	Diferencial entre valores de dos ciclos en la qPCR

Resumen

Desnaturalización térmica de productos de amplificación para genotipificar las especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

OBJETIVO. Desarrollar un método de qPCR basado en la desnaturalización térmica de amplicones del rDNA 16S y regiones de diferencia (RD1, RD4, RD9) del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). **MÉTODOS.** Diseñamos parejas de oligonucleótidos para generar amplicones de rDNA 16S del CMTB y de RD1, RD4 y RD9 de las cepas de referencia *M. tuberculosis* (*MTB*) H37Rv, *M. bovis* (*MB*) AN5 y *MB* BCG str. México. Determinamos la temperatura de desnaturalización térmica (T_m) de los amplicones en presencia de EvaGreen. Con plásmidos derivados de pGEM-T Easy con insertos de los amplicones de referencia controlamos los ensayos de genotipificación de tres mezclas de qPCR: preliminar (para rDNA 16S), D1 (para RD9+/RD1-) y D2 (para RD4+/RD4-) validadas con DNA de 44 cepas de un panel de micobacterias CMTB (*MTB* y *MB*) y no-CMTB (*MNTB*). **RESULTADOS.** Los insertos de rDNA16S, RD1-, RD4+, RD4- y RD9 tuvieron los tamaños y secuencias esperadas y valores de T_m característicos que permitieron diferenciar RD9+ de RD1- en la mezcla D1 ($\Delta T_m = 1.4$ °C) y RD4+ de RD4- en la mezcla D2 ($\Delta T_m = 1.53$ °C). Los genotipos identificados tuvieron las siguientes concordancias con las asignaciones del panel: CMTB (*MTB+MB+MA*) 39/39 (100%), *MTB+MA* 22/23 (95.7%), *MB* 16/16 (100%), *NMTB*: 5/5 (100%). El nuevo método identificó correctamente nueve de 10 aislados de *MTB* y tres de tres de *MB* y distinguió el genotipo *MA* en cinco de las 23 cepas del panel asignadas a *MTB*. **CONCLUSIONES.** Aparte de ser más rápido y fácil de interpretar que la espiligotipificación, el nuevo método es menos laborioso, identifica los tres genotipos del panel (*MTB*, *MB* y *MNTB*), distingue el genotipo *MA* en cepas del panel asignadas a *MTB*, e identifica aislados de TB humana y bovina.

Palabras clave: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, EvaGreen, qPCR, regiones genómicas de diferencia, desnaturalización térmica.

Abstract

Thermal denaturation of amplification products for genotyping species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex

AIM. To develop a qPCR method based on thermal denaturation of amplicons from 16S rDNA and three regions of difference (RD1, RD4, RD9) of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). **METHODS.** We designed oligonucleotide pairs to generate 16S rDNA amplicon, RD1, RD4 and RD9 amplicons of the *M. tuberculosis* (*MTB*) H37Rv, *M. bovis* (*MB*) AN5 and *MB* BCG str. Mexico reference strains. Thermal denaturation temperature of (T_m) values of the amplicons were determined in the presence of EvaGreen. With plasmids derived from pGEM-T Easy containing inserts of the reference amplicons we controlled the genotyping assays of three qPCR mixes: preliminary (for rDNA 16S), D1 (for RD9+ / RD1-) and D2 (for RD4+ / RD4-) validated with DNA from a mycobacterial panel of 44 MTC (*MTB* and *MB*) and non-MTC (*MNTB*) strains of the Mexican Institute of Epidemiological Diagnosis and Reference (InDRE). **RESULTS.** The rDNA16S, RD1-, RD4 +, RD4- and RD9 inserts had the sizes and sequences expected, and their characteristic T_m values differentiated RD9+ from RD1- in the D1 mix ($\Delta T_m = 1.4$ ° C), and RD4+ from RD4- in the D2 mix ($\Delta T_m = 1.53$ ° C). The genotypes identified had the following concordance with those assigned in the panel: MTC (*MTB*+*MB*+*MA*) 39/39 (100%), *MTB*+*MA* 22/23 (95.7%), *MB* 16/16 (100%), *NMTB* 5/5 (100%). The new method identified correctly 9/10 *MTB* isolates and 3/3 *MB* isolates and distinguished the *MA* genotype in five of the 23 strains assigned to *MTB*. **CONCLUSIONS.** Our qPCR method is faster, easier to interpret and less laborious than spoligotyping, identifies the three genotypes of the panel (*MTB*, *MB* and *MNTB*), and distinguishes the *MA* genotype among panel strains assigned to *MTB*, and identifies human and bovine TB isolates.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium tuberculosis* complex, EvaGreen, qPCR, genomic regions of difference, thermal denaturation.

Tuberculosis humana y bovina y el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberculosis humana y bovina

La tuberculosis (TB) es la infección pulmonar o extrapulmonar activa o latente de humanos causada por bacilos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), constituido por las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. canettii* y *M. mungi*. Cada especie tiene diferente interés epidemiológico, rango de hospederos, virulencia y patrones de farmacorresistencia (Parsons et al. 2002; Pounder et al. 2010).

La Organización Mundial de la Salud estima que en 2009 hubo 9.4 millones de casos nuevos y 1.3 millones de defunciones por TB en personas VIH negativas y aproximadamente 400,000 defunciones en personas VIH positivas. A estas cifras hay que añadir 511,000 casos nuevos de TB resistente a múltiples fármacos (MRD-TB) ocurridos globalmente y al menos un caso de TB extensamente resistente a fármacos (XRD-TB) en más de 50 países, México incluido (Organización Mundial de la Salud 2010).

La infección por *M. bovis* es la primera causa de TB zoonótica (i.e., TB humana transmitida por animales) y ocurre principalmente en países en desarrollo donde la pasteurización de los productos lácteos y los programas de control animal son deficientes o nulos (Cosivi et al. 1998).

El diagnóstico de TB zoonótica requiere métodos rápidos, confiables y accesibles que distingan *M. bovis* entre la población de alto riesgo, pues los métodos microbiológicos tradicionales para diferenciar las especies del CMTB son laboriosos y generan resultados después de varias semanas (Tyrrell et al. 2012).

Como la prevalencia de TB extrapulmonar por *M. bovis* es 19 veces mayor que la de TB pulmonar, especialmente en niños (Dankner and Davis 2000), es probable que en el estado de San Luis Potosí rebase el 8% de los casos de TB pulmonar, sobre todo en menores de 15 años (Lopez-Rocha et al. 2013). Contribuir a resolver este problema nos motivó a desarrollar un método molecular confiable,

rápido y barato para reforzar el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de la TB humana de origen bovino.

Especies del CMTB

Las especies más relevantes del CMTB son *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis*. Aunque *M. tuberculosis* es la causa más frecuente de TB en humanos, también se han registrado casos en gatos y perros domésticos (Aranaz et al. 1996). *M. bovis* causa TB en bovinos y tiene el más amplio rango de hospederos del CMTB, que incluye a los humanos (Biet et al. 2005). *M. tuberculosis* es un organismo aeróbico en tanto que *M. bovis* es microaerófilico y requiere una atmósfera suplementada con CO₂ al 5-10% (Garnier et al. 2003). *M. africanum*, prevalente en África, causa TB en humanos y primates (Thorel 1980). *M. microti* causa TB en roedores pequeños pero no significativamente en humanos (Cousins et al. 1994).

Distribución global

Los integrantes del CMTB parecen haberse originado a partir de un ancestro único, *Mycobacterium prototuberculosis*, en Mesopotamia, de donde la cepa se diseminó inicialmente hacia África y luego a Asia y Europa (Gagneux and Small 2007; Gutierrez et al. 2005; Wirth et al. 2008).

La cepa ancestral se diferenció primero en *M. tuberculosis* y *M. canetti*. Por diferenciaciones subsecuentes aparecieron *M. microti* y cuatro linajes de *M. tuberculosis* (Euroamericano, Indooceánico, Asiático Oriental e Indoafricano Oriental) para, finalmente, terminar de diferenciarse en *M. bovis* (Gagneux and Small 2007).

Desde su evolución a partir de *M. prototuberculosis* las cepas que componen el CMTB se han distribuido en todo el mundo conjuntamente con las migraciones humanas. Por eso actualmente la infección por alguno de los agentes del CMTB se encuentra en todos los continentes. Sin embargo, hay regiones donde la infección es mucho más frecuente como el continente asiático, donde en el año 2016 se presentó el 45% de los casos nuevos de TB, seguido por el continente africano, que

registró el 25% de los casos nuevos (Gagneux and Small 2007; World Health Organization 2018).

A pesar de su distribución cosmopolita, se han observado variaciones regionales en la identidad de los agentes del CMTB causantes de infección, especialmente en *M. africanum* y *M. tuberculosis*. Este hecho se atribuye a las actividades agrícolas y pecuarias que el ser humano ha desarrollado durante los procesos de migración global. La suposición se apoya en que todas las especies del CMTB se encuentran altamente adaptadas a un huésped no humano particular (Gagneux and Small 2007).

Según la OMS, en 2016 el 80% de los casos nuevos de TB se registraron en los 30 países con la más alta morbilidad y siete de estos países (India, Indonesia, China, Filipinas, Pakistán, Nigeria y Sudáfrica) aportaron, en conjunto, el 64% de los casos nuevos de TB en el mundo (World Health Organization 2018).

La distribución global de la TB ocasionada por especies del CMTB en los países industrializados es muy diferente a la de los países en desarrollo. Las tasas de incidencia de la enfermedad habían tenido una tendencia a la baja durante el periodo 1960-1980; sin embargo, entre los años 1985-1992 se observó un resurgimiento de la enfermedad en EE.UU. y Europa (Cantwell et al. 1994; Raviglione et al. 1993).

Se han señalado diversas causas para explicar el resurgimiento de la enfermedad, tales como la pobreza de las poblaciones marginales de las grandes ciudades, la inmigración desde países con alta endemia, la aparición de la epidemia por VIH, etc. Sin embargo, hay señalamientos de que la subestimación de la enfermedad y la creencia de que había sido controlada y prácticamente erradicada originó un descuido en los programas de diagnóstico y control que derivó en su resurgimiento (Cantwell et al. 1994; CENAPRECE 2009; Raviglione et al. 1993).

Genomas del CMTB

Los miembros del CMTB tienen hasta 99.95% de similitud en su DNA genómico. Sin embargo, se observa gran variabilidad en la identidad fenotípica y el rango de hospederos, así como el tipo y la gravedad de la enfermedad. Todas las cepas

muestran más de 90% de similitud entre ellas, excepto por la relación entre *M. microti* y algunas cepas de *M. bovis*, *M. bovis* BCG o *M. africanum*, donde la similitud disminuye hasta 85% (Chaves et al. 2010; Fleischmann et al. 2002; Imaeda 1985).

Mediante alineación de las secuencias de genomas completos de los miembros del CMTB se han logrado identificar 417 regiones que se encuentran en un genoma o grupo de genomas determinados y no en otros. Se identificaron nueve regiones en *M. tuberculosis* H37Rv, siete en *M. tuberculosis* H37Ra, 21 en *M. tuberculosis* CDC1551, 40 en *M. tuberculosis* F11, 27 en *M. bovis* BCG y 20 en *M. bovis* AF2122/97, que suman 124 regiones exclusivas (Chaves et al. 2010).

De manera general, el genoma de los miembros del CMTB contiene unos 4,000 genes distribuidos en ambas cadenas de DNA que ocupan el 91% de la capacidad codificante del material genético. Se estima que 51% de los genes de los miembros del CMTB se originaron a partir de duplicaciones y hasta un 4% está compuesto por secuencias de inserción, de las que hay 56 copias agrupadas en las familias IS3, IS5, IS21, IS30, IS110, IS256 e ISL3 (Camus et al. 2002; Cole 2002; Gordon et al. 1999; Scorpio and Zhang 1996; Sreevatsan et al. 1997).

El genoma de los miembros del CMTB tiene una tasa característicamente baja de polimorfismos de nucleótido único (SNP) —alrededor de uno por cada 2,000 ± 4,000 pares de bases (pb)— y la mayoría son mutaciones silenciosas. Por eso se supone que las inserciones y deleciones genómicas son los medios más comunes para generar diversidad genómica. La mayoría de las deleciones parecen provenir de eventos de transposición en los que generalmente está implicado el elemento transponible IS6110. Por otra parte, hasta ahora no hay evidencia de transmisión horizontal de genes entre los miembros del CMTB (Cole 2002; Scorpio and Zhang 1996; Sreevatsan et al. 1997).

