

**Análisis de mutaciones en los genes asociados a la resistencia a  
antituberculosos de primera línea en aislados colombianos de  
*Mycobacterium tuberculosis***

**JUAN SEBASTIAN JARAMILLO LOPEZ**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FALCUTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLÓGICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
ARMENIA-QUINDÍO  
2009**

**Análisis de mutaciones en los genes asociados a la resistencia a  
antituberculosos de primera línea en aislados colombianos de  
*Mycobacterium tuberculosis***

**Juan Sebastián Jaramillo López**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de  
Biólogo.

Directora

**Sandra Milena Coronado Rios Lc Ms.**

Docente del Programa de Biología

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FALCUTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLÓGICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
ARMENIA-QUINDÍO  
2009**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia especialmente a mis padres por todo el apoyo, paciencia y sacrificio con el que me han permitido realizar mis estudios.

Agradezco a todas esas personas que fueron parte y colaboraron con este estudio. A Sandra Milena Coronado por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por su dirección, dedicación y confianza.

De igual manera agradezco al doctor Wellman Antonio Ribon, del Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud de Colombia y la a doctora Liliana Vélez del laboratorio de Micobacterias del Instituto Seccional de Salud del Quindío, quienes suministraron las muestras para este estudio.

Al programa de Biología de la Universidad del Quindío, a todos mis docentes; a todos mis compañeros y amigos, por los años de convivencia en el salón de clases.

También agradezco a todos los integrantes del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), especialmente al grupo de investigación en Patogénesis Molecular (PATOMOL) por el apoyo financiero, técnico y logístico brindado para poder realizar este estudio.

## LISTA DE CONTENIDO

	Pag
<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
<b>3. Marco Teórico</b> .....	4
3.1 Tuberculosis.....	4
3.2 Agente causal.....	4
3.3 Mecanismo de transmisión de Tuberculosis pulmonar.....	5
3.4 Factores de riesgo.....	6
3.5 Tratamiento contra la TB.....	7
3.6 Definición y causas de resistencia a drogas.....	9
3.7 Resistencia a fármacos de primera línea y mecanismos moleculares de resistencia en <i>m. tuberculosis</i> .....	11
3.7.2 Resistencia a Isoniazida (INH).....	12
3.7.3 Resistencia a Rifampicina (RIF).....	13
3.7.4 Resistencia a Pirazinamida (PZA).....	14
3.7.5 Resistencia a Estreptomina (PZA).....	15
3.7.6 Resistencia a Etambutol (PZA).....	16
3.8 Ensayos Genéticos Para Detección De Resistencia A Fármacos.....	17
3.9 Antecedentes.....	18
<b>4. Objetivos</b> .....	24
4.1 Objetivo General.....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
<b>5. Materiales y métodos</b> .....	25
5.1 Obtención de las muestras.....	25
5.2 Prueba de Susceptibilidad a los fármacos.....	25
5.3 Extracción y cuantificación de ADN.....	25
5.4 Diseño de los Cebadores para la amplificación de los genes asociados a Fármaco Resistencia.....	26
5.5 Amplificación de los genes asociados a Fármaco Resistencia.....	26
5.6 Análisis de las secuencias obtenidas por secuenciación.....	27
5.7 AS-PCR.....	28
<b>6. Resultados</b> .....	29
6.1 Prueba de Susceptibilidad a los Fármacos.....	29

6.2 Extracción de ADN, Amplificación y Secuenciación de los genes asociados a Resistencia en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	30
6.3 Secuenciación de <i>rpoB</i> , <i>embB</i> , <i>rpsL</i> , <i>mabA-INHA</i> , <i>katG</i> , <i>pncA</i> , en <i>M. tuberculosis</i> .....	31
6.3.2 <i>rpoB</i> .....	32
6.3.3 <i>embB</i> .....	32
6.3.4 <i>rpsL</i> .....	33
6.3.5 <i>mabA-InhA</i> .....	33
6.3.6 <i>katG</i> .....	33
6.3.7 <i>pncA</i> .....	35
6.4 AS-PCR.....	36
<b>7. Discusión</b> .....	<b>38</b>
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>43</b>
<b>9. Recomendaciones</b> .....	<b>44</b>
<b>10. Bibliografía</b> .....	<b>45</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Polimorfismos en la proteína *KatG* identificados en INHR de *M. tuberculosis*. Las variaciones en los aminoácidos se numeran verticalmente. Se utiliza código de una letra según nomenclatura IUPAC. Se indica a continuación el esquema de nucleótidos y aminoácidos donde se producen cambios en los codones con dos o más variantes de codones. El cambio en *KatG463* Leu <-> Arg es un polimorfismo natural que ocurre y no es asociado con la susceptibilidad a INH A: Alanina, C: Cisteína, D: Acido aspártico, E: Acido glutámico, F: Fenilalanina, G: Glicina, H: Histidina; I: Isoleucina, L: Leucina, M: Metionina; N: Asparagina, P: Prolina, Q: Glutamina; R: Arginina; S: Serina, T: Treonina; W: Triptófano; V: Valina. (Tomado de S. Ramaswamy, J. M. Musser 40)

**Figura 2.** Representación esquemática de las mutaciones identificadas en el locus *inhA* en aislados de *M. tuberculosis* INHR. El locus *inhA* es compuesto de 2 contiguos marcos de lectura abierto, el primero *mabA* (codifica para una proteína 3-ketoacyl-acyl transportadora reductasa) y *inhA* (codifica para una proteína enoyl-acyl transportadora reductasa. En organismos del complejo *M. tuberculosis*, *mabA* y *inhA* son separados por 21pb región no codificante que carece de un promotor fácilmente identificable. RBS: Sitio union al ribosoma. A: Alanina; I: Isoleucina, P: Prolina, T: Treonina, V: Valina (Tomado de S. Ramaswamy, J. M. Musser 40)

**Figura 3.** Mutaciones en los codones 507 - 533 del gen *rpoB* en *M. tuberculosis* en 307 cepas resistentes a RIF. Las inserciones y supresiones se muestran por encima de la secuencia de tipo salvaje y las sustituciones se muestran hacia abajo de la secuencia de tipo salvaje. (Tomado de S. Ramaswamy, J. M. Musser 40)

**Figura 4.** Representación esquemática del gen *pncA* en PZAR en *M. tuberculosis*. Muestra las mutaciones reportadas previamente. Las variantes de los aminoácidos son numeradas verticalmente. A: Alanina; C: cisteina; D: Acido aspartico; F: Fenil alalina; G: Glicina; H: Histidina; I: Isoleucina; K: Lisina; L: Leucina; M: Metionina; N: Asparagina; P: Prolina; Q: Glutamina; R: Arginina; S: Serina; T: Treonina; V: Valina, W: Triptofano; Y: Tirosina. (Tomado de S. Ramaswamy, J. M. Musser 40)

**Figura 5.** Representación esquemática de mutaciones localizadas en el gen *rpsL* de *M. tuberculosis* que codifica para una proteína ribosomal S12 asociada con resistencia a SM en *M. tuberculosis*. Cepas resistentes a STR tienen mutaciones en el codón 43 y 88 del gen *rpsL* las cuales no fueron encontradas en organismos susceptibles. La parte de arriba muestra una representación esquemática de *rpsL*, y la posición de los cençbadores usados en la amplificación del gen para la secuenciación automatizada (52).

La parte de abajo muestra las mutaciones en los codones 43 y 88 identificadas por varios autores. Los numeros localizados a la derecha de las variantes en los codones son una compilación de la ocurrencia de cada mutación. (Tomado de James m. Musser 55)

**Figura 6.** Representación esquemática del polimorfismo en el codón *embB* 306 en EMBR de *M. tuberculosis*. La secuenciación de ADN muestra los cromatogramas, el codón de tipo salvaje en aislados susceptibles a EMB (EMBS) ATG (Met) y los cinco codones mutantes descubiertos en las cepas EMBR GTG, (Val); CTG, (Leu), ATA, (Ile); ATT, (Ile), y ATC, (Ile). EmbB se presume que es una proteína transmembrana esto basado sobre modelos de computadora. Pero la ubicación exacta de los aminoácidos en la membrana relativamente se desconoce. (Tomado de S. Ramaswamy, J. M. Musser 40)

**Figura 7. (A)** Se refiere a la prueba de susceptibilidad a PZA para la cepa de referencia H37Rv, el tubo de la izquierda que es el medio de cultivo LJ con el antibiótico se observa que no hay unidades formadoras de colonias, lo contrario sucede en un medio LJ sin antibiótico donde se observan bastantes unidades formadoras de colonias (UFC) lo que demuestra la susceptibilidad de la cepa de referencia a la PZA. **(B)** Se observa una selección de cepas resistentes, el tubo de la izquierda que es el medio de cultivo LJ sin antibiótico se observan bastantes unidades formadoras de colonias (UFC) mientras en el tubo de la derecha donde no deberían haber UFC para cepas susceptibles se observa una UFC lo que indica una selección de cepas resistentes a PZA. **(C)** se observa una cepa resistente donde hay crecimiento tanto en el medio sin antibiótico como en el medio con antibiótico.

**Figura 8.** Visualización del ADN genómico de *M. tuberculosis* en gel de agarosa al 1%.

**Figura 9.** Amplificación de productos por PCR en aislados clínicos de *M. tuberculosis* y en la cepa de referencia H37Rv. Los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Línea 1 y línea 15, marcador de peso molecular 2-Kpb. Línea 2, gen *rpoB* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 3 gen *rpoB* en aislado clínico. Línea 4, gen *katG* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 5 gen *katG* en aislado clínico. Línea 6, gen *inhA* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 7 gen *inhA* en aislado clínico. Línea 8, gen *embB* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 9 y línea 10 gen *embB* en aislados clínicos. Línea 11, gen *pncA* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 12 gen *pncA* en aislado clínico. Línea 13, gen *rpsL* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 14 gen *rpsL* en aislado clínico.

**Figura 10.** Ejemplo de un cromatograma de un aislado clínico de *M. tuberculosis* (gen *rpoB*) empleando el cebador *rpoBF* (ida).

**Figura 11. (A)** Alineamiento entre la secuencia de la cepa de referencia H37Rv de la base de datos de Micobacterias del instituto Pasteur con la secuencia obtenida por el proceso de secuenciación de la cepa H37Rv, 100% de homología entre secuencias. **(B)** Se observa el cromatograma para el resultado de la secuenciación de la cepa H37Rv con picos bien definidos y confiables

**Figura 12.** Alineamiento en CLustalW entre la cepa de referencia H37Rv que fue secuenciada (*pncAH37Rv*) con la cepa de referencia H37Rv (*pncARef*) de la base de datos de Micobacterias del instituto Pasteur.

**Figura 13.** Alineamiento en CLustalW entre las secuencias obtenidas del gen *pncA* para 13 aislamientos comparados. Homología del 3.6% para las secuencias comparadas. De 120 nucleótidos solo 3 fueron conservados entre las 13 secuencias comparadas.

**Figura 14.** Alineamiento en CLustalW entre los genes *pncA* de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*.

**Figura 15.** Amplificación por PCR-AS del codón 315 del gen *katG* en aislamientos resistentes a isoniazida (INHR) en doce aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Línea 1, Marcador de peso molecular 2-Kpb. Línea 2 a Línea 13 son los doce aislamientos resistentes a isoniazida donde se amplificó la mutación (1289pb). Línea 14, Cepa de referencia H37Rv control negativo

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Tratamiento sugerido para pacientes con TB-MDR **(30, 31)**

**Tabla 2.** Fármacos antituberculosos de Primera línea y mecanismos moleculares de resistencia en *M. tuberculosis*. **(17, 18, 35,36).**

**Tabla 3.** Cebadores diseñados para amplificar los genes asociados a fármaco resistencia.

**Tabla 4.** Resultados de la secuenciación de ADN para los 40 aislamientos clínicos Fármaco-Resistentes Procedentes de Colombia.

**Tabla 5.** Cebadores para la PCR – AS. Detectan mutaciones asociadas a resistencia de *M. tuberculosis* a RIF, EMB, SM, INH.



## **LISTA DE ANEXOS**

**ANEXO 1.** Aislados clínicos de *mycobacterium tuberculosis* fármaco-resistentes utilizados en este estudio cada uno caracterizado con su perfil de resistencia

**ANEXO 2.** Prueba de susceptibilidad a los fármacos por la técnica de las proporciones múltiples en su variante simplificada

**ANEXO 3.** Aislamiento de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*

**ANEXO 4.** Estimación de la concentración de ADN por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Alelo especifico
DOTS	Tratamiento corta duracion directamente observado
E	Etambutol
ER	Resistencia a Etambutol
H	Isoniazida
HR	Resistencia a Isoniazida
INS	Instituto Nacional de Salud
MDR	Multi drogo resistencia
OMS	Organización mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-AS	Reacción en cadena de la polimerasa Alelo especifica
R	Rifampicina
RR	Resistencia a Rifampicina
S	Estreptomina
SR	Resistencia a Estreptomina
TAES	Tratamiento acortado estrictamente supervisado
TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis Multi drogo resistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente drogo resistente
Z	Pirazinamida
ZR	Resistencia a Pirazinamida

## 1. RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas responsables de las mayores tasas de morbi-mortalidad a nivel mundial. El tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) o también conocido como tratamiento corto directamente observado (DOTS) recomendado por la Organización de la Salud (OMS) incluye los antibióticos isoniazida, rifampicina, pirazinamida, estreptomycin y etambutol. Lamentablemente, el TAES no es una opción terapéutica en infecciones con cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes (TB-MDR), menos aun si la enfermedad es causada por cepas extremadamente resistentes (TB-XDR), que son resistentes incluso a medicamentos de segunda línea.

La fármaco resistencia en *M. tuberculosis* es causada por mutaciones en regiones restringidas del genoma, predominantemente en los genes que codifican para los blancos de los antibióticos, hasta el presente se han identificado mutaciones cromosomales en áreas limitadas del genoma asociadas al desarrollo de resistencia a los antibióticos de primera línea. En este trabajo se analizaron las mutaciones en seis regiones específicas del genoma asociadas con fármaco resistencia, incluyendo *rpoB* para Rifampicina (R), *katG* y *mabA-inhA* (*fabG1*) promotor para Isoniazida (H), *embB* para Etambutol (E), *pncA* para Pirazinamida (Z), *rpsL* para Estreptomycin (S), todos fueron amplificados, purificados y secuenciados simultáneamente en cuarenta aislamientos clínicos resistentes al menos a un fármaco. Se hallaron mutaciones en dieciséis de dieciocho aislamientos resistentes a H (88.8%). En nueve de nueve aislamientos resistentes a R (100%). En quince de veintiséis aislamientos resistentes a S (57.6%) y en tres de cinco aislamientos resistentes a E (60%) tenían mutaciones asociadas con resistencia específica a fármacos. Se hallaron cincuenticinco mutaciones en los cuarenta aislamientos, de estas cincuenticinco veintinueve son mutaciones no reportadas previamente. Estas nuevas mutaciones incluyen nueve en *rpoB*, una en *embB*, ocho en *rpsL*, ocho en la región reguladora *mabA-inhA* y tres en *katG*. En conclusión este método es útil para la detección de resistencia y para la identificación de mutaciones en aislamientos clínicos fármaco-resistentes de *M. tuberculosis*. Es elemental resaltar que la información obtenida es muy importante para el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular de la resistencia.

**Palabras Clave:** TAES, *M. tuberculosis*, TB-MDR, Resistencia, Mutaciones. Antibióticos. *rpoB*, *katG*, *inhA*, *pncA*, *rpsL*, *embB*.

## 2. INTRODUCCIÓN

La TB ha reemergido como un problema de salud pública de gran magnitud. A mediados de la década pasada se reportaron a nivel mundial aproximadamente 8 millones de nuevos casos, con una mortalidad de 3 millones anuales **(1-4)** y se ha estimado que un tercio de la población mundial está infectada latentemente con *M. tuberculosis* **(5)**. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó para el año 2007 9,27 millones de casos nuevos de TB en todo el mundo, más que los 9,24, 8,3 y 6,6 millones registrados en 2006, 2000 y 1990 respectivamente. En el mismo informe la OMS afirmó que por lo menos un 3.8% de los casos anuales de tuberculosis serían causados por cepas de *M. tuberculosis* resistente a los medicamentos antituberculosos **(6)**.

En los años 50' la quimioterapia redujo exitosamente la incidencia y la transmisión de tuberculosis, sin embargo a partir de la década de los 80', se declara una emergencia a nivel mundial debido a la aparición de cepas resistentes a los fármacos antituberculosos **(5,7)**. A partir de 1990 surge lo que ha sido denominado por algunos autores "la nueva tuberculosis (TB – MDR)", alertando la emergencia y propagación de cepas de micobacterias resistentes a múltiples antibióticos, principalmente a H y R.

Esta problemática se ha visto agravada por el incremento de infecciones micobacterianas en pacientes coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo cual ha complicado el tratamiento de la tuberculosis **(5-7)**. Desde 1991, la OMS estableció la terapia con múltiples fármacos debido a la aparición de cepas mutantes de *M. tuberculosis* con resistencia a algunos de los antibióticos utilizados para el momento, bajo la hipótesis de que la cepa resistente podía ser controlada, al incluir al menos otros dos componentes antimicrobianos **(8-10)**.

Las cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a isoniazida y rifampicina, con o sin resistencia a otros fármacos, han sido denominadas cepas multirresistentes a drogas o TB-MDR **(7,10)**. La OMS estima que 50 millones de personas a nivel mundial podrían estar infectadas con TB-MDR y que aproximadamente 3,1% de los 8,8 millones de nuevos casos en el año 2002 fueron causados por TB-MDR **(6-7,10)**. Los regímenes terapéuticos de pacientes infectados con cepas TB-MDR son menos efectivos, más prolongados, de difícil cumplimiento y más costosos **(11-15)**.

El resurgimiento de la TB con características epidémicas y la aparición de cepas multirresistentes, hace imperativo el diseño de nuevas estrategias de diagnóstico y estudios de susceptibilidad a fármacos, los cuales permitan obtener resultados inmediatos para poder suministrar diagnósticos rápidos y oportunos, que permitan ubicar al individuo enfermo dentro de un programa con una administración oportuna y estrictamente supervisada del medicamento adecuado disminuyendo así la propagación de la enfermedad y la generación de bacterias resistentes a los medicamentos. **(12, 14,16).**

Sin duda, el conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos de resistencia a los antibióticos concedería información de gran valor para el manejo del paciente en varios aspectos **(17)**. El análisis genético de los microorganismos podría acortar el periodo de reporte de resistencia a drogas, particularmente a drogas de primera línea, con la finalidad de adoptar un esquema terapéutico acertado y oportuno y así, lograr la cura del paciente, lo que se traduce en una disminución en la transmisión del patógeno y de la propagación de cepas multirresistentes a drogas. Adicionalmente la caracterización molecular del mecanismo de resistencia puede brindar información sobre el potencial de virulencia de una cepa particular y por último el análisis de alteraciones moleculares que representen la base para el diseño de nuevos fármacos **(17,18)**, así como para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico de la resistencia a los fármacos antituberculosos de primera línea las cuales tendrían un gran impacto, contribuyendo sobresalientemente en la salud pública de la población en su contexto regional, nacional y global.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más antiguas que afectan a la especie humana. El microorganismo productor de esta enfermedad es uno de los exponentes más fieles de la presión selectiva a la que han sido sometidas muchas especies y de una capacidad de adaptación a medios adversos realmente insuperable. Así, aunque las estimaciones le otorgan a *M. tuberculosis* una antigüedad de entre 15.300 a 20.400 años, en atención a su poco frecuente pérdida de diversidad de nucleótidos y a capacidad de mutación, cada vez se acepta más que esta especie evoluciono de otros microorganismos más primitivos dentro del propio género *Mycobacterium* (19).

*M. tuberculosis* es proveniente de Asia y en los últimos 100-150 años, se ha ido desplazando hacia las poblaciones más vulnerables del planeta, o sea, hacia aquellos lugares donde la extrema pobreza no solo asegura su subsistencia y transmisión, sino también donde los escasos recursos económicos no permiten la más mínima lucha contra este microorganismo. No en vano sigue siendo, en los inicios del nuevo milenio, la enfermedad infecciosa humana más importante que existe en el mundo y el patógeno que mayor número de muertes sigue produciendo, fatídico primer puesto en el que compite con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el agente productor de la malaria (19).

#### 3.2 Agente causal

Los microorganismos causales de la tuberculosis se incluyen, taxonómicamente, en el orden *Actinomycetales* y en la familia *Mycobacteriaceae* (19). La tuberculosis puede ser producida por uno de los siete microorganismos que integran el complejo *M. tuberculosis* y que son: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, y más recientemente *M. pinnipedii* y *M. caprae* (20,21, 22). Sin lugar a dudas, la TB producida por *M. tuberculosis* es la más importante desde el punto de vista sanitario y la que produce la gran mayoría de los cuadros clínicos de esta enfermedad.

*Mycobacterium tuberculosis* carece de una cápsula cerúlea pero posee un alto contenido de lípidos químicamente complejos en su pared celular. De ellos, el ácido micólico es el más característico y al que se le supone la peculiaridad de la tinción ácido alcohol resistente y la modificación morfológica según la edad del

microorganismo. Su pared rica en lípidos también es responsable de varias de sus características biológicas, como su antigenicidad, la dificultad para ser destruidos por los macrófagos y su resistencia a la desecación **(23)**. El componente lipídico aislado es capaz de producir la misma respuesta inmune que el germen completo, incluyendo la formación de células epitelioides y, en ocasiones, la propia caseificación. *M. tuberculosis* no tiene capacidad de producir exotoxinas, por lo que carece entonces de toxicidad primaria **(19)**.

Otra gran característica de *M tuberculosis* es su tremendamente lenta capacidad de división, que es el origen de una clínica muy poco específica y de muy lenta instauración, y que también justifica que no sea necesario administrar los fármacos antituberculosos varias veces al día. El crecimiento de *M. tuberculosis* está subordinado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Incluso, parece existir una interdependencia entre la disposición anatómica de la enfermedad y la tensión de oxígeno disponible en la zona. El ejemplo clásico es el de la TB de los lóbulos pulmonares superiores, donde el flujo sanguíneo bajo y la menor ventilación producen un incremento de la tensión alveolar de oxígeno, que podría explicar la tendencia de la enfermedad a progresar en estas zonas en la enfermedad primaria. En cualquier caso, las condiciones ideales de multiplicación del bacilo las encuentra a un pH de 7,4 y a una presión de oxígeno entre 100 y 140 mm de Hg. Sin embargo, incluso bajo estas condiciones, su multiplicación es muy lenta, oscilando entre las 14 y 24 horas. Cuando *M. tuberculosis* no encuentra a su alrededor una situación favorable, éste entra en un estado latente o durmiente, pudiendo demorar su multiplicación desde varios días hasta muchos años. Este estado de latencia es también uno de los condicionantes de la perpetuación de la enfermedad. Por último, *M. tuberculosis* es un microorganismo con forma bacilar, muy resistente al frío, a la congelación y a la desecación, siendo, por el contrario, muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta **(19)**.

### **3.3 Mecanismo de transmisión Tuberculosis Pulmonar**

El mecanismo de transmisión más importante y el que causa la casi totalidad de los contagios es la vía aérea. La persona enferma, al hablar, cantar, reír, estornudar y, sobre todo, al toser, elimina una serie de pequeñas microgotas, en forma de aerosoles, cargadas de micobacterias. Las microgotas más grandes (> 10  $\mu$ m), aunque son las que llevan mayor número de micobacterias, debido a su gran peso se sedimentan o impactan en la vía aérea superior y, por lo tanto, no son infecciosas.

Otro grupo de microgotas aerosolizadas, con un tamaño de 5-10  $\mu\text{m}$ , alcanzan las vías aéreas más proximales, sin que aquí encuentre el bacilo las condiciones idóneas para su multiplicación. Sin embargo, las microgotas de 1-5  $\mu\text{m}$ , formadas por condensación de las anteriores al perder parte de su contenido en agua, que contienen aproximadamente entre uno y cinco bacilos / microgota, son las realmente infecciosas, al poder llegar y depositarse en la región alveolar **(19)**.

Los macrófagos en primera instancia, y los linfocitos después, acudirán a la zona y en la gran mayoría de los casos lograrán detener la multiplicación, pero en otros se verán incapacitados y se producirá una TB que se denomina primaria. No obstante, a pesar de la importancia de la vía aerógena, existen otros mecanismos de transmisión como son: la vía digestiva a través de la leche contaminada con *M. bovis*, la vía urogenital, a través de la orina y la transmisión sexual, la vía cutáneo-mucosa, por inoculación directa (TB vacunal), y por vía transplacentaria (200-300 casos descritos), sobre todo en casos de TB miliar de la madre que acaba atravesando el filtro de la placenta. Esta última vía es la que determina la denominada TB congénita **(19)**.

### **3.4 Factores de riesgo**

Las circunstancias que facilitan el desarrollo de una enfermedad se denominan factores de riesgo. Estos, conllevan a un mayor o menor grado de inmunodeficiencia, los cuales incrementan hasta 1.000 veces la posibilidad de padecer TB con respecto a la probabilidad que puede tener una persona normal. Las edades límites de la vida son más vulnerables a padecer la enfermedad, sobre todo los niños menores de 5 años y los adultos mayores de 65-70 años. Esto puede estar parcialmente justificado por el discreto grado de inmunodeficiencia que se puede tener en estas edades. No es conocido, sin embargo, por qué el grupo de edad de los 6-14 años tiene una menor predisposición a padecer la enfermedad, hecho constatado epidemiológicamente en todas las zonas del mundo **(19)**. En todas las series estudiadas a nivel mundial la TB afecta más frecuentemente a varones (60-70%) que a mujeres, hecho que ha sido imputable a los distintos hábitos sociales de éstos, aunque cada vez son más los trabajos que intentan demostrar una ligera predisposición genética de la mujer. Por último, no todas las personas poseen igual riesgo para desarrollar TB una vez adquirida la infección. **(19)**.



### 3.5 Tratamiento contra la TB

El tratamiento de TB se basa en un régimen terapéutico cuádruple con antibióticos de primera línea y la mayoría de los países siguen los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud a través de la estrategia DOT (*Tratamiento directamente observado*) o TAES (Tratamiento acortado estrictamente supervisado) **(24, 25,26)**.

Los antibióticos de primera línea tienen propiedad bactericida e incluyen: isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z) y estreptomina (S). Para el tratamiento de casos nuevos se incluye etambutol (E), el cual aunque es bacteriostático, tiene la propiedad de prevenir la resistencia a fármacos de primera línea.

La terapia estándar de corta duración o DOTS recomendada por la OMS para tratar pacientes con cepas sensibles, consiste en una fase inicial de dos meses con los antibióticos isoniazida, rifampicina pirazinamida y etambutol o estreptomina, seguida de una fase de tratamiento continuo de cuatro meses con isoniazida y rifampicina. **(24, 27, 28,29)**. Según el último informe de la OMS, de un total de 210 países, 180 (85%) aplican la estrategia DOTS a través de los Programas Nacionales de Tuberculosis (PNT) y un 70% de la población mundial vive en estos países **(13)**. En pacientes con fracasos en el tratamiento, el régimen de la OMS consiste en la administración de isoniazida, rifampicina y etambutol por un periodo de 8 meses, junto con pirazinamida durante los primeros tres meses y estreptomina los primeros dos meses **(26,30)**. Lamentablemente, los cultivos y las pruebas de susceptibilidad a antibióticos no siempre están disponibles y se corre el riesgo de administrar este tratamiento a pacientes infectados con TB-MDR, en cuyo caso estaríamos en presencia de una monoterapia con etambutol **(31)**.

Cuando se sospecha de TB-MDR, no puede obviarse el cultivo y las pruebas de susceptibilidad a drogas, sin embargo se comienza a administrar al paciente un tratamiento empírico basado en drogas de segunda línea hasta que se obtengan los resultados de las pruebas de susceptibilidad (**Tabla 1**), enfatizando que no debe agregarse una única droga al protocolo terapéutico inicial y que se deben incluir al menos tres drogas no utilizadas previamente **(6, 15,32)**.

**Tabla 1.** Tratamiento sugerido para pacientes con TB-MDR (30, 31)

Resistencia a Fármacos	Fase Inicial		Fase de Continuación	
	Medicamento	Duración	Medicamento	Duración
Resistencia a isoniazida en presencia o no de resistencia a estreptomina	Aminoglucósidos Ofloxacina o Levofloxacina Pirazynamida Etambutol Etionamida	3 meses	Ofloxacina o Levofloxacina Etambutol Etionamida	18 – 24 meses
Resistencia a isoniazida, rifampicina, y etambutol en presencia o no de resistencia a estreptomina	Aminoglucósidos Ofloxacina o Levofloxacina Pirazynamida Etionamida cicloserina	3 meses	Ofloxacina o Levofloxacina Etionamida cicloserina	18 – 24 meses

Los pacientes infectados con cepas resistentes a drogas, deben ser investigados en el laboratorio para ser tratados bajo el esquema DOTS-PLUS (12), con nuevos antibióticos de segunda línea para los cuales se haya demostrado sensibilidad en pruebas de susceptibilidad a antibióticos en el laboratorio y que no hayan sido administrados al paciente con anterioridad (6,12,13). Los principales fármacos de segunda línea que se utilizan para el tratamiento de pacientes con TB-MDR, son amikacina (A), protionamida/etionamida (Pt/Et), capreomicina (CM), kanamicina (K), cicloserina (CS), fluoroquinolonas, ácido para-aminosalicílico (PAS) y tioacetazona (Tabla 2). Estos exhiben menos efectividad y una gran variedad de efectos adversos y deben ser administrados con mayor frecuencia que los antibióticos de primera línea y el promedio de duración del tratamiento recomendado es de dos años (Tabla 2), haciendo más difícil el cumplimiento de la terapia por parte del paciente (10, 13, 32). La resistencia a drogas se infiere cuando el paciente no responde al tratamiento después de dos meses de terapia, lo cual trae como consecuencia deterioro del paciente o muerte y mayor oportunidad de desarrollo de resistencia a otras drogas con el consecuente riesgo de propagación de cepas TB-MDR en la población (10). Como es de esperar, el esquema terapéutico DOTS fracasa en pacientes infectados con TB-MDR definidas como cepas resistentes al menos a rifampicina e isoniazida (10,11-13).