Las deleciones que originan diversidad genómica entre los miembros del CMTB se clasifican en dos grandes grupos: ancestrales y recientes. Las deleciones ancestrales tuvieron lugar durante el proceso evolutivo de especiación de los componentes del CMTB y se encuentran ampliamente distribuidas en sus genomas. Las deleciones recientes implican la aparición de la región RD2 en cepas de *M. bovis* BCG y una deleción de 7 kilobases en el elemento IS6110 de la cepa de *M.*

tuberculosis H37Ra avirulenta respecto a *M. tuberculosis* H37Rv (Brosch et al. 1999; Ho et al. 2000; Mahairas et al. 1996).

La pérdida de las regiones RD7, RD8, RD9 y RD10 de *M. microti*, *M. bovis* y *M bovis* BCG, parece ser un evento evolutivo mucho más antiguo que la pérdida de RD2. Esta idea se apoya en el hecho de que estas deleciones ocurrieron en regiones codificantes. Además, se ha demostrado mediante alineación de genomas completos, que las regiones que flanquean las RD en *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. bovis* y *M. microti* son idénticas en secuencia y posición. Este hecho descarta la posibilidad de que *M. tuberculosis* haya adquirido las RD y apoya la idea de que los otros miembros del CMTB las han ido perdiendo paulatinamente (Cole 2002; Scorpio and Zhang 1996; Sreevatsan et al. 1997).

Amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de TB

La espoligotipificación detecta ciertos espaciadores entre las secuencias nucleotídicas de repetidos directos (DR, siglas del inglés *direct repeat*), permite diferenciar *M. bovis* de otros miembros del CMTB y se usa ampliamente en estudios de epidemiología molecular (Kamerbeek et al. 1997).

Los métodos moleculares que diferencian *M. tuberculosis* de *M. bovis* incluyen los que amplifican las regiones de diferenciación (RD, siglas del inglés *regions of differentiation*) (Parsons et al. 2002) y los que detectan mutaciones en los genes *pncA* y *oxyR* (Scorpio and Zhang 1996) y *mtp40* (Del Portillo et al. 1991).

Los métodos para identificar *M. bovis* se basan en la persistencia de diversas RD en los genomas de las especies del CMTB. Un método de PCR convencional utiliza la región RD7, ausente en *M. bovis* (Huard et al. 2003). Un segundo método, de PCR en tiempo real, emplea una sonda que hibrida con la región RD4 (Taylor et al. 2007). Otro, de PCR multiplex, basado en la deleción de la región RD4 característica de *M. bovis*, identifica *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. microti* y diferencia *M. tuberculosis* de *M. bovis* y del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Pinsky and Banaei 2008).

PCR en tiempo real para la genotipificación del CMTB

La genotipificación de aislados del CMTB para identificar la especie reviste especial importancia debido a que ciertos eventos de mutaciones ancestrales y recientes pueden generar resistencia intrínseca a algunos tratamientos antifímicos (Cole 2002; Scorpio and Zhang 1996; Sreevatsan et al. 1997).

Con esta finalidad se han desarrollado diferentes métodos de PCR en tiempo real para identificar los miembros del CMTB y las mutaciones que originan resistencia al tratamiento en diversas muestras biológicas. Así, Galarza et al. (2016) desarrollaron un método para la identificación de *M. tuberculosis* mediante el análisis de desnaturalización térmica de los amplicones de PCR del elemento IS6110, que además detecta las mutaciones en los genes *rpoB* y *katG* y la región promotora del gen *inhA* responsables de la resistencia a isoniazida. Este método tiene una sensibilidad del 98.7% y una especificidad de 97.5% para la detección de genes implicados en la resistencia a rifampicina y del 98.7% y 100% para la detección de los implicados en la resistencia a isoniazida.

Otros autores han desarrollado métodos para detectar e identificar genes del CMTB y sus variantes implicados en la resistencia a pirazinamida (*pncA*), rifampicina (*rpoB*), isoniazida (*inhA*) o la variante genotípica de *NAT2* por análisis de alta resolución de los perfiles de desnaturalización térmica (Choi et al. 2010; Hu et al. 2016; Osman et al. 2016).

En mi tesis de maestría (Domínguez-Zepahua 2012) desarrollé un método de PCR multiplex de punto final anidada/semianidada ultrasensible para identificar *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG basado en el método de Pinsky y Banaei (2008). El método desarrollado consta de dos mezclas de PCR multiplex directas (D1 y D2) seguidas de mezclas de reacción multiplex anidadas/semianidadas correspondientes (A1 y A2), que emplean 15 veces menos oligonucleótidos que el original.

A partir del método previo me propuse desarrollar y validar un nuevo método de qPCR basado en la desnaturalización térmica de amplicones del rDNA 16S y las tres regiones de diferencia del genoma del CMTB (RD1, RD4, RD9) que permite distinguir *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG y *M. africanum* y tiene la ventaja

de ser más rápido y menos laborioso, especialmente porque elimina el análisis electroforético.

El nuevo método, descrito en el capítulo siguiente y recién publicado (Dominguez-Zepahua et al. 2018), aventaja al método previo porque emplea cinco parejas de oligonucleótidos en lugar de 10, tres mezclas de reacción en lugar de cuatro y empieza con una mezcla de reacción preliminar uniplex para la búsqueda del rDNA 16S del género *Mycobacterium*, que en caso de resultar negativa evita las reacciones restantes (D1, dúplex para RD1+ y RD9+; D2, dúplex para RD4+ y RD4-), que se efectúan simultáneamente en los casos rDNA 16S-positivos (véase la Fig. 1).

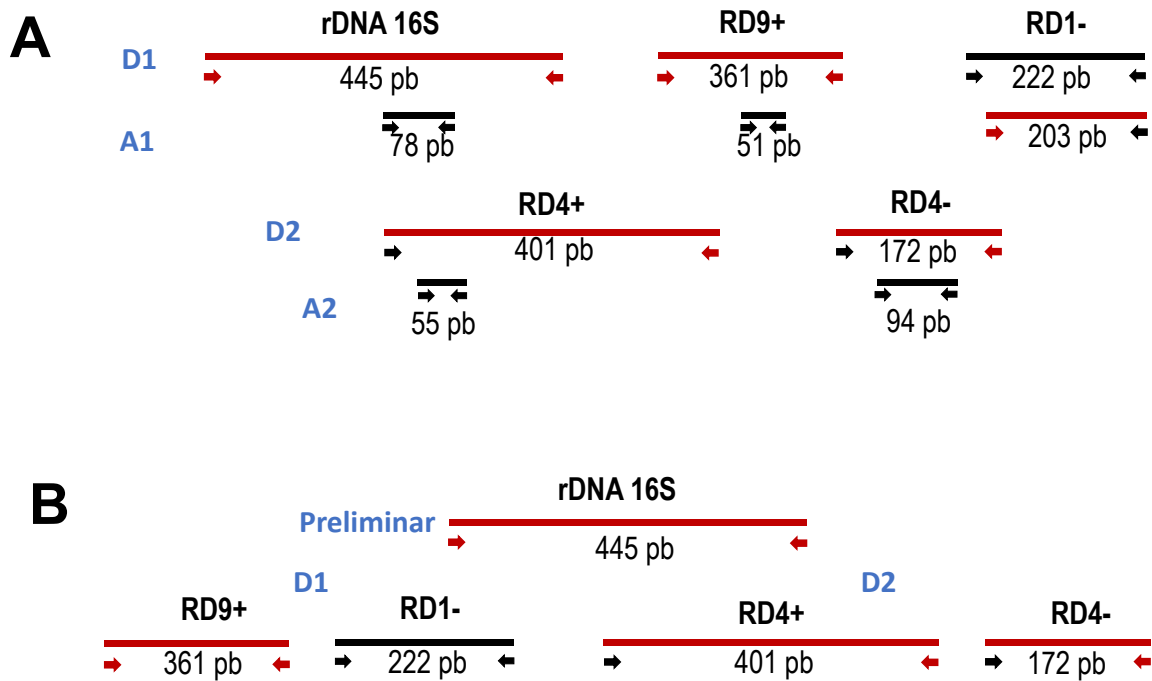


Fig. 1. Amplicones y oligonucleótidos en las mezclas de reacción del método previo y el nuevo método de genotipificación del CMTB basado en la desnaturalización térmica de amplicones de las regiones de diferencia

(A) Método previo. Mezclas de reacción directas D1 (triplex) y D2 (dúplex) y anidadas/semianidadas A1 (triplex) y A2 (dúplex). (B) Mezclas de reacción Preliminar, D1 (dúplex) y D2 (dúplex) son incubadas simultáneamente. Los oligonucleótidos diseñados por Pinsky y Banaei (2004) están señalados con flechas negras y los del nuevo método con flechas rojas.

Desnaturalización térmica para genotipificar las especies causantes de tuberculosis humana y bovina

Introducción

M. bovis tiene el más amplio rango de hospederos, pues incluye animales silvestres, domésticos y de interés comercial (Parsons et al. 2002). En humanos, esta especie, causa con mayor frecuencia TB extrapulmonar que pulmonar y su resistencia natural a la pirazinamida requiere diagnosticarla para aplicar el tratamiento apropiado (Scorpio and Zhang 1996).

En animales, principalmente en bovinos esta especie causa la TB bovina (TBb), que se transmite a los humanos a través de productos cárnicos o lácteos de los animales enfermos. Personal en riesgo como los trabajadores de rastros, ranchos ganaderos y veterinarios se infectan con regularidad (Cosivi et al. 1998; Harris et al. 2007).

En 2015 la TB humana provocó 10.4 millones de casos nuevos y fue la segunda causa de muerte por infecciones en el mundo (World Health Organization 2016). Entre las especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) causantes de enfermedad predominan *M. tuberculosis* y *M. bovis*, seguidas de lejos por *M. africanum* (Reddington et al. 2011).

M. tuberculosis es transmitido de humanos a humanos y *M. bovis* principalmente de bovinos a humanos por contacto con los animales infectados o el consumo de productos cárnicos o lácteos (Cosivi et al. 1998; Harris et al. 2007). La TB humana por *M. bovis* frecuentemente tiene localización extrapulmonar y la resistencia del patógeno a la pirazinamida requiere identificarlo para aplicar el tratamiento adecuado (Scorpio and Zhang 1996).

La TB por *M. bovis* es un serio problema en México, pues en algunas cuencas lecheras su prevalencia en bovinos llega al 16.5% (SENASICA 2016). Recientemente se encontró además que en la ciudad de México *M. bovis* está

asociado al 26.6% de todas las formas de TB humana y al 16.6% de la forma pulmonar (Bobadilla-del Valle et al. 2015).

Las técnicas de PCR en tiempo real pueden diferenciar especies del CMTB de manera rápida y sensible en especímenes respiratorios y no respiratorios (Armand et al. 2011). Entre los marcadores que distinguen *M. tuberculosis* de *M. bovis* y otras especies del CMTB destacan las deleciones de las regiones genómicas de diferencia RD1, RD4 y RD9 (Pinsky and Banaei 2008).

Justificación

En México la prevalencia de la TB pulmonar y extrapulmonar por *M. bovis* es extraordinariamente alta. En una comunidad principalmente urbana de México se demostró recientemente una prevalencia de *M. bovis* del 26.6% en TB pulmonar y extrapulmonar humana y del 16.6% en TB pulmonar humana (Bobadilla-del Valle et al. 2015).

Para el tratamiento deben diferenciarse *M. tuberculosis* y *M. bovis*, las dos especies principales del CMTB que causan TB, pues *M. bovis* tiene resistencia natural a pirazinamida (Scorpio and Zhang 1996) y su resistencia a estreptomicina está aumentando (Bobadilla-del Valle et al. 2015).

El cultivo para el diagnóstico de TB es tardado y no distingue *M. bovis* de *M. tuberculosis*. Los métodos de PCR de punto final basados en las diferencias de secuencias genómicas que distinguen diversas especies del CMTB son sensibles, específicos y más rápidos que el cultivo, pero no se usan de manera rutinaria (Pinsky and Banaei 2008).

Nuevos métodos de qPCR más rápidos y sensibles simplificarían y acelerarían el diagnóstico de la TB por *M. bovis*.

Objetivo

Desarrollar un método de qPCR basado en la generación y desnaturalización térmica de amplicones de rDNA 16S y de tres regiones de diferencia del CMTB (RD1, RD4, RD9) que distinga *M. tuberculosis* y *M. bovis* y validarlo con cepas del CMTB aisladas de humanos y animales.