A través de diversos estudios en todo el mundo se ha encontrado que las cepas resistentes a rifampicina ya han desarrollado resistencia a otros antibióticos, por lo cual la característica de resistencia a rifampicina se considera un marcador para la detección de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* MDR (17, 18, 31).

La importancia de la detección de cepas TB-MDR, utilizando rifampicina como marcador reside en que la terapia de corta duración DOTS propuesta por la OMS deja de ser la mejor opción para el tratamiento de pacientes infectados con TB-MDR y en la medida que la detección de una cepa multirresistente se haga mas temprano, mayor será la probabilidad de indicar un esquema terapéutico adecuado y oportuno **(15, 16, 18, 19,32)**. Así, la caracterización y comprensión de los mecanismos moleculares de resistencia a drogas ha conducido al desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

### **3.6 Definición y causas de resistencia a drogas**

Las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas se definen como tal por su capacidad para crecer a mayores concentraciones de antibióticos que las cepas sensibles. Las cepas silvestres son aquellas que nunca han estado en contacto con drogas antituberculosas, mientras que las cepas con resistencia natural son cepas silvestres resistentes a una droga dada, sin haber estado expuestas a la misma **(10,11)**.

La resistencia primaria se refiere a infección de un paciente que nunca ha recibido tratamiento, por una cepa resistente. Ésta incluye infección por cepas silvestres que nunca han estado en contacto con drogas (resistencia natural) y también la resistencia que se desarrolla como consecuencia de la exposición de una cepa a determinado medicamento pero en otro paciente. Se define como resistencia secundaria o adquirida, aquella que se desarrolla en pacientes que han recibido quimioterapia antituberculosa, debido a selección de cepas mutantes resistentes espontáneas, en la mayoría de los casos, motivado a un tratamiento inadecuado o incumplimiento de la terapia **(14,15)**.

La resistencia primaria es informativa de deficiencias y fracasos en los programas de control de la tuberculosis, mientras que la resistencia adquirida es indicativa de deficiencias en el tratamiento actual de un paciente con tuberculosis **(11,14-16)**. Otros conceptos importantes en el manejo del paciente y la epidemiología de TB-MDR son la mono-resistencia y poli-resistencia.

La OMS define la mono-resistencia como resistencia de *M. tuberculosis* a uno de los cinco antibióticos de primera línea, mientras que poli-resistencia se refiere a resistencia a dos o más antibióticos de primera línea **(10, 12,13)**.

Multi-resistencia a drogas o TB-MDR, como se definió anteriormente, es un tipo de poli-resistencia en el cual *M. tuberculosis* desarrolla resistencia al menos a rifampicina e isoniazida, las drogas más efectivas en la terapia antimicobacteriana, en ausencia o presencia de resistencia a otras drogas **(7, 10,13)**.

El éxito de la estreptomina en el tratamiento de la TB en 1943 pronto se vio opacado por la aparición de cepas resistentes al antibiótico. Actualmente, se conoce que la monoterapia conduce a la emergencia de cepas resistentes a una tasa de 1:106, al menos a una de las drogas conocidas **(14)**, de manera que un paciente tratado con un solo antibiótico tiene una alta probabilidad de seleccionar mutantes resistentes **(14-16)**. Por ejemplo, la tasa de mutación para desarrollar resistencia a isoniazida se ha estimado en  $1 \times 10^{-6}$  replicaciones y la tasa de resistencia a rifampicina en  $1 \times 10^{-8}$  replicaciones, de manera que existe una alta probabilidad de desarrollar resistencia a alguno de estos antibióticos en una lesión pulmonar que generalmente contiene de  $10^7$  a  $10^9$  bacilos, sin embargo, la probabilidad de desarrollar resistencia a los dos antibióticos se reduce a  $1 \times 10^{-14}$  **(17-19)**. Debido a que la tasa de mutación a dos o más drogas es más baja, se hizo evidente la necesidad de aplicar protocolos de tratamientos con múltiples drogas, por ejemplo introduciendo ácido para-aminosalicílico (1946) e isoniazida (1952) y consistente con esto, la terapia multifármaco es exitosa e impide el desarrollo de resistencia en pacientes que son tratados por primera vez **(7, 8, 11,14)**. Así, se introdujeron tratamientos combinados introduciendo otros antibióticos efectivos contra *M. tuberculosis*, tales como pirazinamida en 1952, cicloserina en 1955, etambutol en 1961 y rifampicina en 1966 **(7, 11,12)**. El uso de la terapia combinada de rifampicina y pirazinamida permitió la disminución del periodo de tratamiento desde 18-24 meses a 6 meses **(13, 14,16)**.

Aunque se ha establecido el éxito de la terapia multidroga en el tratamiento de tuberculosis y en consecuencia, la disminución de la transmisión de cepas resistentes, también se ha advertido que siguen emergiendo cepas multirresistentes debido a monoterapias no intencionales que resultan de una inadecuada prescripción de antibióticos que no se ajustan a los protocolos recomendados, pobre adherencia del paciente a la terapia, fallas en la supervisión del tratamiento, limitado suministro de drogas, bajo estándar en la calidad de las drogas antituberculosas y en general, fallas en las políticas nacionales para apoyar los programas de control de tuberculosis **(6)**.

### 3.7 Resistencia a fármacos de primera línea y mecanismos moleculares de resistencia en *M. tuberculosis*

La resistencia a drogas en *M. tuberculosis* se debe predominantemente a alteraciones en la secuencia de nucleótidos en genes que codifican blancos de antibióticos y a diferencia de otras bacterias, en *M. tuberculosis* no se han reportado mecanismos de adquisición de genes de resistencia vía plásmidos o transposones. Las micobacterias del complejo tuberculosis desarrollan resistencia a múltiples drogas por la acumulación de mutaciones individuales en varios genes o también conocidas como polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), cada uno de los cuales es responsable de la resistencia a un antibiótico particular (33, 34, 35,36). A continuación las alteraciones génicas asociadas al desarrollo de resistencia a fármacos antituberculosos (Tabla 2).

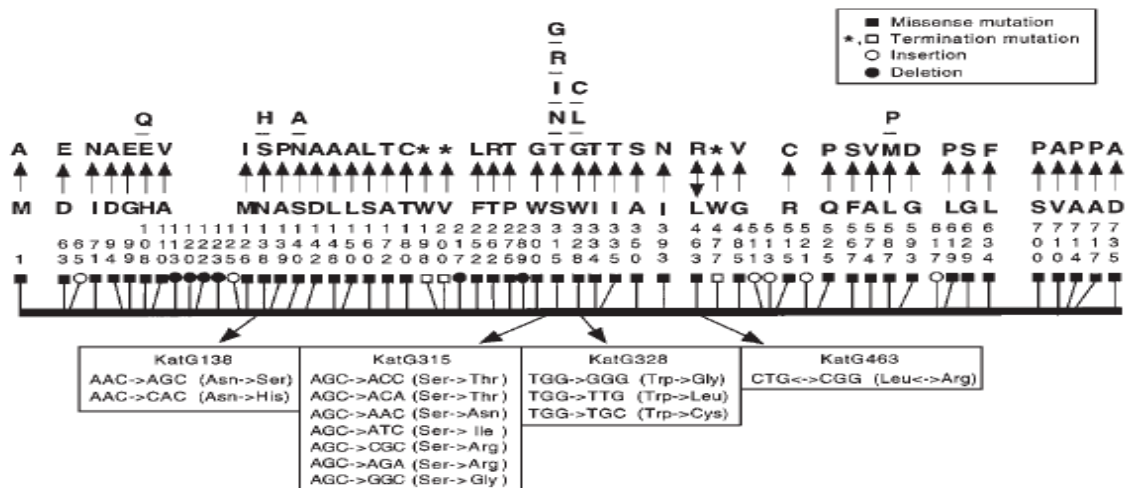
**Tabla 2.** Fármacos antituberculosos de Primera línea y mecanismos moleculares de resistencia en *M. tuberculosis*. (17, 18, 35,36).

Agente Microbiano	Mecanismo de Acción Del Fármaco	Genes involucrados (Producto génico) y mecanismo de resistencia	Frecuencia de Mutaciones
<b>Isoniazida (H)</b>	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	<i>katG</i> (Catalasa-peroxidada) Mutaciones en <i>katG</i> impiden la activación de la isoniazida  <i>inhA</i> (enoil ACP reductasa) Mutaciones en <i>inhA</i> inducen sobreexpresión del gen y niveles elevados de la enzima enoil reductasa en cantidades que superan el poder inhibitorio de H	50 – 68 %  21 – 34 %
<b>Rifampicina (R)</b>	Inhibición de la transcripción de genes por interacción con la ARN polimerasa	<i>rpoB</i> (Subunidad $\beta$ – ARN polimerasa) Mutaciones en este gen impiden la interacción de la rifampicina con la ARN polimerasa.	95 – 98 %
<b>Pirazinamida (Z)</b>	No dilucidado	<i>pncA</i> (enzima pirazinamidasa) Mutaciones en este gen determinan una disminución en la producción del ácido pirazinoico.	72 – 97 %
<b>Estreptomina (S)</b>	Inhibición de la síntesis de proteínas	<i>rpsL</i> (subunidad ribosomal S12) Mutaciones en este gen impiden la interacción con la estreptomina.	64 – 67 %
<b>Etambutol (E)</b>	Inhibición de la síntesis de componentes de la pared celular de micobacterias (arabino galactanos)	<i>embB</i> (enzima arabinosiltransferasa) Mutaciones en este gen permiten la síntesis continua de arabinogalactanos.	47 – 65 %

### 3.7.2 Resistencia a Isoniazida (H)

La isoniazida (ácido nicotínico hidrazida o H) tiene acción bactericida al interferir con la biosíntesis de ácidos micólicos (18, 32). Es un Pro-fármaco que al ser captada por el bacilo, es activada por el sistema catalasa-peroxidasa, de manera que la ausencia de actividad catalasa, debido a mutaciones en el gen *katG*, codificante de esta enzima, es uno de los mecanismos de resistencia a H (17, 32, 37, 38). Las cepas de *M. tuberculosis* con mutaciones en el gen *katG* exhiben poca o ninguna actividad catalasa y son altamente resistentes a H (MIC >32 mg/ml). Las mutaciones se concentran en una región codificante del gen *katG*, que comprende los codones 300 al 507, siendo las más frecuentes las sustituciones de la serina 315 por treonina (S 315→T) y el residuo de arginina 463 por leucina (R 463→L) (Fig. 1) (35, 39).

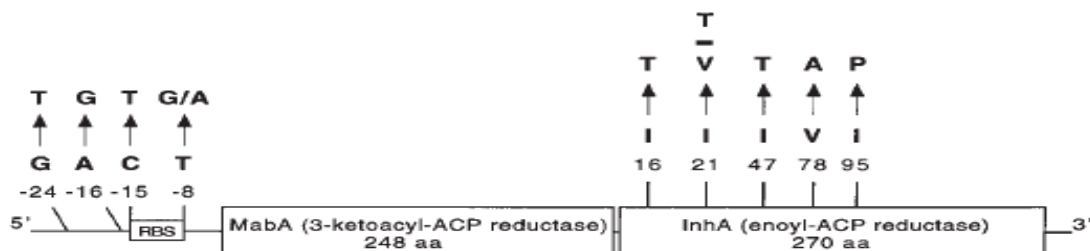
Estas mutaciones explican aproximadamente el 50% de los casos de aislados clínicos resistentes a H (37,39).



**Fig 1.** Polimorfismos en la proteína *KatG* identificados en HR de *M. tuberculosis*. (Las variantes de los aminoácidos se numeran verticalmente). Para los aminoácidos se utilizan abreviaturas. Se indica a continuación el esquema de nucleótidos y aminoácidos donde se producen cambios en los codones con dos o más variantes de codones. El cambio en *KatG463* Leu ↔ Arg es un polimorfismo natural que ocurre y no es asociado con la susceptibilidad a H A: Alanina, C: Cisteína, D: Ácido aspártico, E: Ácido glutámico, F: Fenilalanina, G: Glicina, H: Histidina; I: Isoleucina, L: Leucina, M: Metionina; N: Asparagina, P: Prolina, Q: Glutamina; R: Arginina; S: Serina, T: Treonina; W: Triptófano; V: Valina. (Tomado de S. Ramaswamy, J. M. Musser 40)

Por otra parte, la enzima enoil ACP reductasa, involucrada en los pasos de elongación de ácidos grasos, codificada por gen *inhA* se identificó como un blanco de acción de H (41,42). El intermediario de H, cuya activación depende de la actividad catalasa-peroxidasa intacta, inhibe la actividad de la enzima *inhA* y en consecuencia la síntesis de ácidos micólicos (41).

Las mutaciones en el gen *inhA* inducen sobreexpresión del gen *inhA* y niveles elevados de la enzima enoil reductasa en cantidades que superan el poder inhibitorio de H. Las mutaciones en *inhA* están asociadas a aproximadamente al 25% de los casos de resistencia a H, generalmente con bajos niveles de resistencia (MIC de 1mg/ml) (42, 43). Algunos estudios genéticos de mutantes resistentes de *M. smegmatis* y *M. bovis* han identificado 2 genes contiguos con los marcos de lectura abierta designado a *mabA* y *inhA* (Fig. 2), que codifican productos que participan en la resistencia a H (40).



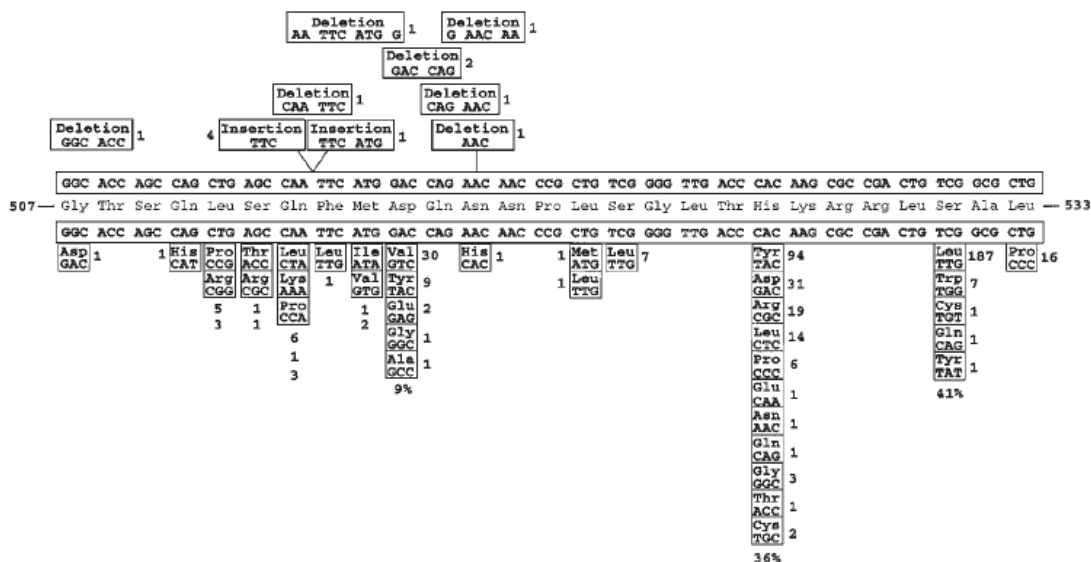
**Fig 3.** Representación esquemática de las mutaciones identificadas en el locus *inhA* en aislados de *M. tuberculosis* HR. El locus *inhA* es compuesto de 2 contiguos marcos de lectura abierto, el primero *mabA* (codifica para una proteína 3-ketoacyl-acyl transportadora reductasa) y *inhA* (codifica para una proteína enoyl-acyl transportadora reductasa. En organismos del complejo *M. tuberculosis*, *mabA* y *inhA* son separados por 21pb región no codificante que carece de un promotor fácilmente identificable. RBS: Sitio union al ribosoma. A: Alanina; I: Isoleucina, P: Prolina, T: Treonina, V: Valina (Tomado de S. Ramaswamy, J. M. Musser 40)

### 3.7.3 Resistencia a Rifampicina (R)

R fue presentado para su uso en la terapia antituberculosa a principios de 1970 y es un componente muy importante de los actuales regímenes de tratamiento. La rifampicina es un antibiótico de amplio espectro clave en la estrategia DOTS propuesta por la OMS y el mecanismo de resistencia a este antibiótico es uno de los primeros caracterizados a nivel molecular. El mecanismo de acción de la rifampicina consiste en que el antibiótico se une a la ARN polimerasa procarionta, la enzima responsable del proceso de transcripción de genes, y al inhibir la expresión de genes, la rifampicina conduce a la muerte de la célula. La resistencia a rifampicina se explica por mutaciones en el gen *rpoB*, el cual codifica la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa y las alteraciones en esta subunidad impiden que la rifampicina interactúe adecuadamente con la ARN polimerasa e inhiba la transcripción (35, 43,44).