Etapas del trabajo

1. Diseñar y optimizar tres mezclas de qPCR (una uniplex, dos dúplex) en presencia del intercalante de DNA EvaGreen para diversas regiones genómicas del CMTB:
 - a. Preliminar, uniplex (para rDNA 16S)
 - b. D1, dúplex (para RD1+/RD9+),
 - c. D2, dúplex (para RD4+/RD4-).
2. Generar y caracterizar los amplicones rDNA 16S, RD1+, RD9+, RD4+ y RD4- clonados a partir de las cepas de referencia del CMTB (*MTB* H37Rv, *MB* AN5, *MB* BCG str. Mexico):
 - a. Tamaño
 - b. Secuencia
 - c. Perfil de desnaturalización térmica y valor de Tm.
3. Validar el método de genotipificación basado en desnaturalización térmica con el panel de cepas de micobacterias del InDRE.
4. Determinar la concordancia del nuevo método con cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* aisladas de casos de TB humana y bovina.

Material y métodos

Diseño del método

El método descrito en este trabajo se basa en la amplificación por qPCR multiplex de las regiones genómicas rDNA 16S, RD9, RD1 y RD4 en presencia del fluorocromo intercalante de DNA EvaGreen y la detección de cada producto generado mediante los picos (Tm) de las curvas de desnaturalización térmica.

El método consiste en una mezcla de reacción preliminar para amplificar un fragmento de la región rDNA 16S, que identifica al género *Mycobacterium*, seguida de dos reacciones dúplex sucesivas denominadas D1 y D2 para las regiones RD9+/RD1- y RD4+/RD4-.

La presencia/ausencia de los amplicones identifica la especie perteneciente al CMTB. El amplicón rDNA 16S indica pertenencia al género *Mycobacterium*, su

presencia junto con la ausencia de las otras regiones RD identifica micobacterias que no pertenecen al CMTB. La ausencia del amplicón rDNA 16S indica no pertenencia al género o DNA insuficiente. Para identificar la especie *M. tuberculosis*, además del amplicón de género, se requiere la amplificación de los productos RD9+ y RD4+; la identificación de *M. africanum*/*M. microti*/*M. caprae* requiere la presencia del producto RD4+; para *M. bovis* la del producto RD4-; RD1- y RD4- para la variante BCG.

Genomas de referencia

La secuencia de las regiones rDNA 16S, RD9, RD1-, RD4+ y RD4, así como el tamaño de los productos de amplificación y alineamiento de los oligonucleótidos para cada región fue verificado en los genomas de *M. tuberculosis* (H37Rv, NC_018143.2), *M. bovis* (subsp. bovis AF2122/97, BX248333.1) y *M. bovis* BCG (str. Mexico, CP002095.1).

Diseño de oligonucleótidos

Con el programa Premier 5 (Premier Biosoft) diseñamos oligonucleótidos que alinearan a 60°C, cuyo contenido de GC fuera mayor a 50%, que generasen productos de amplificación con tamaño diferente (100-500 pb) y Tm distinta.

Verificamos la secuencia de los oligonucleótidos por alineamiento Blastn con los genomas de las cepas mencionadas anteriormente y realizamos PCR *in silico* con Fast PCR (Primer digital). Determinamos los valores de Tm de los amplicones con el algoritmo de la Universidad de Utah (<https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html>).

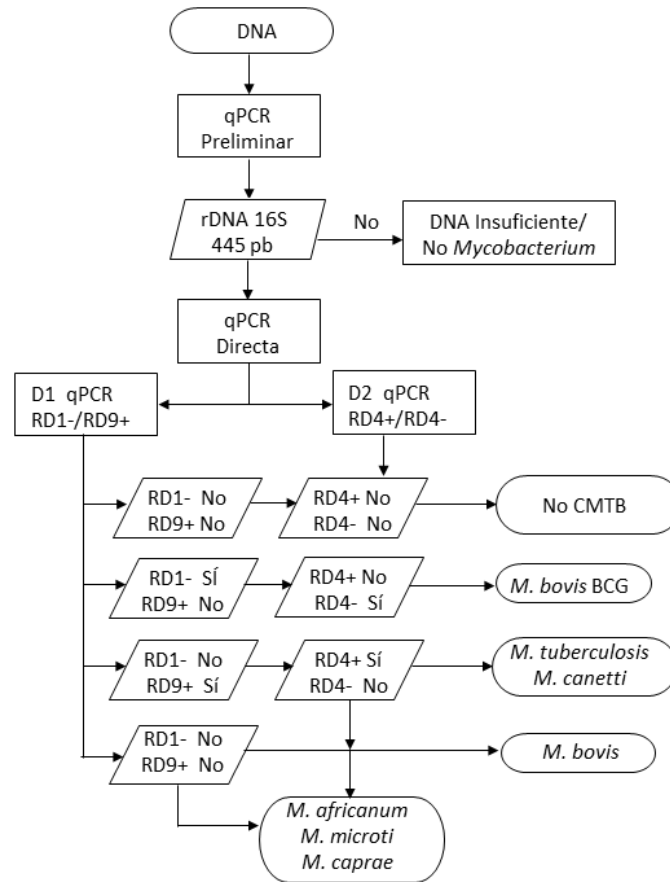


Fig. 2. Algoritmo para el análisis de los perfiles de desnaturalización térmica de muestras sospechosas de tuberculosis humana y bovina

qPCR preliminar, ensayo uniplex para el amplicón de rDNA 16S que identifica el género *Mycobacterium*. D1 qPCR y D2 qPCR, ensayos dúplex simultáneos para las parejas de amplicones RD1-/RD9+ y RD4+/RD4-, respectivamente, para determinar los genotipos del CMTB basados en la presencia/ausencia de los amplicones RD evaluados.

Cepas de referencia

En la validación experimental usamos DNA y lisados de las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG str. Mex y *M. bovis* AN5. Donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de San Luis Potosí y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Querétaro, México).

Productos de amplificación

Para validar el tamaño de cada producto de amplificación, realizamos mezclas de PCR uniplex de punto final con cada pareja de oligonucleótidos. Cada amplicón fue generado a partir de DNA de las tres cepas de referencia.

Las mezclas de PCR uniplex de 25 μ L contenían: dNTPs 200 nM c/u; MgCl₂ 2 mM), 1 μ L de DNA ($\sim 10^6$ copias genómicas de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5 o *M. bovis* BCG str. Mexico); pareja de oligonucleótidos específica para cada amplicón (250 nM c/u); con amplificación por 35 ciclos.

Parejas de oligonucleótidos en cada mezcla uniplex:

- Para rDNA 16S: 16S F / 16S R.
- Para RD4+: PB-RD4+ F / RD4+ R.
- Para RD4-: PB-RD4+ F / RD4- R.
- Para RD9+: RD9 F/RD9 R
- Para RD1-: PB-RD1 F/PB-RD1-

Realizamos la electroforesis en geles de SB-agarosa al 2% calibrados con una escalera de 100 pb (Seegene) y los teñimos con bromuro de etidio (1 μ g/mL). El tamaño de cada amplicón fue determinado con el software QuantityOne (BioRad, Hercules, CA).

Clonación de los cinco amplicones de interés

Para generar construcciones con cada amplicón y usarlas como controles positivos, amplificamos cada producto de PCR y los purificamos con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega. Los amplicones rDNA 16S, RD9+, RD1-, RD4- y

RD4+ fueron insertados en pGEM-T Easy en las mezclas de ligación respectivas, con las cuales

Transformamos cepas de *E. coli* TOP10 o *E. coli* JM109 por choque térmico o electroporación. Las mezclas de transformación fueron incubadas en agar selectivo (LB-Cb-IPTG-XGal o/n a 37°C. Seleccionamos cepas Amp^R Lac⁻ (colonias blancas) mediante dos pases sucesivos de colonias aisladas en agar selectivo.

Realizamos PCR de colonia de las clonas candidato, con asa microbiológica: tomamos una colonia que resuspendimos en 100 µl de agua MilliQ estéril, la lisamos a 95°C por 15 min, agregamos 2 µl de este lisado a la mezcla de PCR (dNTPs 200 nM c/u, MgCl₂ 2 mM, oligonucleótidos iniciadores 250 nM c/u) amplificada por 35 ciclos.

Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en un gel SB-agarosa 2% con escalera de 100 pb (Seegene), teñidos con bromuro de etidio (1 µg/mL). El tamaño de cada amplicón fue determinado con el software QuantityOne (BioRad, Hercules, CA).

Caracterización de los insertos

Realizamos minipreparaciones de los plásmidos de las transformantes candidato por lisis alcalina (Ehrt and Schnappinger 2003).

La presencia de los insertos fue determinada mediante amplificación por PCR en las condiciones descritas; liberación de los insertos por digestión con *Eco* RI (New England. BioLabs) y secuenciación de los amplicones con el método de Sanger en el Secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Optimización del contenido de oligonucleótidos

Preparamos mezclas de qPCR uniplex de 20 µL, ya descritas anteriormente, con DNA de pDZ101, pHE102, pDZ205, pDZ107, pDZ108, pDZ110 (10⁶ copias) y concentraciones variables de oligonucleótidos (50-300 nM). Los controles negativos (NTC) no contenían DNA. Las mezclas fueron amplificadas por 30 ciclos y los productos de PCR verificados en geles de SB-agarosa al 2%.

Para determinar la concentración óptima de cada pareja de oligonucleótidos comparamos: 1) los valores del ciclo umbral (Cq) de las mezclas con o sin DNA y la altura de los picos de los amplicones en los perfiles de desnaturalización térmica.

Desnaturalización térmica de los productos de amplificación

Con los amplicones obtenidos de las construcciones y con el DNA de las cepas de referencia como controles positivos, realizamos mezclas por triplicado de qPCR uniplex de 20 μ L con dNTPs 200 nM c/u, $MgCl_2$ 2 mM, EvaGreen 1 \times (Jena Bioscience), 1 μ L de DNA (5×10^6 copias de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AN5, *M. bovis* BCG str. México o los plásmidos con cada inserto), y con la concentración de oligonucleótidos óptima para cada amplicón.

La amplificación se llevó a cabo en las siguientes condiciones en el RotorGene 6000 (Corbett LIFE SCIENCE): desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; 30 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 15 s, alineamiento a 60 °C por 30 s extensión a 72 °C por 50 s. Con registro de fluorescencia en los pasos de extensión.

Desnaturalización térmica de 80 °C hasta 99 °C de las mezclas amplificadas, con acondicionamiento pre-desnaturalización de 90 s en el primer paso, incrementos de 1 °C en cada paso y tiempo de espera de 10 s entre pasos.

Analizamos el perfil de desnaturalización térmica de cada amplicón de acuerdo a la gráfica de disminución de fluorescencia en función del aumento de temperatura (-dF/dT) con el Software Rotor-Gene 6000 version 1.7. El valor de Tm asignado a cada amplicón corresponde a la temperatura del pico de su perfil de desnaturalización y nos permite identificar presencia/ausencia de cada región genómica así como determinar la pertenencia al género *Mycobacterium*, pertenencia al CMTB y diferenciar a las especies *M. tuberculosis* o *M. bovis*.

Genotipificación de las cepas del panel del InDRE y de aislados de casos de tuberculosis humana y bovina

Analizamos muestras de DNA de las cepas de micobacterias del panel del InDRE y de 13 cepas del CMTB de la colección de nuestro laboratorio para determinar el

perfil de desnaturalización térmica y el valor de Tm de cada amplicón en las mezclas “preliminar”, D1 y D2, con las condiciones de amplificación ya descritas.

Con la Tm de cada amplicón identificamos el genotipo de cada lisado que comparamos con el genotipo determinado por el InDRE por espoligotipificación. Con estos datos calculamos el coeficiente de variación y la concordancia entre ambos métodos.

Las mezclas de amplificación fueron sujetas a desnaturalización térmica y electroforesis en geles de SB-agarosa al 2%.

Resultados

Diseño y selección de oligonucleótidos

Seleccionamos la pareja de oligonucleótidos 16S F/16S R complementaria a la región rDNA 16S de los genomas de las tres cepas de referencia con las siguientes características: Tm ~60 °C y contenido de GC = 57.1% y 57.9%. Esta pareja generaría un amplicón de 445 pb en las tres cepas de referencia (Tabla 1).

Para la mezcla D1, elegimos una pareja: RD9 F/RD9 R con Tm ~60 °C, contenido de GC > 57.1 y 68.4%, complementaria a la región RD9 del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, que generaría el amplicón RD9+ de 361 pb. Para amplificar la región RD1- seleccionamos la pareja de oligonucleótidos: PB-RD1 F/PB-RD1- R de Pinsky y Banaei (2008) cuyo contenido de GC es ~50% y con Tm ~55 °C, estos oligonucleótidos generan un producto de 222 pb, en el genoma de *M. bovis* BCG (Tabla 1).

En la mezcla D2, para generar los amplicones de las regiones de diferencia RD4+ y RD4- que distinguen *M. tuberculosis* de *M. bovis* y *M. bovis* BCG, decidimos emplear sólo tres oligonucleótidos. Uno forward común de Pinsky y Banaei (Pinsky and Banaei 2008), aquí llamado PB-RD4+ F y dos reversos específicos para RD4+ y RD4-, respectivamente. El oligonucleótido reverso para RD4+: RD4+ R con contenido de GC = 57.1% y Tm = 58.7 °C. El reverso para RD4-: RD4- R con GC = 55% y Tm = 57.8 °C (Tabla 1). Los tres oligonucleótidos generarían dos amplicones, uno de 401 pb para RD4+ y otro de 172 pb para RD4- (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados

Oligonucleótidos					Referencia
Pareja	Nombre	Secuencia (5' → 3')	% GC	Tm °C	
16S	16S F ^a	TGGGCAGTAACTGACGCTGAG	57.1	59.3	Este trabajo.
	16S R ^a	ACCTTCCTCCGAGTTGACC	57.9	56.6	Este trabajo.
RD9	RD9 F ^a	ATCAGGGTGGAGCCGATACCA	57.1	60.2	Este trabajo.
	RD9 R ^a	GCTTCCCCGGTTCGTCTGG	68.4	61.0	Este trabajo.
RD1	PB-RD1 F ^b	GGATTTGACGTCGTGCTTCT	50.0	55.4	Pinsky y Banaei (2008).
	PB-RD1 R ^b	TTCAACGGGTTACTGCGAAT	45.0	54.6	Pinsky y Banaei (2008).
RD4-	PB-RD4 F ^b	AGAAGCGCAACTCTTGGA	50.0	56.9	Pinsky y Banaei (2008).
	RD4- R ^a	ACCCCAAAGGAGCACCATC	55.0	57.8	Este trabajo.
RD4+	PB-RD4 F ^b	AGAAGCGCAACTCTTGGA	50.0	56.9	Pinsky y Banaei (2008).
	RD4+ R ^a	TGTGGCTATGGGGCTCTACTG	57.1	58.7	Este trabajo.

^a Sintetizados por Sigma-Aldrich.

^b Sintetizados por Elim Biopharmaceuticals

Validación de las parejas de oligonucleótidos

En cada mezcla uniplex obtuvimos los cinco amplicones con los tamaños esperados (Tabla 2). El amplicón para rDNA 16S de 445 pb a partir de las tres cepas de referencia. Amplicón para RD9+ de 361 pb sólo con *M. tuberculosis* H37Rv. Producto para RD1-, con 222 pb sólo con *M. bovis* BCG str. México. Y los productos RD4+ de 401 pb sólo con *M. tuberculosis* H37Rv y el de RD4- de 172 pb con *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG str. México.

Clonación de los cinco amplicones de interés

Obtuvimos y seleccionamos seis clonas candidato que amplifican los plásmidos derivados de pGEM-T Easy con los insertos de interés: DZ101 (rDNA 16S), HE102 (RD9+), DZ205 (RD1-), DZ110 (RD4+), DZ107 (RD4-) y DZ108 (RD4-), mediante PCR de colonia.

Caracterización de los insertos clonados

Los tamaños de los insertos amplificados y liberados con *Eco* RI de las construcciones indicadas a continuación tuvieron los tamaños esperados:

Inserto rDNA 16S en pDZ101 (445 pb).

Inserto RD9+ en pHE102 (361 pb).

Inserto RD1- en pDZ205 (222 pb).

Inserto RD4+ en pDZ110 (401 pb).

Inserto RD4- en pDZ107 y pDZ108 (172 pb).

Las secuencias de los insertos tuvieron similitud del 98.8% al 100% con las secuencias respectivas de las tres cepas de referencia (Tabla 3).

Optimización de la concentración de los oligonucleótidos

Para el amplicón rDNA 16S: oligonucleótidos 16S F/16S R en mezclas con DNA la concentración de 100 nM fue seleccionada por tener la mayor diferencia entre el valor de Cq de las mezclas sin DNA (NTC) y con DNA: $\Delta Cq = 21.2$, presentó un pico único a $T_m = 90.5$ °C con $h_{max} = 31.47$ RFU. La mezcla sin DNA no generó pico de desnaturalización.

Para el producto de RD9+ los oligonucleótidos RD9 F/RD9 R en la concentración de 250 nM tuvieron un $\Delta Cq = 5.38$ y $h_{max} = 31.71$ RFU. Esta concentración fue seleccionada en lugar de 300 nM porque su ΔCq y h_{max} fueron mayores. En la mezcla sin DNA no se observó señal de fluorescencia.

Los oligonucleótidos para el amplicón RD1-, los oligonucleótidos PB-RD1 F/PB-RD1-, en mezclas con DNA y a 300 nM tuvieron un $\Delta Cq = 18.49$ y $h_{max} = 30.52$ RFU esta concentración fue seleccionada para posteriores mezclas de amplificación. La mezcla sin DNA no tuvo señal de fluorescencia.

Para el amplicón RD4+, los oligonucleótidos PB-RD4+ F/RD4+ R a una concentración 200 nM, en mezclas con DNA, tuvieron un $\Delta Cq = 16.41$, $T_m = 92.5$ °C, $h_{max} = 26.18$ RFU. En las mezclas sin DNA no hubo señal de fluorescencia.

Finalmente, para el amplicón RD4-, con los oligos PB-RD4+ F/RD4- R a concentración 200 nM, se obtuvo un $\Delta Cq = 11.27$, $T_m = 90.5$; $h_{max} = 30.29$ RFU. En las mezclas sin DNA no hubo pico de desnaturalización (Tabla 4).

Desnaturalización térmica de los productos de amplificación

El valor de T_m del amplicón rDNA 16S fue de 90.5 °C con pDZ101 y DNA de las tres cepas de referencia (Tabla 5, Fig. 3).

Para el amplicón RD9+ la T_m fue de 94.2 °C con pHE102 y de 94.3 °C con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. Mientras que el amplicón RD1- tuvo una T_m a 92.7 °C con pDZ205 y de 93 °C con DNA de *M. bovis* BCG (Tabla 5, Fig. 4).

Las mezclas RD4+ mostraron un solo pico con una T_m a 91.8 °C con pDZ110 y DNA de *M. tuberculosis* H37Rv y las mezclas para RD4- tuvieron T_m a 90.0 °C con pDZ107, 90.3 °C con pDZ108, 90.5 °C con DNA de *M. bovis* BCG y a 90.3 °C con DNA de *M. bovis* AN5 (Tabla 5, Fig. 5).

Tabla 2. Amplicones esperados y coordenadas de las parejas de oligonucleótidos en el genoma

Oligonucleótidos		Amplicones		
Pareja	Componentes	Nombre	Tamaño	Posición en el genoma
16S	16S F/16S R	rDNA 16S	445 pb	<i>M. tuberculosis</i> H37 Rv Nucleótidos 1472582-1473026 (GenBank GI:561108321)
RD1	PB-RD1 F/PB-RD1 R	RD1-	222 pb	<i>M. bovis</i> BCG <i>str.</i> Mexico Nucleótidos 4298541-4298762 (GenBank CP002095.1)
RD9	RD9 F/RD9 R	RD9+	361 pb	<i>M. tuberculosis</i> H37 Rv Nucleótidos 2329898-2330258 (GenBank GI:561108321)
RD4+	PB-RD4 F/RD4+ R	RD4+	401 pb	<i>M. tuberculosis</i> H37 Rv Nucleótidos 1696001-1696401 (GenBank GI:561108321)
RD4-	PB-RD4 F/RD4- R	RD4-	172 pb	<i>M. bovis</i> BCG <i>str.</i> Mexico Nucleótidos 1691347-1691518 (GenBank GI:356592064)

Tabla 3. Secuencias de los insertos

Inserto	Secuencia (5' → 3')
rDNA 16S (445 pb)	TGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTCCTTGGGATCCGTGCC GTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGG AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGA ACCTTACCTGGGTTTGACATGCACAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCCTTGTGGCCT GTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCTTGTCTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGAC TGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGT
RD1- (226 pb)	GGATTTGACGTCGTGCTTCTGGTCGACGATTGGCACATCCAGCCGCCCGGATCCAGCATC TGTCTGGCATAGCTGCCCGTCCGGCTGGTAATACTCATCCCCTACTGCCCTCCCAAACC GCCAGATCGCCTCGCGGATCACCGTCCGGTTGGCTCCGGCATTTCACGCCGGCTCGGCC GCTGGATCCACCCCGCGCCGGTATTCGAGTAACCCGTTGAA
RD9 (361 pb)	ATCAGGGTGGAGCCGATACCAATGCAACAACGGGTGCGCCGCTGGCAACCACGTGTAGGTCA GCCCCATCCGGTGACAGGCCTTGACCCGCGGGCAGCATCGGCGTCCGCCACTCCAGCGC TCGGCGGTGACGGTATCGTTCGAGCAGGGCAAGTTGCCGTTTCGAGCCGTAATACTGTG GCCCTGCGCAATTCGAGCGAGAATGCTCGGAGAGACCGGTATGCCGTCGGCGCCGATC CCGACAACGATGATCATCGGCGCCGCTCTCCCCGCAAGCGGGCGGTACCCCCACCGCAT CGCTGCGCTCTGCATCGTTCGCGGATCATCGCGGCATCCTGCGCCAGACGAACCGGGGAAG C
RD4+ (402 pb)	TGTGGCTATGGGGCTCTACTGACTACCTAAAATGCGCGTGGCTTCAAACTGATTACAC CGGCATCGACGTCTCCCCGAAATGGTGCAGCGCGCCGCTCTACGTTTCGAAGGTCGGGC GAACGCAGACTTCATCTGCGCGGCGCGCATAGATCGGGAGGCGGACTATAGCGTCGCGAG TGGAATATTCAATGTTGCTCTGAAATCGTTGGACACGGAATGGTGCCTCACATCGAAGC GACGCTCGACATGCTGAATGCCGCGAGTCGCCGTGGCTTCTCTTTAATTGCCTGACATC TTATTCCGATGCACCAAAGATGCGCGACGACCTGACTATGCTGACCCATGCGCCCTATT TGATCTCTGCAAGCGCAGGTACTCCAAGAGTGTTGCGCTTCT
RD4- (172 pb)	ACCCAAAAGGAGCACCATGTCACCTTAGTGGGACGCTACTACGGCACGGCGCGCCC CGTAGCGTTACTGAGAAATTGCTGAAAAATGGCTATTGACCAGCTAAGATATCCGGTACG CCCGCGCCGCGGAGAGCGCCGTTGTAGCCACCCAAGAGTGTTGCGCTTCT

Tabla 4. Concentraciones de oligonucleótidos optimizadas

Mezcla	Amplicón	Oligonucleótido	
		Nombre	Concentración
Preliminar	16S rDNA	16S F/16S R	100 nM
D1	RD1-	PB-RD1 F/PB-RD1 R	300 nM
	RD9+	RD9 F/RD9 R	250 nM
D2	RD4+	PB-RD4 F/RD4+ R	200 nM
	RD4-	PB-RD4 F/RD4- R	200 nM

Mezclas de PCR (20 μ L) con MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0.2 mM c/u, Taq DNA pol 0.1 U, EvaGreen 1 \times .

Tabla 5. Valores de Tm de los amplicones en las cepas de referencia y en los insertos

Amplicón	Cepas de referencia				Construcciones (insertos)						
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. bovis</i> AN5	<i>M. bovis</i> BCG	16S rDNA	pDZ101 (16S rDNA)	pDZ205 (RD1-)	pHE102 (RD9+)	pDZ110 (RD4+)	pDZ107 (RD4-)	pDZ108 (RD4-)	
16S rDNA	90.5 °C	90.5 °C	90.5 °C	90.5 °C	90.5 °C	ND	ND	ND	ND	ND	
RD9+	94.3 °C	ND	ND	ND	ND	ND	94.2 °C	ND	ND	ND	
RD1-	ND	ND	93.0 °C	ND	ND	92.7	ND	ND	ND	ND	
RD4+	91.8 °C	ND	ND	ND	ND	ND	91.8 °C	ND	ND	ND	
RD4-	ND	90.3 °C	90.5 °C	ND	ND	ND	ND	90.1	90.3 °C		

ND, no detectado.