Se ha demostrado que la resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis* se explica en un 95% a 98% por mutaciones en el gen *rpoB*, las cuales generalmente se localizan en un corto segmento de aproximadamente 81 pb que incluye los codones 507 a 533 del gen *rpoB* (43, 44,45).

Las mutaciones en esta región incluyen deleciones, inserciones, sustituciones, siendo las más frecuentes, las mutaciones en codones para asparagina 516, histidina 526 y serina 531 (**Fig. 3**) (**45, 46**), de manera que los métodos genotípicos para ensayar resistencia a rifampicina se basan en la detección de estas mutaciones, aunque se han encontrado mutaciones en otras regiones del gen, pero con menor frecuencia.



**Figura 3.** Mutaciones en los codones 507 - 533 del gen rpoB en *M. tuberculosis* en 307 cepas resistentes a R. Las inserciones y supresiones se muestran por encima de la secuencia de tipo salvaje y las sustituciones se muestran hacia abajo de la secuencia de tipo salvaje. (Tomado de S. Ramaswamy, J. M. Musser **40**)

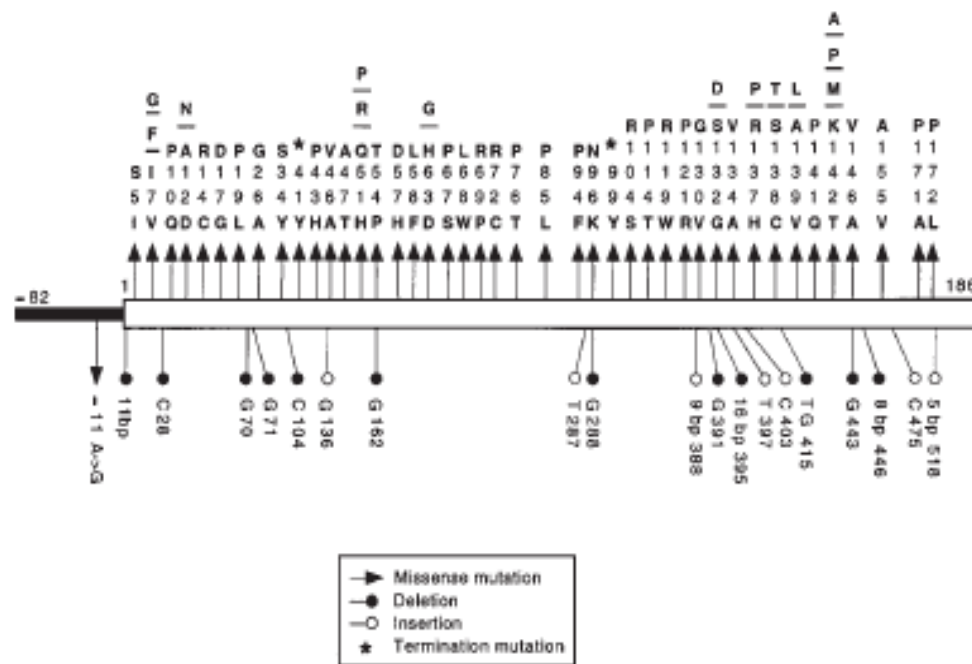
### 3.7.4 Resistencia a Pirazinamida (Z)

La pirazinamida es un compuesto sintético redescubierto en la década de los 80 que ha facilitado el tratamiento antituberculoso de corta duración. Su mecanismo de acción no ha sido bien dilucidado, aunque se ha señalado la importancia de la acción de la enzima pirazinamidasa.

Las cepas de micobacterias susceptibles a pirazinamida sintetizan pirazinamidasa, una enzima que transforma la pirazinamida en su metabolito activo, el ácido pirazinoico, el cual además de su actividad específica parece tener la capacidad de disminuir el pH del medio intracelular por debajo de los límites de tolerancia de la bacteria (**47**). En cepas de *M. tuberculosis* con resistencia adquirida y *M. bovis* con resistencia constitutiva a pirazinamida, se han identificado interrupciones en el gen *pncA*, codificante de la enzima pirazinamidasa/nicotinamidasa (**47, 48**).



Entonces, uno de los mecanismos de resistencia a pirazinamida propuestos hasta el presente es la deficiencia en pirazinamidasa, con la subsecuente pérdida de la capacidad de activar el antibiótico (49). Algunos autores para obtener más información sobre el papel de las mutaciones en el gen *pncA* asociado a la resistencia a pirazinamida, han secuenciado algunos aislados clínicos de *M. tuberculosis* de diversos lugares geográficos, y han encontrado una gran diversidad de subtipos IS6110 así mismo como mutaciones, inserciones y deleciones de nucleótidos en este gen (Fig. 4). A pesar de la importancia de esta observación no se sabe si la estructura de la proteína puede llegar a ser alterada por estos cambios o mutaciones perjudicando la actividad de la pirazinamidasa.

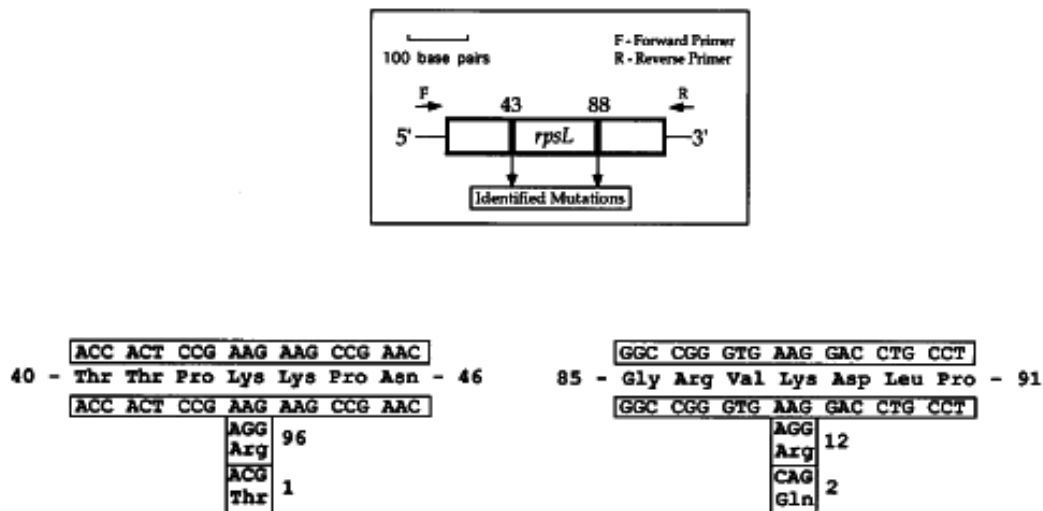


**Fig 4.** Representación esquemática del gen *pncA* en PZR en *M. tuberculosis*. Muestra las mutaciones reportadas previamente. Las variantes de los aminoácidos son numeradas verticalmente. A: alanina; C: cisteína; D: Acido aspártico; F: Fenil alanina; G: glicina; H: histidina; I: isoleucina; K: lisina; L: leucina; M: methionina; N: asparagina; P: prolina; Q: glutamina; R: arginina; S: serina; T: threonina; V: valina, W: triptofan; Y: tirosina. (Tomado de S. Ramaswamy, J. M. Musser 40)

### 3.7.5 Resistencia a Estreptomicina (S)

La estreptomina es un antibiótico aminoglucósido bactericida que actúa sobre los ribosomas inhibiendo la síntesis de proteínas. En la mayoría de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a S se han encontrado mutaciones en el gen *rpsL* que codifica la proteína ribosomal S12 (Fig. 5) (18, 35, 50, 51). Otra mutación identificada, pero de menor frecuencia se localiza en el gen *rrs* que codifica el ARN ribosomal 16S en una región que interactúa con la proteína S12 (23, 41, 42).

Recientemente Kapur y col. (52) analizaron 125 aislados clínicos resistentes de *M. tuberculosis* a S provenientes de diferentes países encontrando mayormente diferentes mutaciones en los codones 43 y 88 del gen *rpsL* (Fig. 5) en proximadamente el 60% de los organismos (53, 54)

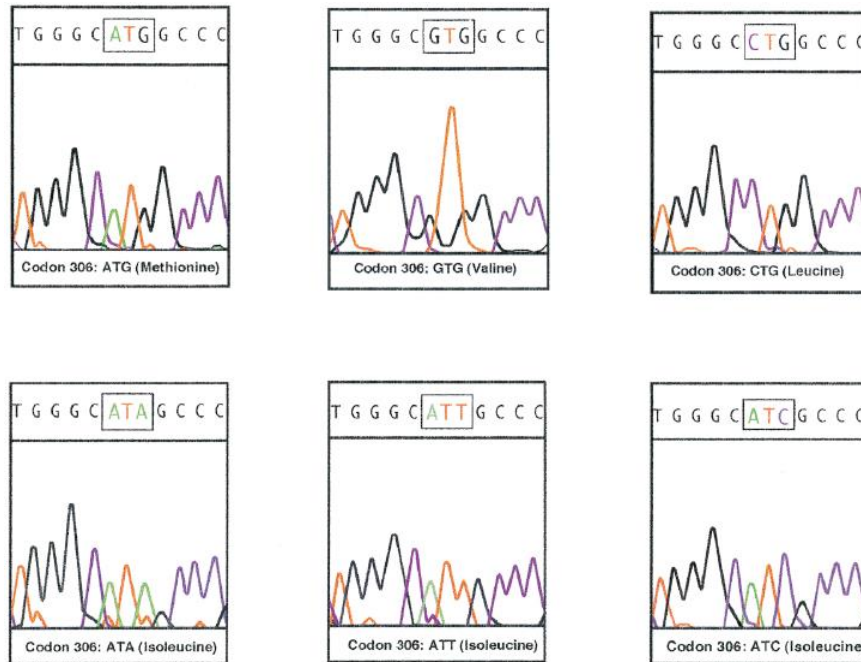


**Fig 5.** Representación esquemática de mutaciones localizadas en el gen (*rpsL*) de *M. tuberculosis* que codifica para una proteína ribosomal S12 asociada con resistencia a S en *M. tuberculosis*. Cepas resistentes a STR tienen mutaciones en el codón 43 y 88 del gen *rpsL* las cuales no fueron encontradas en organismos susceptibles. La parte de arriba muestra una representación esquemática de *rpsL*, y la posición de los cebadores usados en la amplificación del gen para la secuenciación automatizada (52). La parte de abajo muestra las mutaciones en los codones 43 y 88 identificadas por varios autores. Los números localizados a la derecha de las variantes en los codones son una compilación de la ocurrencia de cada mutación. (Tomado de James m. Musser 55)

### 3.7.6 Resistencia a Etambutol (E)

El etambutol es un fármaco específico y muy eficaz que se utiliza en combinación con H para tratar la infección por *M. tuberculosis*, es un compuesto sintético que actúa como bacteriostático, cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de componentes de la pared micobacteriana a las dosis habituales. Las alteraciones génicas identificadas hasta ahora se concentran en una región designada como *embCAB*, que incluye genes codificantes para arabinosiltransferasas, enzimas que participan en la síntesis de componentes únicos de la pared celular de Micobacterias (35, 51, 56). Las mutaciones en la región *emb* se asocian a altos niveles de resistencia y se han identificado en aproximadamente el 65% de los aislados clínicos resistentes a etambutol (35, 51, 57).

Un total de 72 cepas de *M. tuberculosis* incluyendo 28 aislados resistentes a ER fueron examinados por secuenciación de ADN, en 14 de los 28 aislados (50%) se encontraron diferentes mutaciones en el codón 306, en la mayoría había una sustitución de una metionina por valina (**Fig. 6**), esta mutación ni cambios en este codón fueron encontrados en cepas susceptibles a E (58).



**Fig 6.** Representación esquemática del polimorfismo en el codón *embB* 306 en ER de *M. tuberculosis*. La secuenciación de ADN muestra los cromatogramas, el codón de tipo salvaje en aislados susceptibles a E (ES) ATG (Met) y los cinco codones mutantes descubiertos en las cepas ER GTG, (Val); CTG, (Leu), ATA, (Ile); ATT, (Ile), y ATC, (Ile). *embB* se presume que es una proteína transmembrana esto basado sobre modelos de computadora. Pero la ubicación exacta de los aminoácidos en la membrana relativamente se desconoce. (Tomado de S. Ramaswamy, J. M. Musser 40)

### 3.8 Ensayos Genéticos Para Detección De Resistencia A Drogas

La posibilidad de un diagnóstico rápido de TB y determinación de patrón de susceptibilidad de una cepa es muy limitado por procedimientos convencionales de los laboratorios de diagnóstico microbiológico. El procedimiento estándar de diagnóstico consiste en aislar la bacteria a través del cultivo primario en medio sólido, seguido de una segunda ronda de cultivo para ensayar susceptibilidad a drogas. *M. tuberculosis* es un organismo de crecimiento lento, con un tiempo de generación estimado en 18 a 24 horas, haciéndose las colonias visibles a las 3 a 4 semanas de incubación y en casos extremos, el aislamiento primario puede extenderse hasta 8 semanas.

El tiempo mínimo promedio para el reporte definitivo de susceptibilidad a fármacos, por procedimientos bacteriológicos convencionales, es de aproximadamente 45 días, pudiendo requerir hasta 3 semanas adicionales. Otra desventaja de los métodos convencionales de susceptibilidad a fármacos es la inestabilidad de los componentes activos del fármaco en diferentes medios de cultivo **(59)**. Actualmente existe un interés creciente en el estudio de cepas resistentes a R e H basado en evidencias de que las cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes a fármacos, desarrollan en primer lugar resistencia a alguno de estos bactericidas, utilizados como fármacos antituberculosos de primera línea. El conocimiento de las bases moleculares de la resistencia de *M. tuberculosis* a los antibióticos, ha llevado a estudiar más a fondo la naturaleza de las mutaciones en los diferentes genes, principalmente con fines de diagnóstico **(46, 60, 61,62)**.