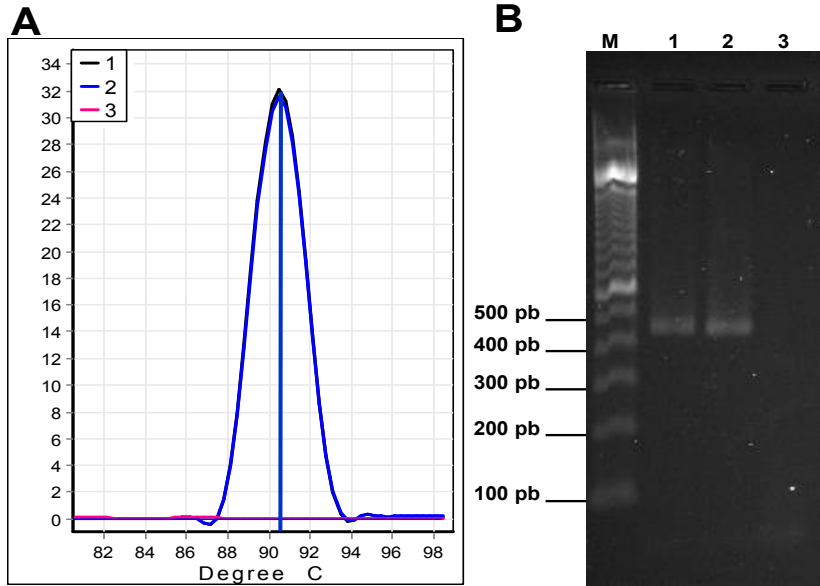


Fig. 3. Perfiles de desnaturalización térmica y electroferograma de los amplicones de rDNA 16S de referencia

Mezclas de qPCR para los amplicones rDNA 16S (445 pb). (A) Patrones de desnaturalización de los amplicones rDNA 16S. 1, línea negra, mezcla con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv ($T_m = 90.5\text{ }^{\circ}\text{C}$). 2, línea azul, mezcla con DNA de pDZ101 ($T_m = 90.5\text{ }^{\circ}\text{C}$). 3, línea rosa, mezcla NTC (sin DNA). (B) Electroferograma de los amplicones rDNA 16S. M, escalera de 100 pb. Carril 1, mezcla con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 2, mezcla con DNA de pDZ101. Carril 3, mezcla NTC (sin DNA).

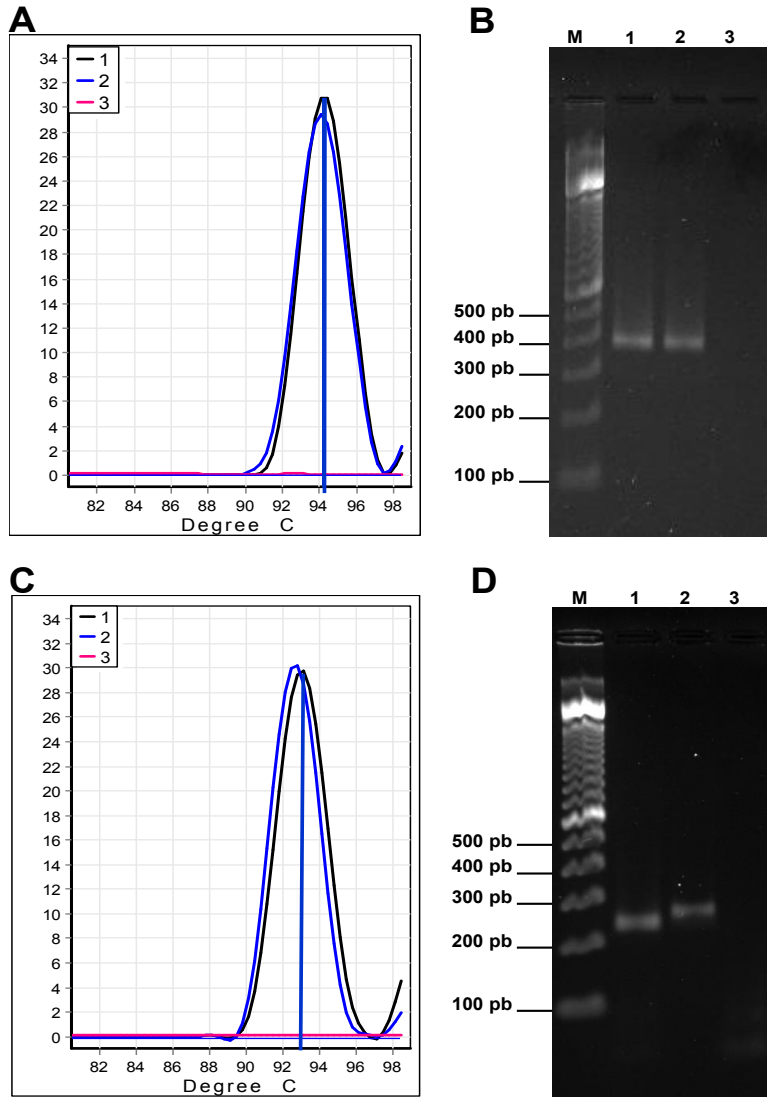


Fig. 4. Perfiles de desnaturalización térmica y electroferogramas de los amplicones RD9+ y RD1- de referencia

Mezclas de qPCR uniplex para los amplicones RD9+ y RD1. (A) Desnaturalización de los amplicones RD9+. 1, línea negra, mezcla con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv ($T_m = 94.3\text{ }^\circ\text{C}$). 2, línea azul, mezcla con DNA de pHE102 ($T_m = 94.2\text{ }^\circ\text{C}$). 3, línea rosa, mezcla NTC (sin DNA). (B) Electroferograma de los amplicones RD9+. M, escalera de 100 pb. Carril 1, mezcla con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 2, mezcla con DNA de pHE102. Carril 3, mezcla NTC (sin DNA). (C) Desnaturalización de los amplicones RD1-. 1, línea negra, mezcla con DNA de *M. bovis* BCG ($T_m = 93.0\text{ }^\circ\text{C}$). 2, línea azul, mezcla con DNA de pDZ205 ($T_m = 92.7\text{ }^\circ\text{C}$). 3, línea rosa, mezcla NTC (sin DNA). (D) Electroferograma de los amplicones RD1-. M, escalera de 100 pb. Carril 1, mezcla con DNA de *M. bovis* BCG. Carril 2, mezcla con DNA de pDZ205. Carril 3, mezcla NTC (sin DNA).

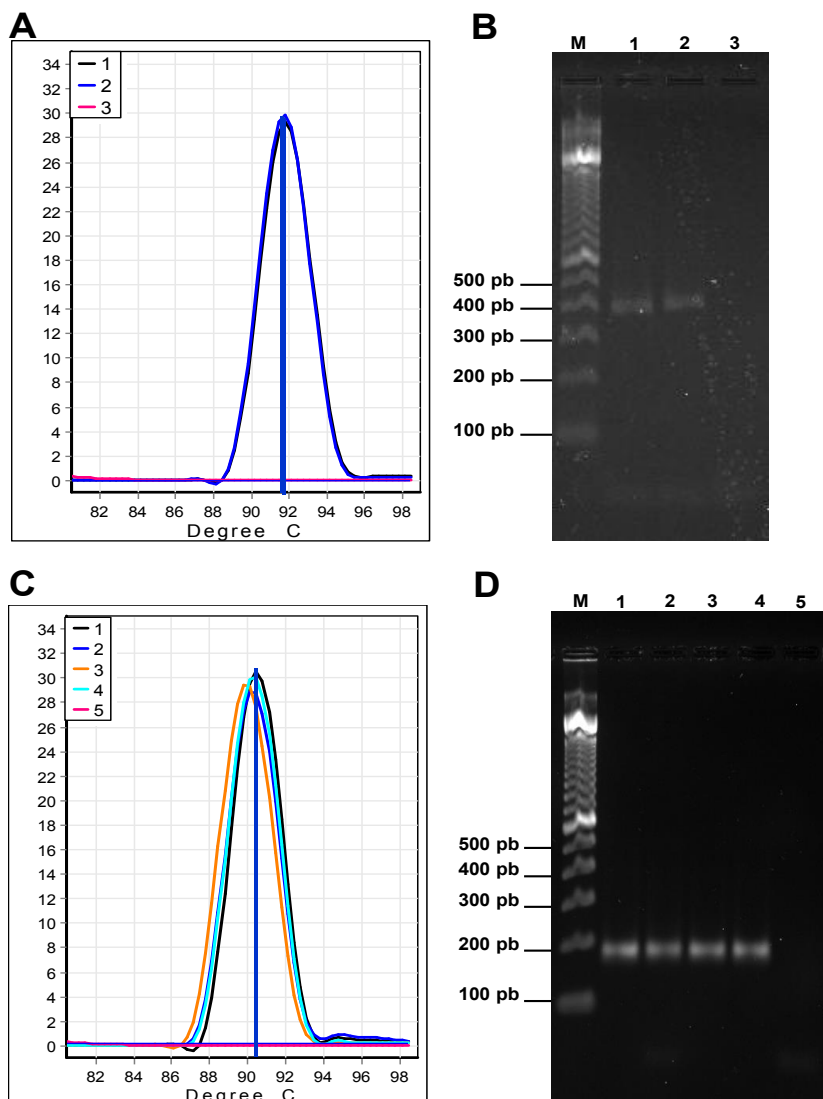


Fig. 5. Perfiles de desnaturalización térmica y electroferogramas de los amplicones RD4+ y RD4- de referencia

Mezclas de qPCR uniplex para los amplicones RD4+ y RD4-. (A) Desnaturalización de los amplicones RD4+. 1, línea negra, mezcla con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv ($T_m = 91.8^\circ\text{C}$). 2, línea azul, mezcla con DNA de pDZ110 ($T_m = 91.8^\circ\text{C}$). 3, línea rosa, mezcla NTC (sin DNA). (B) Electroferograma de los amplicones RD4+. M, escalera de 100 pb. Carril 1, mezcla con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 2, mezcla con DNA de pDZ110. Carril 3, NTC (sin DNA). (C) Desnaturalización de los amplicones RD4-. 1, línea negra, mezcla con DNA de *M. bovis* BCG ($T_m = 90.5^\circ\text{C}$). 2, línea azul, mezcla con DNA de *M. bovis* AN5 ($T_m = 90.3^\circ\text{C}$). 3, línea naranja, mezcla con DNA de pDZ107 ($T_m = 90.1^\circ\text{C}$). 4, línea aguamarina, mezcla con DNA de pDZ108 ($T_m = 90.3^\circ\text{C}$). 5, línea rosa, NTC (sin DNA). (D) Electroferograma de los amplicones RD4-. M, escalera de 100 pb. Carril 1, mezcla con DNA de *M. bovis* BCG. Carril 2, mezcla con DNA de *M. bovis* AN5. Carril 3, DNA de pDZ107. Carril 4, DNA de pDZ108. Carril 5, NTC (sin DNA).

Identificación de las muestras del panel de InDRE

La identidad de las 50 cepas del panel de micobacterias del InDRE inicialmente fue ciega y se abrió al concluir la determinación de los genotipos derivados de los patrones de desnaturalización térmica de todas las muestras. En las mezclas preliminares, cuarenta y cuatro muestras (88.0%) fueron positivas para rDNA 16S, seis muestras (12.0%) negativas para rDNA 16S. Estas últimas fueron excluidas por no contener DNA de calidad o en cantidad suficiente.

En los cuarenta y cuatro amplicones rDNA 16S de 445 pb, obtuvimos una T_m promedio \pm DE = 90.77 ± 0.36 °C (CV = 0.40%). En las mezclas D1, ninguna fue RD1- positiva, 17 fueron RD9+ positivas con $T_m = 93.70 \pm 0.76$ °C (CV = 0.81%). En las mezclas D2, 22 cepas fueron positivas para RD4+, con $T_m = 91.55 \pm 0.26$ °C (CV = 0.28%) y 17 fueron positivas para RD4- con $T_m = 89.64 \pm 0.31$ °C (CV = 0.35%) (Tabla 6).

Las especies de micobacterias asignadas a las 44 cepas del panel que fueron incluidas en el estudio forman dos grupos: CMTB y MNTB. El grupo CMTB está constituido por 39 cepas: 23 asignadas a *M. tuberculosis* (MTB) y 16 a *M. bovis* (MB) (Tabla 7). El grupo MNTB está constituido por cinco cepas de diferentes especies.