Entonces, la identificación de cepas resistentes a alguno de estos antibióticos puede orientar hacia un análisis más completo del patrón de susceptibilidad de una cepa particular y tomar las medidas terapéuticas adecuadas y oportunas. El estudio de susceptibilidad permite detectar las fuentes primarias de transmisión de la bacteria y desplegar medidas de control epidemiológico para evitar su propagación **(6, 15, 16,32)**. El enfoque genético de detección de resistencia puede arrojar resultados definitivos en pocas horas o días. A modo que las mutaciones asociadas a resistencia a antibióticos se concentran en regiones específicas de los genes, una estrategia posible para su identificación consiste en amplificar por PCR, el fragmento de ADN del gen donde se localizan. El análisis postamplificación consiste en la detección de alteraciones, puede realizarse en los sitios de corte por enzimas de restricción (RFLP) o observando alteraciones conformacionales de la molécula de ADN. La secuenciación es importante para confirmar e identificar la alteración de la secuencia de ADN.

### **3.9 Antecedentes**

María C. Garzón y colaboradores determinaron la prevalencia de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* tanto en casos no tratados como en casos previamente tratados de TB pulmonar en Colombia. Se analizaron 1189 muestras durante los años 2004 y 2005 utilizando pruebas de susceptibilidad por la técnica de proporciones múltiples. 925 pacientes no tratados presentaron una prevalencia de resistencia global de 11,78% (IC 95%: 9,86-14,02) y una 2,38% (IC 95%: 1,58-3,57). Los 264 pacientes previamente tratados presentaron una resistencia global de 44,32% (IC 95%: 38,45-50,35) y TB-MDR de 31,44% (IC 95%: 26,14-37,27). **(63)**

Durante 1989 y 1996 B. L. Mertz, R. W. Douce, N Brito realizaron un estudio en dos hospitales privados del Ecuador, donde se documentó la prevalencia de antibiótico resistencia en pacientes que habían recibido tratamiento antituberculoso anteriormente, usando el método de proporciones múltiples. Se identificó resistencia en 39 de 161 pacientes (24%) Se observó una resistencia de 14,2% a H, 11,8% a R y 8,7% presentaron Multi-resistencia (MDR) **(65)**.

Durante 1996 y el 2001 Elif ozturk y colaboradores diseñaron un estudio en Duzce Turquía para revelar la resistencia a H, S, E y R de *M. tuberculosis*, se aislaron un total de 62 pacientes de TB (46 varones, 16 mujeres, las pruebas de susceptibilidad fueron realizadas por el método de proporción en el medio de Löwenstein-Jensen. En 52 de los 62 aislamientos (83,8%) se encontró que *M. tuberculosis* era susceptible a todos los fármacos, y en 7 aislamientos (11,3%), 5 (8%), y 3 (4,8%) eran resistentes a S, H, y R, respectivamente, 3 de ellos (4,8%) eran MDR **(66)**.

Entre el 1 de agosto de 1997 y 31 de enero 1998, y entre 15 de noviembre 2000 y 15 de noviembre de 2001. César Moreira y colaboradores presentaron y discutieron los resultados de dos encuestas de resistencia inicial a fármacos antituberculosos de primera línea en personas con TB pulmonar realizadas en Buenaventura con un intervalo de dos años y nueve meses. En las dos encuestas se utilizó el método de proporciones múltiples. Se logró aislar *Mycobacterium tuberculosis* en 93% y 55% de los casos nuevos de tuberculosis pulmonar diagnosticados en cada uno de los periodos estudiados. La resistencia inicial a cualquier medicamento antituberculoso fue de 25% (9/36) y 32% (23/72) en la primera y segunda encuesta, respectivamente. La multiresistencia inicial (definida como resistencia, al menos, a H y R) fue de 6% en ambas encuestas. **(67)**

Durante 1998 Lucy y colaboradores en Inglaterra realizaron un acercamiento poblacional basado en el análisis de sitios múltiples alrededor del cromosoma, demostraron la existencia de una variación genética neutral en genes asociados con los fármacos antituberculosos. Los genes de resistencia tienen la variación suficiente para construir un árbol filogenético robusto para *M. tuberculosis*. Los datos describen una población clonal con un mínimo de cuatro linajes distintos de *M. tuberculosis*, y muy estrechamente relacionados a *M. bovis*, observando a su vez que los linajes se asocian geográficamente. Substituciones de nucleótidos demostradas causan la resistencia a los fármacos, estas son distribuidas a lo largo del árbol, considerando que las substituciones no sinonimas tienen una distribución restringida **(68)**.

Durante 1999 en Perú Róger Calderón y colaboradores implementaron dos ensayos de amplificación de los genes *rpoB* y *katG* y mediante Heteroduplex y SSCP se determinó la susceptibilidad antituberculosa de 31 muestras clínicas procedentes de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar baciloscopía positiva. La caracterización fenotípica de la susceptibilidad, se realizó empleando el método de las proporciones. Los ensayos de PCR detectaron hasta 2,5 pg de ADN genómico de *M. tuberculosis*; no amplificando ADN de otras micobacterias y bacterias comunes de la flora bucal. Se encontró una concordancia general entre la detección molecular y convencional de la susceptibilidad a rifampicina e isoniazida de 96,7% y 83,9% ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Sin embargo, sólo en pacientes con antecedente de tratamiento se presentó una concordancia del 100% y 90,9% ( $p < 0,05$ ) para rifampicina e isoniazida, respectivamente. Además, este sistema de detección de resistencia puede emitir resultados 48 horas después de la recepción de la muestra clínica **(69)**.

Entre agosto de 2000 y febrero de 2001 Christian Baldeviano y colaboradores realizaron en Perú una prueba de sensibilidad a los cuatro fármacos de primera línea (H, R, S, E) por el método de las proporciones y la genotipificación mediante el método estándar de RFLP-IS6110. Encontraron un total de 50 perfiles genéticos que fueron obtenidos de 70 pacientes. 34 aislamientos (48,6 %) se agruparon en 14 “clusters” y 36 tuvieron ocurrencia única. La resistencia a fármacos en pacientes nunca y antes tratados fue 45,2% y 71,1%, respectivamente. La Multi-Fármaco resistencia fue 16,1% y 36,8%, respectivamente. 10 de los 14 “clusters” incluyeron por lo menos un aislamiento resistente y un cluster agrupó 6 aislamientos resistentes **(70)**.

Entre diciembre 2000 y Febrero 2004 en Duzce Turquía Elif Ozturk y colaboradores utilizaron la secuenciación de ADN para analizar las mutaciones en los genes (*katG*, *inhA*, *rpoB*, *rpsL*) que dan la resistencia a la isoniazida (H), rifampicina (R) y estreptomycin (S). Se aislaron un total de 52 cepas de *M. tuberculosis* resistentes que fueron aisladas de pacientes en Düzce, Turquía. De los aislamientos en cuatro se encontró resistencia a H, 3 eran resistentes a R y 5 eran resistentes a S, de un total de 52 cepas aisladas de *M. tuberculosis*. En 3 de las 4 cepas resistentes a H aparece una mutación en el gen del *katG* en el codon 315 (AGC- ACC) (Ser-Thr), el otro aislamiento resistente a H mostró una mutación en el gen del *katG* en el codon 314 (ACC-CCC) (Thr-Pro). No se encontró ninguna mutación en el gen *inhA* resistente a H. En dos de los tres aislamientos resistentes a R se encontraron mutaciones en el gen *rpoB* en el codon 516 que aparece como (GAC- GTC) (Asp-Val). En otro aislamiento resistente a R se encontró una mutación en el gen del *rpoB* en el codón 531 como

(TCG-TTG) (Ser- Leu). Los 3 aislamientos resistentes a R también son resistentes a H. Todos los 5 aislamientos resistentes a S tienen las mutaciones en el gen del *rpsL* en el codón 43 que aparecen como (AAG-AGG) (Lys- Arg). La mutación del gen *katG* en el codón 314 no se había definido previamente **(71)**.

Durante el 2001 y 2003 Caroline Lavender y colaboradores estudiaron en Australia 52 aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida (H), con mutaciones en los genes *KatG* codón 315 y *inhA*. Estos aislamientos reflejan la diversidad geográfica y genotípica de Australia, que son incluidos para su comparación. Se identificaron mutaciones en 34 y 13 de los 52 aislamientos resistentes a isoniazida (H). Se identificaron tres nuevas mutaciones del *katG*, (D117A, M257I, y G491C), en tres cepas H-resistentes utilizando la cepa de tipo salvaje. En total, 90,4% de aislamientos H-resistentes podrían identificarse por el análisis de sólo dos sitios: el *katG*315 y el *fabG1-inhA* la región regulador **(72)**.

En el 2002 Zhenhua Yang y colaboradores diseñaron una PCR múltiple para detectar las mutaciones más comunes en un solo ensayo asociadas a resistencia isoniazida (H), rifampicina (R), y ethambutol (E) observadas en *Mycobacterium tuberculosis*. La utilidad del método desarrollado fue evaluada con 174 aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de Turquía. Comparado con el test de susceptibilidad a fármacos convencional la sensibilidad y especificidad de el nuevo método desarrollado MAS-PCR fue de 81,1% y 97,5% para H, 93,0% y 98,9 % para R, y 54,5% y 68,0 % para E. La MAS-PCR provee un método rápido, potencialmente costoso-efectivo, para detectar resistencia a fármacos antituberculosos **(73)**.

Durante el 2002 y 2003 Tatjana Tracevska y colaboradores caracterizaron en Latvia los mecanismos moleculares de resistencia de fármacos de primera línea en *Mycobacterium tuberculosis* y se evaluó el uso de marcadores moleculares de resistencia (puntos de mutaciones de genes) y analizaron 66 cepas Multi-fármaco-resistentes (MDR) aisladas de pacientes de Latvian. Todos los aislamientos fueron resistentes a R, H y S, y 33 eran resistentes a E. La digestión Enzimática por *MbolI* y secuenciación de nucleótidos del fragmento del gen *rpsL* detecto una substitución de un solo nucleótido K43R en 40 (61%) de los 66 aislados resistentes a estreptomycin. Los otros 26 aislados resistentes a estreptomycin tienen mutaciones en las posiciones 513A→C y 516C→T del gen *rrs* y 10 (15%) tienen la secuencia del tipo salvaje. Se uso el método (SSCP) para descubrir las mutaciones en el gen del *embB* que se asoció con la resistencia de E.

Las substituciones en el gen del *embB* fueron encontradas por el análisis de SSCP en 15 (45%) y por secuenciación en 17 (52%) de los 33 aislados resistentes a E. SSCP reveló una mutación del nucleótido en el codón M306 en cinco (15%) de 33 aislados MDR susceptibles a E **(64,74)**.

Entre el 2002 y 2004 Tanil Kocagoz y colaboradores en Turquía estudiaron 96 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina (R) y 23 susceptibles a utilizando la cepa H37Rv. Se uso la prueba de PCR en tiempo real para la amplificación y detección de la región del gen *rpoB* que determina la resistencia a rifampicina (R) en *M. tuberculosis*. Se utilizaron las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv, ATCC, 25177 (no presentan mutaciones en el gen *rpoB*) como control a la prueba. En este estudio la detección de resistencia a R, por la PCR en tiempo real, mostró resultados de una sensibilidad de 92,7% y especificidad del 100% comparado con los resultados obtenidos por el método convencional de las proporciones **(75)**.

*Surendra K. Sharma* en el 2004 en la india realizaron una revisión acerca de la TB-MDR causada por *Mycobacterium tuberculosis* resistentes tanto a H y a R, con o sin resistencia a otros fármacos. Este es un fenómeno que amenaza con desestabilizar los programas mundiales de control de la TB. La TB-MDR es un problema mundial, estando presente en prácticamente todos los países que fueron encuestados. Según la OMS y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), la mediana de prevalencia de MDR-TB ha sido del 1,1% en los pacientes recientemente diagnosticados. La proporción, sin embargo, es considerablemente mayor (mediana de prevalencia de 7%) en pacientes que han recibido previamente tratamiento contra la TB. Si bien los factores genéticos de acogida pueden contribuir al desarrollo de la MDR-TB, tratamientos incompletos e insuficientes es el factor más importante para su desarrollo. Ejecutar eficazmente los programas de control de la TB basado en una política de tratamiento (DOTS), son esenciales para prevenir la aparición de la MDR-TB **(76)**

En Turquía Elif Aktas y colaboradores en el 2005 realizaron una caracterización molecular de la resistencia a fármacos en *Mycobacterium tuberculosis*, con esta caracterización buscaban generar información útil para el desarrollo de métodos moleculares que sean ampliamente aplicables para la detección rápida de resistencia a los medicamentos. La caracterización molecular se realizó analizando las secuencias de ADN de los genes asociados a resistencia.



Analizaron mutaciones genéticas asociadas con isoniazida (H) y rifampicina (R) de 29 aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos. Las mutaciones puntuales se han detectado en los codones 531, 516, 526, y 513 gen de la subunidad de la ARN polimerasa (*rpoB*) en 10 (47,6%), cinco (23,8%), tres (14,3%), y tres (14,3%), de los 21 aislamientos resistentes a R. De los cinco aislamientos con mutaciones en el codón 516, tres también tenían mutaciones en el codón 527, una tenía una mutación en el codón 572 concurrentes. Las mutaciones en el codón 315 de la catalasa-peroxidasa-gen codificante (*KatG*) fueron encontradas en 17 (63,0%) de los 27 aislamientos resistentes a H. Curiosamente, la mutación en el codón 315 *KatG* se observó a una frecuencia mucho mayor en cepas MDR que en aislamientos mono resistentes a H (79% vs 25%). Este estudio proporcionó la primera caracterización molecular de la resistencia a H y R de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* aislados en el este de Turquía, y ha ampliado el conocimiento de las bases moleculares de la resistencia a los medicamentos de *M. tuberculosis* (77).

Fernández y colaboradores analizaron la situación actual en el mundo sobre la prevalencia de resistencia a medicamentos de primera línea, los mecanismos de acción de los medicamentos antituberculosos de primera línea y de adquisición de resistencia de las micobacterias. La resistencia de *M. tuberculosis* a los medicamentos antituberculosos es la amplificación hecha por el hombre de un fenómeno natural. La administración del tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) parece ser la forma más efectiva de disminuir esta resistencia, pero se requiere del esfuerzo concertado de los gobiernos y de la sociedad (78).