Los genotipos obtenidos por nosotros y la concordancia de acuerdo con el genotipo determinado por el InDRE, se describen a continuación. Encontramos que las 44 cepas corresponden a dos grupos, complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) y *Mycobacterium* No Tuberculosis (MNTB). Encontramos, en el grupo CMTB, 17 MTB (73.9%) y cinco MA (21.7%). Solamente una cepa asignada a MTB tuvo genotipo MB discordante (4.3%). Hubo concordancia absoluta en todos los genotipos de las 16 cepas asignadas a MB y en los de las cinco cepas asignadas a MNTB (Tabla 8, Fig. 6).

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) fueron del 100% para la identificación del género *Mycobacterium*.

Tabla 6. Valores de Tm de los amplicones en el panel del InDRE

Amplicón		Tm promedio \pm DE (CV) ^a
Nombre	n	
16S rDNA	44	90.77 \pm 0.36 °C (0.40%)
RD1-	0	0
RD9	17	93.70 \pm 0.76 °C (0.81%)
RD4+	22	91.55 \pm 0.26 °C (0.28%)
RD4-	17	89.64 \pm 0.31 °C (0.35%)

^a DE, desviación estándar. CV, Coeficiente de variación = (DE/Tm promedio) \times 100.

Tabla 7. Concordancia entre la identidad asignada a las cepas del panel y el genotipo derivado del patrón de amplicones

No.	Panel del IndRE			Amplicones					Concordancia panel/genotipo			
	Clave	Muestra	Fuente	IDI	RDNA 16S	RD9+	RD1-	RD4+	RD4-	IDG	Género	Especie
1	288	H37Rv (DNA)	Referencia	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
2	95	Chih841	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
3	201	Chih239	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
4	210	Chis1867	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
5	386	Sin272	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
6	446	Mex1026	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
7	510	Mex580	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
8	583	Sin600	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
9	725	Gto1568	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
10	815	Sin1296	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
11	877	Chih1428	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
12	880	Sin1200	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
13	917	Chih1801	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
14	923	Qro983	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
15	951	BC530	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
16	976	Oax1841	Humano	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
17	990	Jal1257/15	Humano XDR	MTB	1	1	0	1	0	MTB	Sí	Sí
18	40	Mor502	Humano	MTB	1	0	0	1	0	MA	Sí	Sí ^a
19	46	BC241	Humano	MTB	1	0	0	1	0	MA	Sí	Sí ^a
20	48	Jal1257/15	Humano XDR	MTB	1	0	0	1	0	MA	Sí	Sí ^a
21	244	Gro1607	Humano	MTB	1	0	0	1	0	MA	Sí	Sí ^a
22	547	Gro1887	Humano	MTB	1	0	0	1	0	MA	Sí	Sí ^a
23	64	Vs8512	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
24	80	Vs672	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
25	162	Vs1371	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
26	163	Vs8514	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
27	169	Vs79921	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
28	188	Vs8512	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
29	451	Vs1608	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí

No.	Panel del IndRE				Amplificones						Concordancia panel/genotipo	
	Clave	Muestra	Fuente	IDI	rDNA 16S	RD9+	RD1-	RD4+	RD4-	IDg	Género	Especie
30	538	Vs8571	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
31	548	Vs8728	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
32	596	NL602	Humano XDR	MTB	1	0	0	0	1	MB	Sí	No ^b
33	620	Vs1919	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
34	640	Vs1985	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
35	661	Vs3513	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
36	704	Vs8571	Vacuno	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
37	782	M. bovis 5129	Referencia	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
38	851	M. bovis 04	Humano	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
39	906	M. bovis 38	Humano	MB	1	0	0	0	1	MB	Sí	Sí
40	65	M. terrae	Referencia	MNTB	1	0	0	0	0	MNTB	Sí	Sí
41	352	M. chelonae	Referencia	MNTB	1	0	0	0	0	MNTB	Sí	Sí
42	733	M. simiae	Referencia	MNTB	1	0	0	0	0	MNTB	Sí	Sí
43	794	M. intracellulare	Referencia	MNTB	1	0	0	0	0	MNTB	Sí	Sí
44	850	M. chelonae	Referencia	MNTB	1	0	0	0	0	MNTB	Sí	Sí

^a La genotipificación tuvo mayor resolución que la espoligotipificación para identificar especies del CMTB, pues entre las cepas asignadas a MTB identificó a cinco como MA; éstas fueron consideradas como de la misma especie en la estimación de concordancia de ambos métodos.

^b Única cepa considerada como discordante: asignada a MTB, pero con genotipo MB.

Tabla 8. Genotipos identificados y concordancia con el panel del InDRE

Panel InDRE		n (%)	Genotipo				Concordancia	
			<i>MTB</i>	<i>MA</i> ^b	<i>MB</i>	<i>MNT</i> ^c	Género n (%)	Especie n (%)
CMTB	<i>MTB</i>	23 (52.3)	17	5	1	0	23 (100.0)	22 ^d (95.7)
	<i>MB</i>	16 (36.4)	0	0	16	0	16 (100.0)	16 (100.0)
MNT		5 (11.4)	0	0	0	5	5 (100.0)	5 (100.0)
Total		44 (100.0)	17	5	17	5	44 (100.0)	43 (97.7)

^a *MTB*, *M. tuberculosis*. *MB*, *M. bovis*. *MNT*, *Mycobacterium* no-*MB*.

^b *MA*, *M. africanum*/*M. caprae*/*M. microtii*.

^c Muestras que solo generaron el amplicón 16S rDNA.

^d 17 cepas con genotipo *MTB* y cinco con genotipo *MA*.

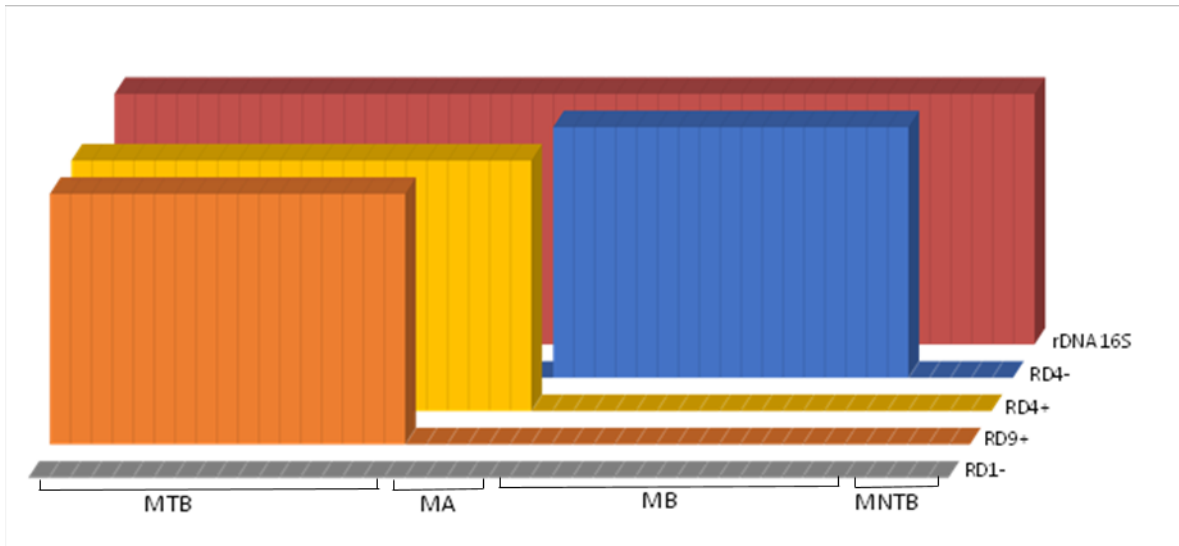


Fig. 6. Genotipos identificados a partir de los patrones de desnaturalización térmica de los amplicones de las 44 muestras del panel incluidas

MA, *M. africanum* (n = 5). MB, *M. bovis* (n = 17). MTB, *M. tuberculosis* (n = 17). MNTB, *Mycobacterium* no-CMTB (n = 5).

Identificación de 13 cepas del CMTB aisladas de casos de tuberculosis humana y bovina

Los amplicones de todos los controles positivos y las muestras problema de esta etapa fueron verificados por su tamaño en geles de agarosa (Fig. 7).

Las 13 cepas del CMTB aisladas de infecciones humanas y bovinas generaron amplicones de rDNA 16S con valores de T_m de 90.5 °C. En las mezclas D1, ocho de las 10 cepas de infecciones humanas generaron amplicones de 361 pb con valores de T_m de 94.3 °C (Fig. 8). En las mezclas D2, ocho de las 10 cepas de infecciones humanas generaron amplicones de 401 pb con T_m de 91.7 °C. Una cepa de origen humano y las tres de origen bovino generaron amplicones de 172 pb con T_m de 90.5 °C (8).

Los genotipos de los 10 casos de TB pulmonar humana y los tres de TB bovina coincidieron en 12 (92.3%), correspondientes a ocho de los nueve aislados asignados a MTB (88.9%) y a los cuatro asignados a MB (100.0%) (Tabla 9, Fig. 9).

Tabla 9. Concordancia y genotipos identificados en las 13 cepas del CMTB

Cepa		Genotipos ^a			Concordancia	
					Género	Especie
Identidad	n (%)	<i>MTB</i>	<i>MB</i>	<i>MNT</i>	n (%)	n (%)
<i>MTB</i>	9 (69.2)	8	0	1 ^b	9 (100.0)	8 (88.9)
<i>MB</i>	4 (30.8)	0	4	0	4 (100.0)	4 (100.0)
Total	13 (100.0)	8	4	1	13 (100.0)	12 (92.3)

^a *MTB*, *M. tuberculosis*. *MB*, *M. bovis*. *MNT*, *Mycobacterium* no-tuberculosis.

^b Cepa con amplicón 16S rDNA.

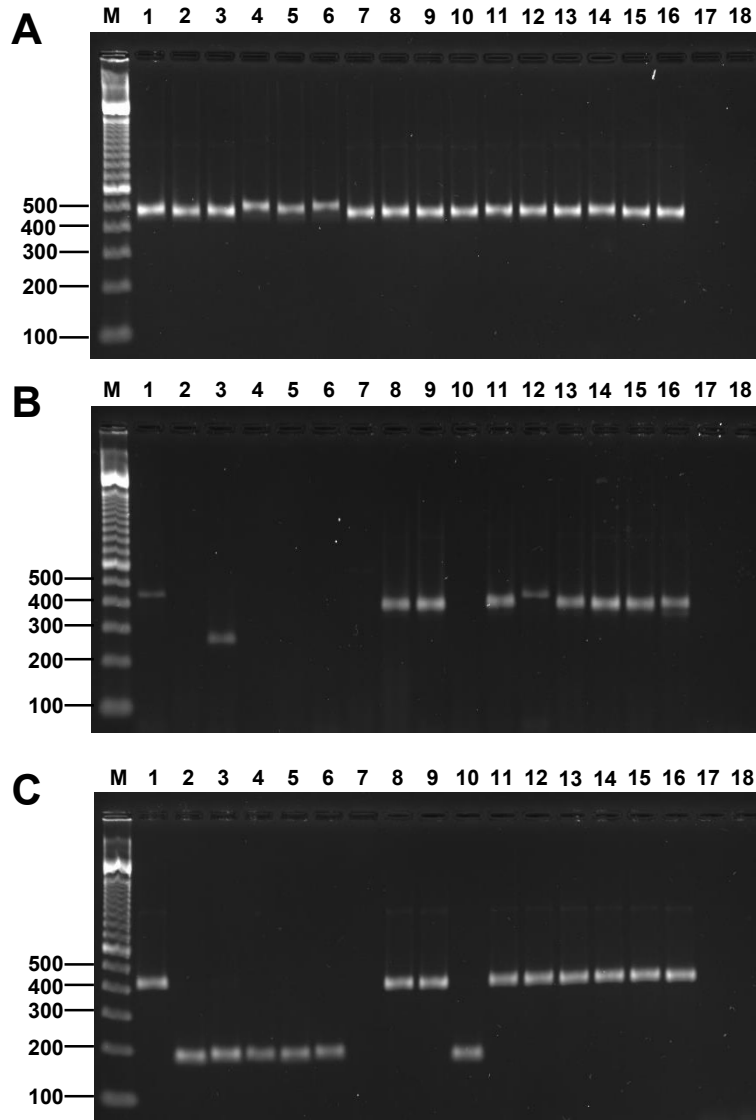


Fig. 7. Electroferogramas de los amplicones generados en las mezclas de qPCR de los 13 aislados de TB humana y bovina

Los carriles de los tres electroferogramas muestran las bandas de mezclas con DNA de la misma fuente. M, escalera de 100 pb. Carril 1, DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 2, DNA de *M. bovis* AN5. Carril 3, DNA de *M. bovis* BCG. Carril 4, DNA de b1. Carril 5, DNA de b3, Carril 6, DNA de b4. Carril 7, DNA de h127. Carril 8, DNA de h128. Carril 9, DNA de h129. Carril 10, DNA de h130. Carril 11, DNA de h131. Carril 12, DNA de h132. Carril 13, DNA de h133. Carril 14, DNA de h134. Carril 15, DNA de h135. Carril 16, DNA de h136. Carril 17, DNA de DNA humano. Carril 18, DNA de NTC (sin DNA). (A) Mezclas para rDNA 16S. (B) Mezclas D1 (RD9+/RD1-). (C) Mezclas D2 (RD4+/RD4-).

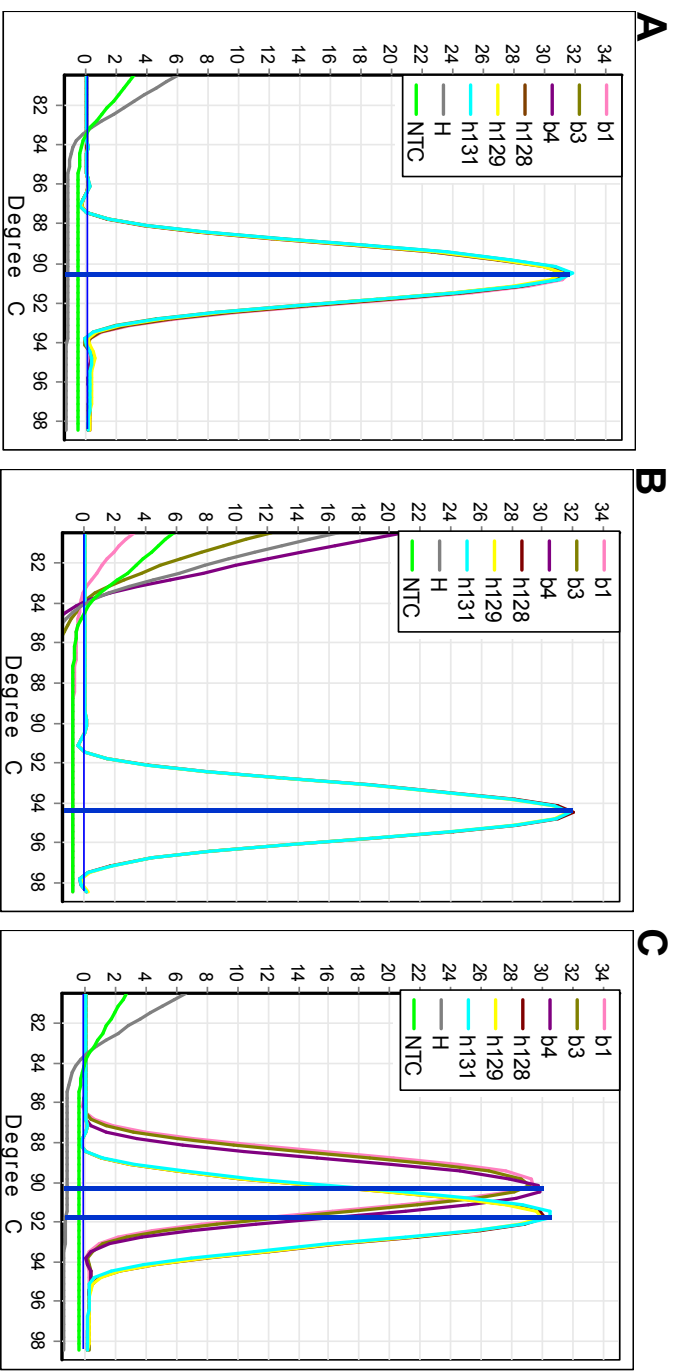


Fig. 8. Perfiles de desnaturalización térmica de los amplicones de seis cepas del CMTB aisladas de tres infecciones humanas y tres bovinas

Mezclas de qPCR con DNA de los aislados de seis casos de tuberculosis: tres de bovinos (b1, b3, b4) y tres de humanos (h128, h129 y h131). (A) Mezcla preliminar (para rDNA 16S) con $T_m = 90.5^\circ\text{C}$ para todos los aislados. H, línea gris, DNA humano. NTC, línea verde, sin DNA. (B) Mezcla D1 (para RD9+ y RD1-) con $T_m = 94.3^\circ\text{C}$ para los aislados h128, h129, h131. H, línea gris, DNA humano. NTC (sin DNA), línea verde. (C) Mezcla D2 (para RD4+ y RD4-) con $T_m = 90.5^\circ\text{C}$ para los aislados b1, b3 y b4; $T_m = 91.7^\circ\text{C}$ para los aislados h128, h129, y h131. H, línea gris, DNA humano. NTC (sin DNA), línea verde.

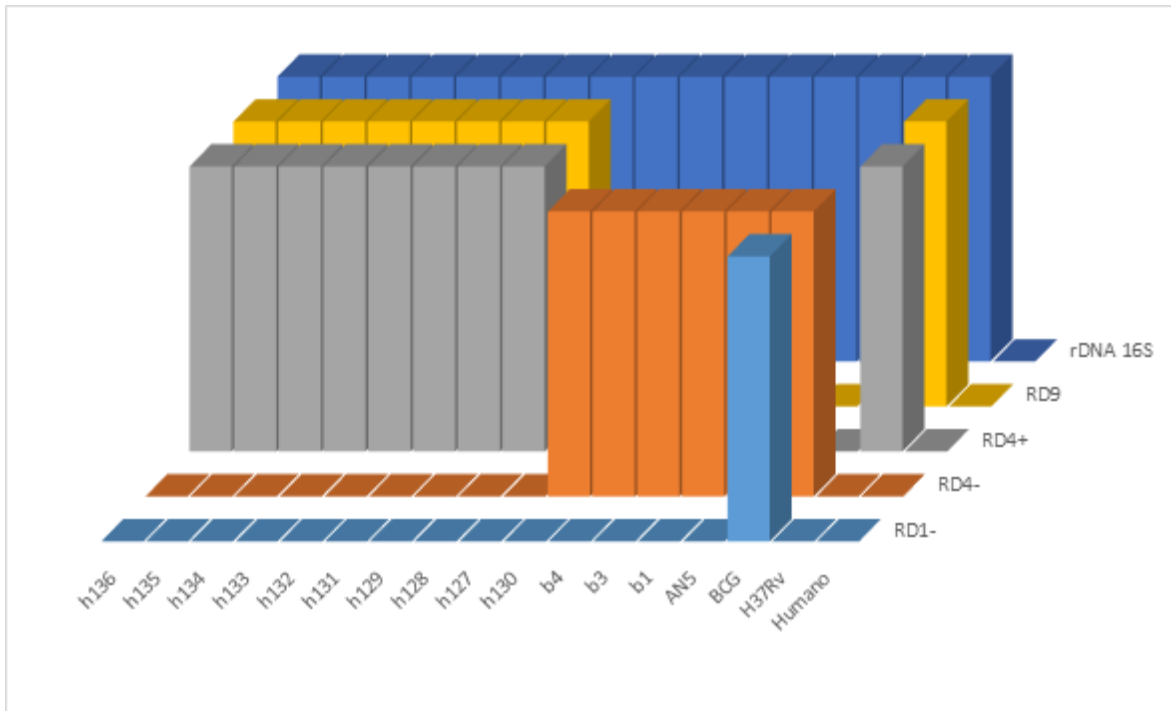


Fig. 9. Amplicones generados a partir de DNA humano y de las tres cepas de referencia y las 13 cepas de infecciones humanas y bovinas

Ningún amplicón fue generado a partir del DNA humano. El amplicón rDNA 16S fue generado a partir del DNA de los 13 aislados ensayados. Los amplicones RD9+ y RD4+ fueron generados a partir del DNA de ocho aislados de humanos. El amplicón RD4- fue generado a partir del DNA de un aislado humano (h130) y tres bovinos (b1, b3, b4). El amplicón RD1- sólo fue generado a partir del DNA de la cepa de *M. bovis* BCG str. México.

Discusión

La identificación de las principales especies de micobacterias causantes de TB humana requiere técnicas simples, rápidas y fáciles de interpretar. Los productos de qPCR en presencia de fluorocromos intercalantes del DNA pueden diferenciarse sin necesidad de análisis electroforético por sus perfiles de desnaturalización térmica, que dependen del tamaño, contenido de GC y secuencia de los amplicones (Ririe et al. 1997). Las mezclas de qPCR con EvaGreen resuelven los picos de desnaturalización térmica mejor que las mezclas con SYBR Green (Khan et al. 2011; Ririe et al. 1997) y la optimización de las condiciones de amplificación mejora su eficiencia y minimiza los productos espurios (Bustin et al. 2009).

La qPCR con EvaGreen desarrollada en este trabajo para tratar de diferenciar *M. tuberculosis* y *M. bovis* a partir de DNA o lisados de cultivos se basa en la desnaturalización térmica de cinco amplicones en un ensayo preliminar uniplex seguido de dos ensayos dúplex simultáneos. El ensayo preliminar toma menos de dos horas y detecta la región de rDNA 16S característica del género *Mycobacterium*. Las muestras positivas son luego ensayadas simultáneamente en la mezcla dúplex D1 para las regiones RD9+ y RD1- y la mezcla dúplex D2 para las regiones RD4+ y RD4-, que permiten diferenciar *M. tuberculosis* y *M. bovis* en menos de dos horas.

La espoligotipificación determina linajes, familias y especies del CMTB y es ampliamente utilizada en epidemiología (Kamerbeek et al. 1997), pero tiene la desventaja de ser laboriosa y sujeta a errores para identificar los espaciadores en membranas caseras y durante la transcripción de los datos al formato digital (Abadia et al. 2011). GeneXpert MTB/RIF es un sistema de qPCR recomendado por la Organización Mundial de la Salud, basado en cartuchos con sondas para un termociclador especializado (World Health Organization 2014) que determina la resistencia a rifampicina pero no distingue *M. tuberculosis* de *M. bovis* (El-Hajj et al. 2001). La ventaja principal de este sistema es que el proceso de extracción y purificación de ácidos nucleicos incorporado en los cartuchos evita la contaminación por manipulación inadecuada de las muestras o los reactivos (Lawn et al. 2013).

Para montar la mezcla preliminar y las mezclas dúplex empleamos nueve oligonucleótidos con temperaturas de alineamiento cercanas a 60 °C. Primero

verificamos que en las mezclas de qPCR uniplex todas las parejas de oligonucleótidos generaran los amplicones con el tamaño y valores de Tm esperados.

Con la pareja de oligonucleótidos 16S F/16S R de la mezcla preliminar detectamos la región rDNA 16S que identifica al género *Mycobacterium*, igual que otros autores (Joao et al. 2014). La mezcla D1 detecta la región RD9 con la pareja RD9 F/RD9 R así como la región RD1- con la pareja RD1 F/PB-RD1 F-. Los amplicones RD9+ y RD1 tienen diferentes tamaños y valores de Tm por lo que esta mezcla puede generar los patrones de amplicones esperados para *M. tuberculosis* (con RD9+, sin RD1-), *M. bovis* BCG (sin RD9+, con RD1-) y *M. bovis* (sin RD9+ ni RD1-) (Mahairas et al. 1996). La mezcla D2 con los oligonucleótidos reversos diseñados por nosotros junto con el forward único PB-RD4+ F de Pinsky y Banaei (2008) generaría dos productos de más de 100 pb fácilmente distinguibles por su tamaño y valor de Tm para determinar la presencia/ausencia de la región RD4 en los genomas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG.

Para controlar la especificidad de los ensayos de qPCR clonamos los amplicones de cada región de interés, a diferencia de los autores que no lo hicieron (Pinsky and Banaei 2008; Pounder et al. 2010). Los amplicones de rDNA 16S, RD9+ y RD4+ fueron generados a partir de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv; el de RD1- a partir de DNA de *M. bovis* BCG str. Mex; el de RD4- a partir de DNA de *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG str. Mexico. Por ligación de estos amplicones obtuvimos clonas de *E. coli* transformantes con construcciones derivadas de pGEM que portan insertos de cada uno de los amplicones, los cuales fueron liberados por restricción con *Eco* RI, tuvieron los tamaños esperados y sus secuencias tuvieron identidades de 99-100% con las de las cepas de referencia.