Durante el 2005 en Estados Unidos Xing Tang y colaboradores desarrollaron un protocolo basado en microarreglos para la detección de los genes de *Mycobacterium tuberculosis* asociados con la resistencia a los fármacos. Inicialmente desarrollan un microarreglo para detectar e identificar las secuencias objetivo de genes que contienen los puntos de mutación *rpoB* y *katG*. Sin embargo, la ocurrencia de alguna hibridación no específica llevó al desarrollo de un protocolo basado en una PCR específica combinada con los microarreglos. Este protocolo se evaluó descubriendo las mutaciones de *M. tuberculosis* de los genes *katG* y del gen *rpoB*. La metodología permitió que sucesiones que contienen mutaciones solas del punto objetivo se puedan diferenciar prontamente de las sucesiones del tipo salvajes. Además usaron este protocolo con éxito para descubrir e identificar varios puntos de mutaciones en los genes *rpoB*, *rpsL*, y *katG* (79).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

- Analizar los tipos de mutaciones más frecuentes en los genes *rpoB*, *katG*, *InhA*, *embB*, *rpsL* y *pncA* que determinan la resistencia a los fármacos antituberculosos de primera línea en aislados colombianos de *Mycobacterium tuberculosis*

### 4.2 Objetivos específicos

- Realizar la prueba de susceptibilidad a Pirazinamida por la técnica estándar de proporciones múltiples.
- Amplificar y secuenciar los genes *rpoB*, *katG*, *InhA*, *embB*, *rpsL* y *pncA* en aislados colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a los antituberculosos de primera línea.
- Caracterizar las mutaciones en los genes asociados a resistencia en aislados colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* que expresan diferentes perfiles de sensibilidad.
- Estandarizar un ensayo molecular basado en PCR alelo específico (AS-PCR) para la detección simultánea de mutaciones en los genes blancos de los antituberculosos de primera línea.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Obtención de las muestras

Para este estudio se utilizaron un total de cuarenta aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* colombianos provenientes de diferentes partes del país. 39 aislados fueron suministrados por el laboratorio de Micobacterias del INS y todos tenían el perfil fenotípico de resistencia a Isoniazida, Rifampicina, Estreptomina y Etambutol (**Anexo 1**). De igual manera se incluyó un aislado clínico de la ciudad de Armenia poli-resistente que fue suministrado por el Laboratorio Departamental del Instituto Seccional de Salud del Quindío. Como control fue incluida la Cepa de Referencia H37Rv que es susceptible a todos los fármacos antituberculosos.

### 5.2 Prueba de Susceptibilidad a los fármacos

El aislado clínico de *Mycobacterium tuberculosis* proveniente de la ciudad de Armenia fue clasificado como resistente fundamentándose en el uso de la técnica simplificada de las proporciones múltiples de Canetti, Risk y Grosset utilizando el medio de cultivo lowenstein jensen (LJ) (**Anexo 2**). Utilizando esta misma técnica de las proporciones múltiples se realizó la prueba de susceptibilidad a la Pirazinamida para los cuarenta aislamientos clínicos usados en este estudio ya que estas cepas no tenían el perfil de resistencia a Z (**Anexo 2**).

### 5.3 Extracción y cuantificación de ADN

La extracción del ADN genómico total fue realizado siguiendo el protocolo comúnmente usado para micobacterias (Van Embden J. 1998) (**Anexo 3**). El ADN fue visualizado por medio de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,0% teñidos con bromuro de etidio al 5% y corridos a 100 voltios por 45 minutos; la estimación de la concentración del ADN se realizó comparando las muestras con estándares de concentración conocida ( $\lambda 50\text{ng}/\mu\text{l}$ ) (**Anexo 4**) y posteriormente almacenadas en alícuotas de 30  $\mu\text{l}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su preservación.

## 5.4 Diseño de los Cebadores para la amplificación de los genes asociados a Fármaco Resistencia

Utilizando el programa Gene Runner (80) y secuencias de ADN de la base de datos de *Mycobacterium tuberculosis* del instituto Pasteur <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/> se diseñaron *In-silico* 6 pares de cebadores (Tabla 3) para amplificar los genes asociados a resistencia. Se tuvieron en cuenta algunos parámetros como el tamaño del oligonucleotido, temperatura fusión (TM), especificidad, secuencias complementarias y los sitios polimorficos de los genes que están asociados a resistencia.

**Tabla 3.** Cebadores diseñados para amplificar los genes asociados a fármaco resistencia.

Gen Blanco	Primers Dirección	Secuencia de Nucleótidos	Posiciones	TM	Tamaño del Amplificado (pb)
<b>rpoB</b> (Rifampicina)	rpoBF (Ida)	5'- GGGCCCGGCGGTCTGTCAC -3'	1357-1375	76.5	340
	rpoBR (Reverso)	3'- GCACGTA CTCCACCTCGC - 5'	1696 a 1679	62.6	
<b>embB</b> (Etambutol)	embBF (ida)	5'- GGCTTCCTGCTCTGGCAT -3'	856 a 873	64.3	786
	embBR (Reverso)	3'- GCGCGGTGATCAAAAAGC - 5'	1642 a 1625	66.2	
<b>pncA</b> (Pirazinamida)	pncAF (ida)	5'- GGCGTCATGGACCCTATATC -3'	-80 a 61	63.4	670
	pncAR (Reverso)	3'- CAACAGTTCATCCCGGTTCC - 5'	590 a 572	61.8	
<b>rpsL</b> (Estreptomina)	rpsLF (ida)	5'- CCAACCATCCAGCAGCTGGT -3'	4 a 23	69.4	572
	rpsLR (Reverso)	3'- GTCGAGAGCCCGCTTGAGGG - 5'	575 a 556	73.3	
<b>katG</b> (Isoniazida)	katGF (ida)	5'- GTGCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAAC -	1 a 32	88.0	2223
	katGR (Reverso)	3'- TCAGCGCACGTCGAACCTGTGCGAG - 5'	2223 a 2200	80.4	
<b>inhA</b> (Isoniazida)	inhAF (ida)	5'- ACATACCTGCTGCGCAATTC -3'	7 a 26	65.3	1469
	inhAR (Reverso)	3'- CATCCAGTTGTAGGCCGGCAT - 5'	1456 a 1476	71.4	

## 5.5 Amplificación de los genes asociados a Fármaco Resistencia

Utilizando los seis pares de cebadores listados en la tabla 3 se amplificaron por PCR seis regiones de los genes asociados a resistencia a cinco fármacos antituberculosos de primera línea (R, H, Z, S, E). Para los genes *katG*, *rpsL* y *pncA* se amplificaron los genes completos. Para *embB* y *rpoB* se amplificaron solo las regiones donde están reportadas el mayor porcentaje de mutaciones, esto debido al gran tamaño del gen. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) incluyo 3µl de ADN (alrededor 50 ng/µl), 2,5 µl Buffer de reacción [10X], 6 µl de agua, 4µl de dNTPS [2,5 µM], 4µl de cada cebador [3,5 µM], 3µl de MgCl [25 mM] y 1U de Taq polimerasa [1U = 0,25 µl]. Para el protocolo de termorregulación se uso un termociclador TECHNE TC-512.

Se probaron 2 diferentes perfiles de temperaturas para la amplificación. El primer perfil y que proporcionó los mejores resultados fue 5 minutos a 96°C y posteriormente 30 ciclos bajo 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 45 segundos, 72°C durante 4 minutos, y un paso de extensión final de 5 minutos a 72°C. EL segundo perfil consistió de 7 minutos a 96°C y posteriormente 30 ciclos bajo 95°C durante 1 minuto, 68°C durante 45 segundos, 72°C durante 4 minutos, y un paso de extensión final de 7 minutos a 72°C. Ambos con una duración de 3 horas con 50 minutos. Para ambos perfiles se tomaron las precauciones iniciales que incluyeron controles negativos (Mezcla de PCR remplazando el ADN por agua) para descartar contaminación y asegurar la fidelidad de la reacción. Los productos amplificados fueron visualizados por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,0% teñidos con bromuro de etidio y corridos a 100 voltios por 2 horas; el tamaño de los amplificados fueron estimados comparándolos con los tamaños de los fragmentos del patrón de peso molecular del marcador Hypper ladder II (2Kb, Bionline Corp.).

### **5.6 Análisis de las secuencias obtenidas por secuenciación**

Para la secuenciación los productos de PCR fueron purificados empleando el paquete de Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, con los cuales se retiraron restos de nucleótidos, cebadores, dNTPs y enzimas empleadas durante la amplificación, evitando la interferencia de estos durante la secuenciación. El proceso de secuenciación de estos productos fue realizado por la compañía Macrogen (Korea) en un Multi – Color Capillary Electrophoresis (ABI 310 - 3100) en una sola dirección usando los cebadores descritos anteriormente (**tabla 3**) a una concentración de 10 picomolar.

Las secuencias de ADN de los genes de resistencia fueron analizadas por medio de comparaciones, editadas (quitando regiones de inicio y final) y ensambladas en los programas Chromas (**81**) y Bioedit (**82**). Cada cambio de nucleótido encontrado en las secuencias individuales que fue registrado en la cepa de referencia fue considerado como una mutación. Para definir las mutaciones encontradas en cada aislado se compararon las secuencias obtenidas versus las reportadas en la base de datos de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa de referencia H37Rv susceptible a los fármacos) del Instituto Pasteur (Tuberculist Home page <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Estas comparaciones se realizaron por medio de un análisis en blastn (NCBI Home page <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y en Clustal W (Clustal W Home page <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) que son programas que permiten comparar secuencias para realizar análisis permitiendo observar cambios entre ellas.

## 5.7 AS-PCR

Se realizó un ensayo AS-PCR, el ensayo dirigido al codón 315 del gen *katG* en aislamientos resistentes a isoniazida (HR). Se diseñaron los cebadores 5'-CGATCACCACCGGCATC -3' y 3'-AGCGCACGTGCGAACCTGT -5'. Estos cebadores amplifican directamente el codón mutado y el tipo de mutación más común reportado en la literatura (sustitución AGC x ACC), así cuando existe la mutación para la cual están diseñados los cebadores se da un amplificado de 1289 pb. En ausencia de la mutación no hay amplificación. No se utilizaron controles positivos para esta mutación ya que no tenemos cepas secuenciadas en esta región.

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) incluyó 3 µL de ADN (alrededor 50 ng/µl), 2.5 µl Buffer de reacción [10X], 6 µl de agua, 4 µl de dNTPS [2,5 µM], 4 µl de cada cebador [3,5 µM], 3 µl de MgCl [25 mM] y 1U de Tucan Taq DNA polimerasa [1U para 1000 pb]. Para el protocolo de termorregulación se usó el termociclador TECHNE TC-512. Se utilizó un perfil de termorregulación de 5 minutos a 96°C y posteriormente 30 ciclos bajo 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 45 segundos, 72°C durante 4 minutos, y un paso de extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de AS-PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%.

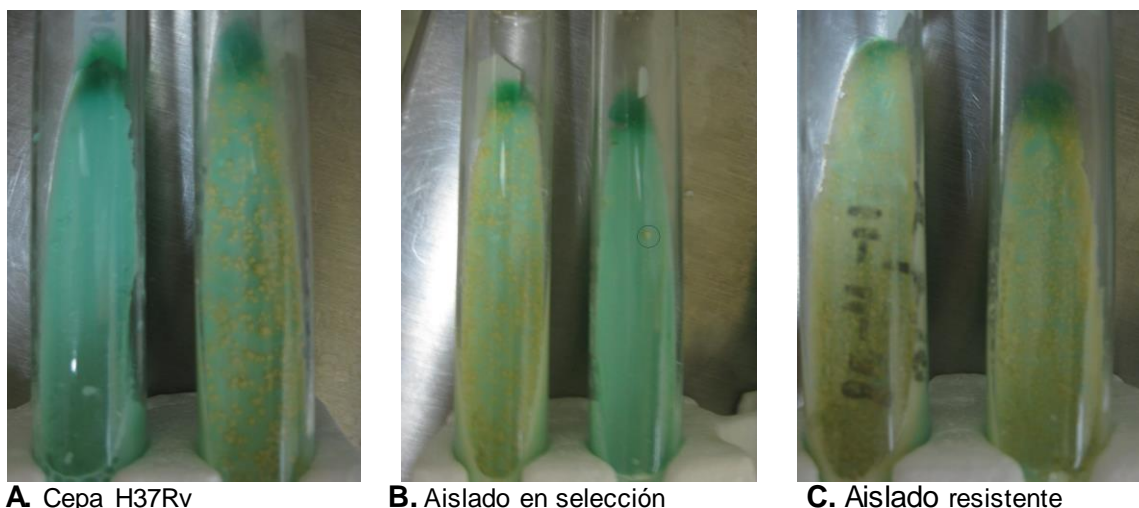
En paralelo a este análisis con los resultados de la secuenciación de ADN, el análisis de las mutaciones encontradas en los genes y con reportes de algunos estudios se diseñaron unos cebadores para una PCR-AS que permitan detectar resistencia en aislados clínicos amplificando los codones asociados a resistencia. Se realizaron ensayos *in-silico* con la cepa de referencia H37Rv y utilizando el programa Gene Runner (80) y un servidor de biología molecular que permite realizar simulaciones de algunos experimentos, en este caso PCR (<http://insilico.ehu.es/>).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Prueba de Susceptibilidad a los Fármacos

Entre los cuarenta aislamientos clínicos se hallaron diez cepas multi-drogo-resistentes (MDR) mostrando resistencia a H y R a la vez y de igual forma estas diez cepas MDR resultaron resistentes al menos a otro fármaco. Veinte cepas fueron poli-resistentes, y solo una cepa fue mono-resistente (cepa 39 a E). La cepa utilizada en este estudio proveniente de Armenia resulto resistente a todos los fármacos antituberculosos de primera línea. La cepa de laboratorio H37Rv fue susceptible a todos los fármacos probados.

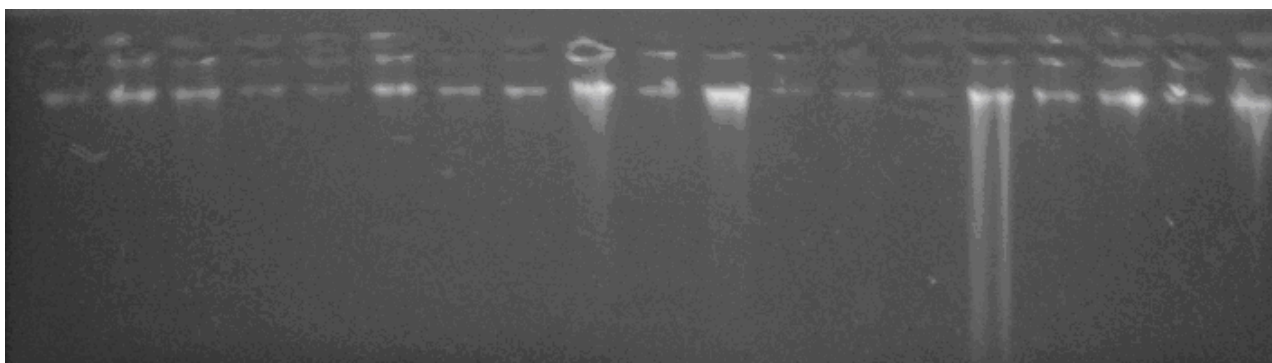
La prueba de susceptibilidad a pirazinamida (Z) (**Fig. 7**) mostró que de los cuarenta aislamientos diecinueve tiene resistencia a ZR (**Anexo 1**).



**Figura 7.** (A) se refiere a la prueba de susceptibilidad a Z para la cepa de referencia H37Rv, el tubo de la izquierda que es el medio de cultivo LJ con el antibiótico se observa que no hay unidades formadoras de colonias, lo contrario sucede en un medio LJ sin antibiótico donde se observan bastantes unidades formadoras de colonias (UFC) lo que demuestra la susceptibilidad de la cepa de referencia a la Z. (B) se observa una selección de cepas resistentes, el tubo de la izquierda que es el medio de cultivo LJ sin antibiótico se observan bastantes unidades formadoras de colonias (UFC) mientras en el tubo de la derecha donde no deberían haber UFC para cepas susceptibles se observa una UFC lo que indica una selección de cepas resistentes a Z. (C) se observa una cepa resistente donde hay crecimiento tanto en el medio sin antibiótico como en el medio con antibiótico.

## 6.2 Extracción de ADN, Amplificación y Secuenciación de los genes asociados a resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*

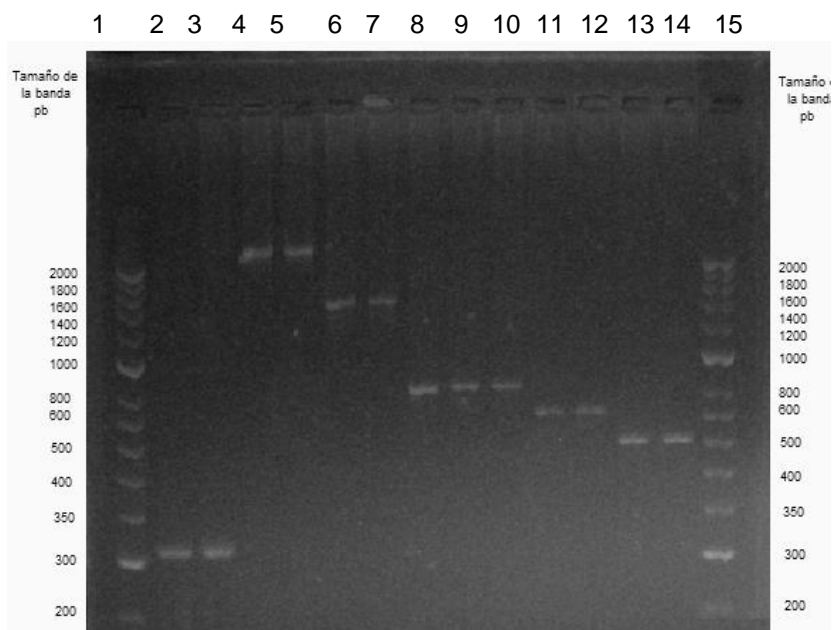
Se realizó una comparación entre las muestras con estándares de concentración conocida ( $\lambda 50\text{ng}/\mu\text{l}$ ) (**Anexo 4**) y las obtenidas por nosotros. Se observó que el ADN de los cuarenta aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* así como el de la cepa de referencia no estaba degradado, igualmente se obtuvo en una concentración de aproximadamente  $\lambda 0,20\text{ ng}/\mu\text{l}$  (basados en comparación) (**Fig. 8**). Este fue estimado por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.



**Figura 8.** Visualización del ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* en gel de agarosa al 1%.

Utilizando los 6 pares de cebadores previamente diseñados (tabla 3) se optimizó un proceso de PCR para amplificar las seis regiones de los genes asociados a resistencia en los 40 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. Las regiones amplificadas varían en longitud, desde 340 pb hasta 2223 pb (**Tabla 3**). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa [1%] que fueron teñidos con bromuro de etidio (**Fig. 9**). El ADN genómico de la cepa H37Rv y de los 40 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* fueron amplificados por PCR. Cada PCR g una sola banda lo que indica que la PCR es confiable para su uso en aislados clínicos de *M. tuberculosis*.

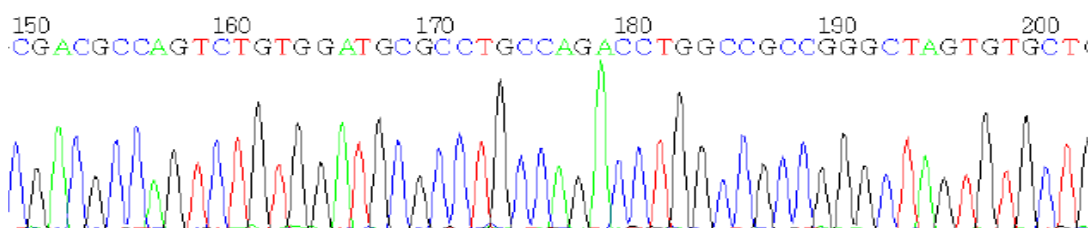




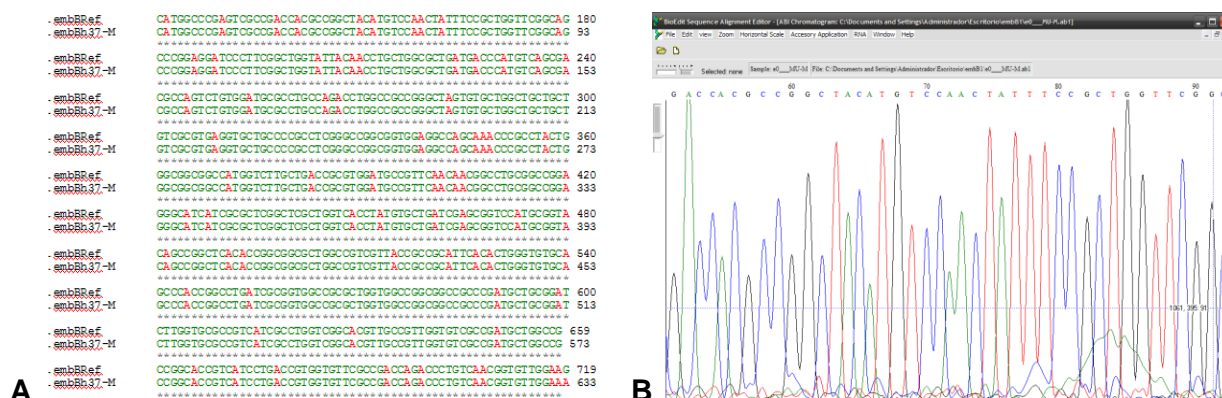
**Figura 9.** Amplificación de productos por PCR en aislados clínicos de *M. tuberculosis* y en la cepa de referencia H37Rv. Los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Línea 1 y línea 15, marcador de peso molecular 2-Kpb. Línea 2, gen *rpoB* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 3 gen *rpoB* en aislado clínico. Línea 4, gen *katG* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 5 gen *katG* en aislado clínico. Línea 6, gen *inhA* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 7 gen *inhA* en aislado clínico. Línea 8, gen *embB* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 9 y línea 10 gen *embB* en aislados clínicos. Línea 11, gen *pncA* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 12 gen *pncA* en aislado clínico. Línea 13, gen *rpsL* en *M. tuberculosis* H37Rv. Línea 14 gen *rpsL* en aislado clínico.

### 6.3 Secuenciación de *rpoB*, *embB*, *rpsL*, *mabA-inhA*, *katG*, *pncA*, en *M. tuberculosis*

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en MacroGen (korea) utilizando los cebadores listados en la tabla 3. Las secuencias fueron obtenidas por secuenciación para regiones asociadas a resistencia en los genes *rpoB*, *katG*, *embB*, *rpsL* y los promotores *mabA-inhA* y *pncA*. Las mutaciones fueron identificadas por secuenciación en los 40 aislamientos clínicos se muestran en la (tabla 5). Después de ser editadas y alineadas las secuencias utilizando clustal W y Blastn quedaron con una longitud variable presentando picos bien definidos (Fig. 10). Igualmente se secuenciaron estos genes para la cepa de referencia H37Rv como control negativo de mutaciones (Fig 11). Para los seis genes de la cepa de referencia involucrados en este estudio la identidad fue de 100%.



**Figura 10.** Ejemplo de un cromatograma de un aislado clínico de *M. tuberculosis* (gen *rpoB*) empleando el cebador *rpoBF* (ida).



**Figura 11. (A)** Alineamiento entre la secuencia de la cepa de referencia H37Rv de la base de datos de Micobacterias del instituto Pasteur con la secuencia obtenida por el proceso de secuenciación de la cepa H37Rv, 100% de homología entre secuencias. **(B)** Se observa el cromatograma para el resultado de la secuenciación de la cepa H37Rv con picos bien definidos y confiables.

### 6.3.2 *rpoB*

Se secuenciaron 9 aislados resistentes a R, obteniéndose una secuencia de 340 pb que contiene la región central de '81 pb' donde se reportan la mayor parte de las mutaciones en el gen *rpoB*, se presentaron 20 mutaciones en este caso sustituciones en algunos de los codones 516, 521, 526, 531. 2 aislados tenían un solo punto de mutación, 3 aislados con dos mutaciones puntuales y 4 aislados presentaron mutaciones en tres codones. Las veinte mutaciones detectadas fueron resultado de sustituciones y no se presentaron deleciones. De las 20 mutaciones nueve no se encontraron reportadas (**tabla 4**).

### 6.3.3 *embB*

Cinco aislamientos resistentes a E fueron secuenciados, en el producto secuenciado estaba incluida la región del codón 306, asociada a altos niveles de resistencia y que se ha identificado en aproximadamente el 65% de los aislados clínicos resistentes a etambutol (**58**). De los cinco aislamientos secuenciados en dos no se presentaron mutaciones. En tres aislamientos resistentes se hallaron mutaciones en el codón 306. Dos aislamientos tenían un único punto de mutación en este codón y el aislamiento restante tenía dos puntos de mutación, una mutación en el codón 306 y la otra mutación es una sustitución no reportada en el codón 564 (G X C) (CGC x CCC) (**tabla 4**).

#### 6.3.4 *rpsL*

Veintiséis aislamientos fueron secuenciados para el gen *rpsL*, el gen se amplificó y se secuenció completo para buscar mutaciones en los codones 43 y 88. De 26 aislamientos secuenciados en doce de ellos no se encontraron mutaciones (**Tabla 4**). En ocho aislamientos se encontraron mutaciones solamente en el codón 43, en cinco se encontraron mutaciones en el codón 88 y solo en un aislamiento se encontraron mutaciones en los codones 43 y 88 simultáneamente.

#### 6.3.5 *mabA-*inhA**

A 18 aislamientos resistentes a H se les secuenció el promotor del gen *inhA*, incluyendo la región que está relacionada aproximadamente al 25% de los casos de resistencia a H, se encontraron trece mutaciones entre sustituciones y deleciones. De los dieciocho aislamientos secuenciados seis de ellos no presentaron mutaciones en la región estudiada. En tres aislamientos se encontraron sustituciones en la región promotora de los genes *mabA-*inhA** (codón -15 corriente abajo *inhA*). En 3 aislamientos se encontraron inserciones de un nucleótido. En otros 3 aislamientos se encontraron de a dos mutaciones puntuales (sustituciones) y en los 2 aislamientos restantes se encontró un único punto de mutación. (**Tabla 4**). Excepto para las mutaciones en los tres aislamientos con sustituciones en el codón -15, todas las otras diez mutaciones que están asociadas al gen *mabA* no han sido reportadas.

#### 6.3.6 *katG*

A 18 aislamientos se les secuenció el gen *katG* asociado con resistencia a H, aunque el producto de PCR para el gen *katG* fue de 2223 pb amplificando el gen casi completo, en el proceso de secuenciación solo se obtuvo un producto de 400 pb. No se pudieron obtener las regiones asociadas a resistencia en este gen (codón 315). Solo en tres de los dieciocho aislamientos secuenciados para el gen *katG* se encontraron mutaciones (sustituciones) (**Tabla 4**). No se encontraron otras mutaciones para los otros aislamientos analizados en la secuencia que comprende las 400pb iniciales del gen *katG*.

**Tabla 4.** Resultados de la secuenciación de ADN para los 40 aislamientos clínicos Fármaco-Resistentes Procedentes de Colombia.

Gen	Numero Aislamientos / Numero mutaciones	Codón H37Rv Secuencia / Aminoácido (Numero Mutaciones)	Mutaciones Secuencia / Aminoácido	Tipo de Mutación	Numero de Aislamientos Fármaco-Resistentes Con la mutación
<i>rpoB</i>	<b>9 / 20</b>	516 GAC / Asp (3)	GAA / Glu * GCC / Ala	Mutación Neutra Mutación cambio de sentido	1 2
		521 CTG / Leu (5)	GTG / Val * ATC / Ile * ATG / Met TAG / Stop	Mutación neutra Mutación neutra Mutación neutra Mutación sin sentido	1 2 1 1
		526 CAC / His (7)	ATC / Ile * CCA / Pro * AAC / Asn ACC / Thr TGC / Cys	Mutación cambio de sentido Mutación cambio de sentido Mutación cambio de sentido Mutación cambio de sentido Mutación cambio de sentido	1 1 1 1 3
		531 TCG / Ser (5)	CTG / Leu * ACG / Thr * ACC / Thr * GCT / Ala *	Mutación cambio de sentido Mutación neutra Mutación neutra Mutación cambio de sentido	1 2 1 1
<i>embB</i>	<b>5 / 4</b>	306 ATG / Met (3)	ATA / Ile ATC / Ile GTG / Val	Mutación neutra Mutación neutra Mutación neutra	1 1 1
		564 CGC / Arg (1)	CCC / Pro *	Mutación cambio de sentido	1
<i>rpsL</i>	<b>26 / 15</b>	43 AAG / Lys (9)	GCG / Ala * AAT / Asn * AGG / Arg ATG / Met * ACG / Thr	Mutación cambio de sentido Mutación cambio de sentido Mutación silenciosa Mutación cambio de sentido Mutación cambio de sentido	2 2 2 2 1
		88 AAG / Lys (6)	ACT / Thr* AAT / Asn * AAC / Asn * ACC / Thr * ACG / Thr *	Mutación cambio de sentido Mutación cambio de sentido Mutación cambio de sentido Mutación cambio de sentido Mutación cambio de sentido	2 1 1 1 1
<i>mabA - inhA</i>	<b>18 / 13</b>	-15 ACG / Thr	ATG / Met	Mutación cambio de sentido	3
		91 CAG / Gln	CCG / Pro *	Mutación cambio de sentido	1
		173 Inserción (C)	C *	Mutación cambio marco lectura	1
		130 Inserción (T)	T *	Mutación cambio marco lectura	1
		157 Inserción (T)	T *	Mutación cambio marco lectura	2
		131 GCG / Ala	TCG / Ser *	Mutación cambio de sentido	1
		107 AGC / Ser	TGC / Cys *	Mutación Neutra	1
		132 TCG / Ser	TCT / Ser *	Mutación silenciosa	2
137 CCG / Pro	TCG / Ser *	Mutación cambio de sentido	1		
<i>katG</i>	<b>18 / 3</b>	49 CCA / Pro	CCC / Pro *	Mutación silenciosa	1
		74 CGC / Thr	CCC / Pro *	Mutación cambio de sentido	1
		134 CTG / Leu	GTG / Val *	Mutación Neutra	1