La concentración de las parejas de oligonucleótidos debe ser optimizada para evitar la formación de productos espurios, especialmente en mezclas de PCR multiplex (Bustin et al. 2009). Con las concentraciones óptimas de las parejas determinadas para cada amplicón minimizamos la generación de productos inespecíficos en las mezclas uniplex y dúplex.

Las diferencias en los valores de T_m dependen del contenido de GC, la longitud y secuencia de los productos de amplificación, permiten determinar la presencia de varios amplicones en la misma mezcla de qPCR y distinguirlos de los productos de amplificación inespecíficos (Ririe et al. 1997). Las mezclas preliminar, D1 y D2 en ausencia de DNA pero con concentraciones de oligonucleótidos optimizadas e incubadas por 30 ciclos no generaron productos inespecíficos detectables y los valores de T_m característicos permitieron diferenciar los amplicones RD9+ ($T_m = 94.2\text{ }^\circ\text{C}$) de RD1- ($T_m = 93.0\text{ }^\circ\text{C}$) en la mezcla D1 ($\Delta T_m = 1.20\text{ }^\circ\text{C}$) y RD4+ ($T_m = 91.8\text{ }^\circ\text{C}$) de RD4- ($T_m = 90.5\text{ }^\circ\text{C}$) en la mezcla D2 ($\Delta T_m = 1.3\text{ }^\circ\text{C}$).

Los valores de ciclo umbral (C_q) de las mezclas de qPCR con DNA de las cepas de referencia y las construcciones con insertos fueron 4.3-11.2 ciclos menores que los de las mezclas correspondientes sin DNA; estos valores fueron similares a los encontrados previamente en nuestro laboratorio para ensayos del oncogén E6 del virus del papiloma humano (Hernandez-Arteaga and Lopez-Revilla 2010).

Las 44 cepas del panel del InDRE (39 CMTB y cinco MNTB) correspondieron al género *Mycobacterium* en la mezcla de reacción preliminar, por lo cual la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del nuevo método es del 100% para identificar el género *Mycobacterium*. Entre las 23 cepas del panel asignadas a MTB, los patrones de genotipificación de 17 (73.9%) correspondieron a MTB y MA ($n = 5$) y uno a MB (4.3%). Hubo por tanto correspondencia absoluta entre las 16 cepas asignadas a MB (100.0%) y las cinco cepas MNTB, además el hallazgo del genotipo MA en cinco cepas del panel asignadas como MTB demuestra que la genotipificación basada en el patrón de desnaturalización tiene mayor resolución que la espoligotipificación para identificar las principales especies del CMTB causantes de TB humana.

En los aislados de origen humano y bovino fueron correctamente identificados nueve de 10 aislados de *MTB* y tres de tres de *MB*, el análisis de los genotipos encontrados es mucho más fácil y rápido que en espoligotipo.

Referencias

- Abadia E, Zhang J, Ritacco V, Kremer K, Ruimy R, Rigouts L, Gomes HM, Elias AR, Fauville-Dufaux M, Stoffels K, Rasolofo-Razanamparany V, Garcia de Viedma D, Herranz M, Al-Hajoj S, Rastogi N, Garzelli C, Tortoli E, Suffys PN, van Soolingen D, Refregier G, Sola C (2011) The use of microbead-based spoligotyping for Mycobacterium tuberculosis complex to evaluate the quality of the conventional method: providing guidelines for Quality Assurance when working on membranes. *BMC infectious diseases* 11:110
- Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, Van Embden JD, Cousins D (1996) Spacer oligonucleotide typing of Mycobacterium bovis strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 34:2734-40
- Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaitre N (2011) Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens. *Journal of clinical microbiology* 49:1772-6
- Biet F, Boschioli ML, Thorel MF, Guilloteau LA (2005) Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis and Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC). *Vet Res* 36:411-36
- Bobadilla-del Valle M, Torres-Gonzalez P, Cervera-Hernandez ME, Martinez-Gamboa A, Crabtree-Ramirez B, Chavez-Mazari B, Ortiz-Conchi N, Rodriguez-Cruz L, Cervantes-Sanchez A, Gudino-Enriquez T, Cinta-Severo C, Sifuentes-Osornio J, Ponce de Leon A (2015) Trends of Mycobacterium bovis Isolation and First-Line Anti-tuberculosis Drug Susceptibility Profile: A Fifteen-Year Laboratory-Based Surveillance. *PLoS neglected tropical diseases* 9:e0004124
- Brosch R, Philipp WJ, Stavropoulos E, Colston MJ, Cole ST, Gordon SV (1999) Genomic analysis reveals variation between Mycobacterium tuberculosis H37Rv and the attenuated M. tuberculosis H37Ra strain. *Infect Immun* 67:5768-74

- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55:611-22
- Camus JC, Pryor MJ, Medigue C, Cole ST (2002) Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148:2967-73
- Cantwell MF, Snider DE, Jr., Cauthen GM, Onorato IM (1994) Epidemiology of tuberculosis in the United States, 1985 through 1992. *JAMA* 272:535-9
- CENAPRECE (2009) Estándares para la atención de la tuberculosis en México. Secretaría de Salud, Mexico City, p 84
- Cole ST (2002) Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 148:2919-28
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX (1998) Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 4:59-70
- Cousins DV, Peet RL, Gaynor WT, Williams SN, Gow BL (1994) Tuberculosis in imported hyrax (*Procavia capensis*) caused by an unusual variant belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Vet Microbiol* 42:135-45
- Chaves D, Sandoval A, Rodríguez L, García JC, Restrepo S, Zambrano MM (2010) Análisis comparativo de seis genomas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica* 30
- Choi GE, Lee SM, Yi J, Hwang SH, Kim HH, Lee EY, Cho EH, Kim JH, Kim H-J, Chang CL (2010) High-resolution melting curve analysis for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology* 48:3893-3898
- Dankner WM, Davis CE (2000) *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States-Mexico border in the Baja California region. *Pediatrics* 105:E79

- Del Portillo P, Murillo LA, Patarroyo ME (1991) Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 29:2163-8
- Dominguez-Zepahua M, Hernandez-Arteaga S, Lopez-Revilla R (2018) Genotyping based on thermal denaturation of amplification products identifies species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Med Microbiol* 67:1310-1320
- Domínguez-Zepahua MI (2012) Diagnóstico Molecular de la Tuberculosis Bovina División de Biología Molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., San Luis Potosí, S.L.P., p 35
- Ehrt S, Schnappinger D (2003) Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis. *Methods in molecular biology* 235:75-8
- El-Hajj HH, Marras SA, Tyagi S, Kramer FR, Alland D (2001) Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons. *Journal of clinical microbiology* 39:4131-7
- Fleischmann R, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D (2002) Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *Journal of bacteriology* 184:5479-5490
- Gagneux S, Small PM (2007) Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis* 7:328-37
- Galarza M, Fasabi M, Levano KS, Castillo E, Barreda N, Rodriguez M, Guio H (2016) High-resolution melting analysis for molecular detection of multidrug resistance tuberculosis in Peruvian isolates. *BMC infectious diseases* 16:260
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7877-82

- Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST (1999) Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 32:643-55
- Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V (2005) Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 1:e5
- Harris NB, Payeur J, Bravo D, Osorio R, Stuber T, Farrell D, Paulson D, Treviso S, Mikolon A, Rodriguez-Lainz A, Cernek-Hoskins S, Rast R, Ginsberg M, Kinde H (2007) Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. *Appl Environ Microbiol* 73:1025-8
- Hernandez-Arteaga S, Lopez-Revilla R (2010) Ultrasensitive quantitation of human papillomavirus type 16 E6 oncogene sequences by nested real time PCR. *Infectious agents and cancer* 5:9
- Ho TB, Robertson BD, Taylor GM, Shaw RJ, Young DB (2000) Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* genomes reveals frequent deletions in a 20 kb variable region in clinical isolates. *Yeast* 17:272-82
- Hu Y, Chen S, Yu X, Dai G, Dong L, Li Y, Zhao L, Huang H (2016) Rapid identification of the NAT2 genotype in tuberculosis patients by multicolor melting curve analysis. *Pharmacogenomics* 17:1211-1218
- Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL (2003) PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 41:1637-50
- Imaeda T (1985) Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 35:147-150
- Joao I, Cristovao P, Antunes L, Nunes B, Jordao L (2014) Identification of nontuberculous mycobacteria by partial gene sequencing and public databases. *International journal of mycobacteriology* 3:144-51
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J (1997)

- Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35:907-14
- Khan SA, Sung K, Nawaz MS (2011) Detection of *aacA-aphD*, *qacEdelta1*, *marA*, *floR*, and *tetA* genes from multidrug-resistant bacteria: Comparative analysis of real-time multiplex PCR assays using EvaGreen((R)) and SYBR((R)) Green I dyes. *Molecular and cellular probes* 25:78-86
- Lawn SD, Mwaba P, Bates M, Piatek A, Alexander H, Marais BJ, Cuevas LE, McHugh TD, Zijenah L, Kapata N, Abubakar I, McNerney R, Hoelscher M, Memish ZA, Migliori GB, Kim P, Maeurer M, Schito M, Zumla A (2013) Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *The Lancet. Infectious diseases* 13:349-61
- Lopez-Rocha E, Juarez-Alvarez J, Riego-Ruiz L, Enciso-Moreno L, Ortega-Aguilar F, Hernandez-Nieto J, Enciso-Moreno JA, Lopez-Revilla R (2013) Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in San Luis Potosi, Mexico. *BMC Res Notes* 6:172
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK (1996) Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 178:1274-82
- Organización Mundial de la Salud (2010) Estadísticas sanitarias mundiales 2010. In: Waddell T (ed). Organización Mundial de la Salud, Francia, p 177
- Osman F, Ismail F, Osman A, Omar S, Said H, Ismail N (2016) High Resolution Melting Curve Analysis for Rapid Detection of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *Journal of Tuberculosis Research* 4:155
- Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, Van Soolingen D, Hale YM, Salfinger M (2002) Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol* 40:2339-45
- Pinsky BA, Banaei N (2008) Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *J Clin Microbiol* 46:2241-6

- Pounder JI, Anderson CM, Voelkerding KV, Salfinger M, Dormandy J, Somoskovi A, Heifets L, Graham JJ, Storts DR, Petti CA (2010) Mycobacterium tuberculosis complex differentiation by genomic deletion patterns with multiplex polymerase chain reaction and melting analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67:101-5
- Raviglione MC, Sudre P, Rieder HL, Spinaci S, Kochi A (1993) Secular trends of tuberculosis in western Europe. *Bull World Health Organ* 71:297-306
- Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Maher M, van Soolingen D, Barry T (2011) Novel multiplex real-time PCR diagnostic assay for identification and differentiation of Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium canettii, and Mycobacterium tuberculosis complex strains. *J Clin Microbiol* 49:651-7
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* 245:154-60
- Scorpio A, Zhang Y (1996) Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* 2:662-7
- SENASICA (2016) Prevalencia de la TB bovina. SAGARPA, Mexico City
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM (1997) Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9869-74
- Taylor GM, Worth D, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG (2007) Rapid detection of Mycobacterium bovis DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research* 3:12
- Thorel MF (1980) Isolation of Mycobacterium africanum from monkeys. *Tubercle* 61:101-4
- Tyrrell FC, Budnick GE, Elliott T, Gillim-Ross L, Hildred MV, Mahlmeister P, Parrish N, Pentella M, Vanneste J, Wang YF, Starks AM (2012) Probability of negative mycobacterium tuberculosis complex cultures based on time to

detection of positive cultures: a multicenter evaluation of commercial-broth-based culture systems. *J Clin Microbiol* 50:3275-82

Wirth T, Hildebrand F, Allix-Beguec C, Wolbeling F, Kubica T, Kremer K, van Soolingen D, Rusch-Gerdes S, Locht C, Brisse S, Meyer A, Supply P, Niemann S (2008) Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog* 4:e1000160

World Health Organization (2014) Xpert MTB/RIF Implementation Manual: Technical and Operational 'How-To'; Practical Considerations, Geneva

World Health Organization (2016) Global tuberculosis report 2016. WHO Press, Geneva

World Health Organization (2018) Global Tuberculosis Report 2018. WHO Press, Geneva

Anexo

Artículo publicado

1. Domínguez-Zepahua M, Hernández-Arteaga S, López-Revilla R. 2018. **“Genotyping based on thermal denaturation of amplification products identifies species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex”**. Journal of Medical Microbiology 67:1310-1320, doi: 10.1099/jmm.0.000816.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000816>