\* Mutación no reportada previamente

### 6.3.7 *pncA*

A causa de la gran variedad de mutaciones reportadas para el gen *pncA* se secuenció el gen completo para los 19 aislamientos resistentes a Z, así como para la cepa de referencia H37Rv. Cuando se realizó el alineamiento en clustalW con el gen *pncA* de la cepa de referencia H37Rv se presentó un valor de similitud cercano al 100% (**Fig. 12**). Cuando se realizaron los alineamientos con las secuencias de los otros aislamientos que fueron secuenciados, se observó que había múltiples mutaciones (inserciones, deleciones, sustituciones) presentando poca similitud a lo largo del gen (**Fig. 13**), por lo que estas mutaciones no fueron reportadas y no fueron tenidas en cuenta.

```
.pncARef          ATGCGGGCGGTTGATCATCCGTCGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCG 60
.pncAH37Rv       NNGTNGCTATTGAT-ATCCGTCGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCG 60
                  * *          *****
.pncARef          GTAACCGGTGGCGCCGCGCTGGCCCGCGCCA TCAGCGACTACCTGGCCGAAAGCGCGGAC 120
.pncAH37Rv       GTAACCGGTGGCGCCGCGCTGGCCCGCGCCA TCAGCGACTACCTGGCCGAAAGCGCGGAC 120
                  *****
.pncARef          TACCATCACGTCGTGGCAACCAAGGACTTCCACATCGACCCGGGTGACCAC TTCTCCGGC 180
.pncAH37Rv       TACCATCACGTCGTGGCAACCAAGGACTTCCACATCGACCCGGGTGACCAC TTCTCCGGC 180
                  *****
.pncARef          ACACCGGACTATTCTCGTCGTGGCCACCGCATTCGCTCAGCGGTACTCCCGGCGCGGAC 240
.pncAH37Rv       ACACCGGACTATTCTCGTCGTGGCCACCGCATTCGCTCAGCGGTACTCCCGGCGCGGAC 240
                  *****
.pncARef          TTCATCCCAGTCTGGACACGTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTTCGTAGCTACCTACACC 300
.pncAH37Rv       TTCATCCCAGTCTGGACACGTCGGCAATCGAGGCGGTGTTCTTCGTAGCTACCTACACC 300
                  *****
.pncARef          GGACGCTACAGCGGCTTCGAAGGAGTCGACGAGAACGGCACGCCACTGCTGAATTGGCTG 360
.pncAH37Rv       GGACGCTACAGCGGCTTCGAAGGAGTCGACGAGAACGGCACGCCACTGCTGAATTGGCTG 360
                  *****
```

**Figura 12.** Alineamiento en CLustalW entre la cepa de referencia H37Rv que fue secuenciada (*pncAH37Rv*) con la cepa de referencia H37Rv (*pncARef*) de la base de datos de Micobacterias del instituto Pasteur.

```
.pncA009          TTAGAAAACCAAGCTACGTATGCGAGAAGAGTACTTTTGAAGTGCCGGAAA --- ACCAGA 269
.pncA7            TCA TAA TTCCAAGCTACGTGTGGACAAGAA -ACTTTGTCGGG CAGGAAA --- ACTC -A 265
.pncA36           TTAGAGTACTAC-TGACGTATGCGACGGAAA --CTCATGTGC- -CCGGAT --- TTCACA 256
.pncA39           TTAGAAAACCAAGCGCATCGCAGAAGATGACACTTGACGTGCCGGAAA --- ACCAGA 265
.pncA4            CTGCAAACCG --CTATGGAT -GCCAAGAAT --CATTTGTTCTGAGGAATG --- ATCCTG 255
.pncA23           CTGCGCTACCCGCTGGTGGACGGCCAGGGCA -ACTTCGGCTCGCCAGGCAAT-GACCCAC 270
.pncA27           TTACAATA CCCGTTGGAGGTCGGACAGGAAA -ACTTTTGA-CGTCCCTGAAG-GATCCAC 263
.pncA2            GTGAAAACCGG -TGGAGGAT -GCTAAAAA --CTTTGATCTGCGGGATG --GAATAGA 254
.pncARef          AGTCTGGACACGTCGGCA -ATCGAGGCGGTGTTCTACAAGGTGCC TACACCGAGCGTA 308
.pncAH37Rv       AGTCTGGACACGTCGGCA -ATCGAGGCGGTGTTCTACAAGGTGCC TACACCGAGCGTA 308
.pncA29           TCTGTGGACACGTTGACA -ATCGAGGCGGTCTTCTACAACGGTGCCTACACCGGAGCACA 354
.pncA25           AGGCTGCCCTG -CGGACA AAGGGCGTCTCTTAGGCGGGTGACAAAGGTTGAACGCA 346
.pncA9            TTCGGAGTCA CCTTTTCTCTGGACGACTTCTTTCTCTCGTTCGCCATCGGTTTACCATC 261
                  * *
.pncA009          TGACTATCTTAAAGACCATTCT -GAGCA -TGCA GAGATGCTGATCTT CATGT CATAATG 327
.pncA7            TGACTATCTTAAAGACAATTCT -GACCT -TGTA - -TTGCCGA -CTT CATGT CATAATG 320
.pncA36           TGACT -TGTTTAAAGACAATG -T -GACCC -CAACTCAGACCCGA --CTCATG - -AAAATG 308
.pncA39           TGACTTCTTAAAGACCATTCT -GAGGAATGCCAAAATGCTGATCATCATGTCTGATGG 324
.pncA4            AGA ---- TCTATGAATCCTTCT -GACTT --TTCATTTGCTGA --CTTCTATCATATG 305
.pncA23           CGGCGCGGATGAGGTAACCCCA -AACCA TA -CACAGATGCTGATCTT CATGT CATAACG 328
.pncA27           GGGTAG -GTTATGAACAATTCT -GACTATAGCAGATGCTGATCTT CATGT CATAATG 321
.pncA2            GAAT --- CCCAGATGCAATTCT -GACCA --TG TGAATTGGA TCTT AGTGTCTG -TG 305
.pncARef          CAGCGGCTTCGAAGGAGTCGACGAGAAGGCGACGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACG 368
.pncAH37Rv       CAGCGGCTTCGAAGGAGTCGACGAGAAGGCGACGCCACTGCTGAATTGGCTGCGGCAACG 368
.pncA29           CCTCTGT TAAAGGAGTCTACTAGAGCCACCCCTCTGCTGAATTGGGTGCCGAAACG 414
.pncA25           CAGCTT -CTGAAATGAAAAAGATAACG -TCCGCTATGCTGTTTT - - - - - 391
.pncA9            GAAACGACCCGCTATATCGTCC -CATGTGGCCTTTGGTGTCCA TGTGCTTTAACCTTG 320
                  *
```

**Figura 13.** Alineamiento en CLustalW entre las secuencias obtenidas del gen *pncA* para 13 aislamientos comparados. Similitud del 3.6% para las secuencias comparadas. De 120 nucleótidos solo 3 fueron conservados entre las 13 secuencias comparadas.

Los resultados de secuenciación de ADN para el gen *pncA* en los 19 aislamientos resistentes a Z no fueron los esperados, por lo tanto no se pudieron conocer las mutaciones asociadas a resistencia a Z en este gen. A causa de esto se realizó una comparación por medio de un alineamiento en Clustal W entre los genes *pncA* de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* (**Fig 14**) para observar diferencias entre ambos genes. Esta comparación se realizó para poder identificar algún blanco específico de la Z en la bacteria, debido a que la Z es activa sobre *M. tuberculosis* pero no sobre *M. bovis* ni la mayoría de las otras Micobacterias, se encontró una similitud del 78,31% entre ambas secuencias, con 121 polimorfismos simples de un solo nucleótido situados a lo largo del gen.

```

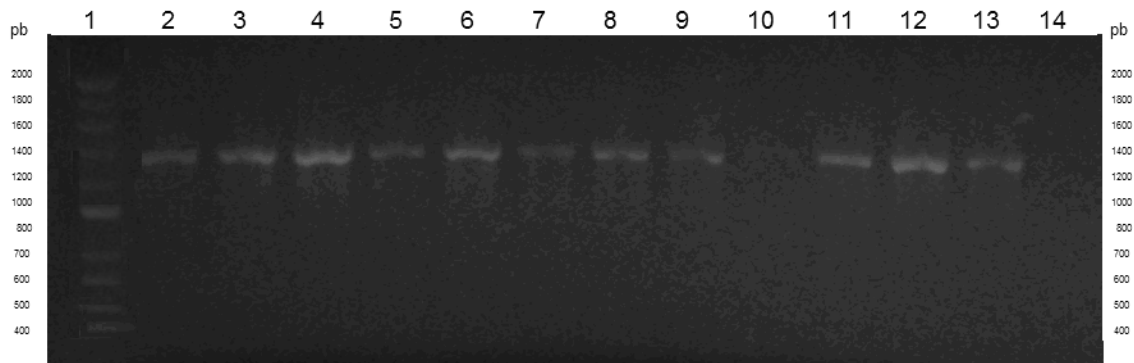
.pncAH37Rv      ATGCGGGCGTTGATCATCGTCGACGTGCAGAACGACTTCTGCGAGGGTGGCTCGCTGGCG  60
.pncABovis      ATGCGCGCGCTGATATATGTTGGATGTGCAGAACGATTTTTCGGAAGGCGGACGCCTGGCG  60
                ***** ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.pncAH37Rv      GTAACCGGTGGCGCGCGTGGCCCGCCATCAGCGACTACCTGGCCGAAAGCGCGGCAC  120
.pncABovis      GTGACCGGC GGCGCGCGCGTGGCGCGCGGATTAAGCATATCTGGCGAAGCGCGGCAT  120
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.pncAH37Rv      TACCATCACGTCGTGGCAACCAAGGACTTCCACATCGACCCGGGTGACCCACTTCCTCCGGC  180
.pncABovis      TATCATCATGTGGTGGCGACCAAGATTTTCATAATTGATCCGGGCGATGATTTAGCGGC  180
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.pncAH37Rv      ACACCGGACTATTCCTCTCGTGGCCACCAGCATTGCGTCAGCGGTACTCCGGCGCGGCAC  240
.pncABovis      ACCCCGGATATATAGCAGCACTGGCCGCCATTGCGTGAGCGGCACC CGCGGCGCGGAT  240
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.pncAH37Rv      TTCCATCCCAGTCTGGACACGTGCGCAATCGAGGCGGTGTTCTACAAAGGTGCCATACACC  300
.pncABovis      TTTCATCCGAGCCTGGATACACGCGCGATGAAGCGGTGTTTATAAAGGCGCGTATACC  300
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.pncAH37Rv      GGAGCGTACAGCGGCTTGAAGGATCGACGAAACGGCCAGCCACTGCTGAATGCGCTG  360
.pncABovis      GGCGCGTATAGCGGCTTGAAGGCGTGATGAAACGGCCAGCCACTGCTGAATGCGCTG  360
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.pncAH37Rv      CCGCAACGCGGCGTCGATGAGGTCGATGTGGTGGTATTGCCACGATCATTTGCTGCGC  420
.pncABovis      CGCCAGCGCGGCGTGGATGAAGTGGATGTGGTGGGATTTGCCACGATCATTTGCTGCGC  420
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.pncAH37Rv      CAGACGGCCGAGGACGCGGTACGCAATGGCTTGGCCACCAGGCGTGGTGGACCTGACA  480
.pncABovis      CAGACCGCGGAAAGATGCGGTGCGCAACGGCCTGGCGACC CGCGTGGTGGATCTGACC  480
                ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.pncAH37Rv      GCGGGTGTGTCGGCCGATACACCGTCGCGCGCTGGAGGAGATGCGCACCGCCAGCGTC  540
.pncABovis      GCGGGCGTGAAGCGGATACACCGTCGCGCGCTGGAGGAGATGCGCACCGCCAGCGTC  540
                ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
.pncAH37Rv      GAGTTGGTTGCGAGCTCCTGA  561
.pncABovis      GAACTGGTGTGCAGCAGC---  558
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figura 14.** Alineamiento en CLustalW entre los genes *pncA* de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*.

#### 6.4 Reacción en cadena de Polimerasa Alelo Específica (PCR- AS)

La PCR - AS diseñada para amplificar la mutación más frecuente del codón 315 del gen *katG* en aislamientos resistentes a isoniazida (HR) detecto la mutación en este caso la sustitución AGC x ACC en doce de veintitrés aislamientos resistentes generando una banda de 1289pb (**Fig. 15**). Los productos obtenidos por PCR-AS fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%.



**Figura 15.** Amplificación por PCR-AS del codón 315 del gen *katG* en aislamientos resistentes a isoniazida (HR) en doce aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Línea 1, Marcador de peso molecular 2-Kpb. Línea 2 a Línea 13 son los doce aislamientos resistentes a isoniazida donde se amplificó la mutación (1289 pb). Línea 14, Cepa de referencia H37Rv control negativo.

Con el análisis de los resultados obtenidos y las mutaciones encontradas desarrollamos unos cebadores alelo específicos para detectar resistencia en los genes *rpoB*, *katG*, *mabA-inhA*, *embB*, *rpsL* de *Mycobacterium tuberculosis* (Tabla 5). Estos cebadores fueron probados *in-silico* utilizando la cepa de referencia H37Rv y algunas secuencias de aislados clínicos fármaco resistentes. Se amplificaron fragmentos que variaron desde 318 hasta 1287 pb dependiendo del gen y la mutación objetivo, demostrando que amplifican las regiones deseadas (codones 511, 516, 521, 526, 531 *rpoB*, codones 315 y 463 *katG*, codon -15 región promotora de *inhA*, codon 306 *embB* y los codones 43 y 88 para *rpsL*) asociadas con la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos antituberculosos de primera línea.

**Tabla 5.** Cebadores para la PCR – AS. Detectan mutaciones asociadas a resistencia de *M. tuberculosis* a R, E, S, H.

Mutación objetivo	Cebador Alelo específico (5' – 3') Ida	Cebador Alelo específico (3' – 5') Reverso	Tamaño del Amplificado (pb)
<i>rpoB</i> 511 – 516 <i>rpoB</i> 518 – 523 <i>rpoB</i> 526 - 531	CTGAGCCAATTCATGGAC GAACAACCCGCTGTCCG CCACAAGCGCCGACTGTCC	<i>rpoBR</i> (Reverso) Ver tabla 3	409 388 364
<i>katG</i> 315 <i>katG</i> 463	GCGATCACCAGCGGCATC CCAGATCCGGGCATCG	<i>katG</i> (Reverso) Ver tabla 3 <i>katG</i> (Reverso) Ver tabla 3	1287 843
<i>mabA-inhA</i> -15	CGCGGCGAGACGATAGGT	GCATACGAATACGCCGAGAT	1177
<i>embB</i> 306	CTACATCCTGGGCATGGCC	<i>embBR</i> (Reverso) Ver tabla 3	739
<i>rpsL</i> 43 <i>rpsL</i> 88	CCACTCCGAAGAAGCCGAAC GGGTGAAGGACCTGCCTG	<i>rpsL</i> (Reverso) Ver tabla 3	456 318

## 7. DISCUSIÓN

Este método basado en secuenciación de ADN es útil para detectar y diagnosticar aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes, especialmente cepas MDR.

Comparando los hallazgos de este trabajo con los estudios que se han realizado por medio de secuenciación de ADN existe concordancia con las mutaciones más comunes en el gen *rpoB* en cepas de *M. tuberculosis* resistentes a R demostrando que la resistencia a R en *M. tuberculosis* se explica en un 96% a 100% por mutaciones en el gen *rpoB* las cuales generalmente se localizan en un corto segmento de aproximadamente 81 pb que incluye los codones 507 a 533 del gen *rpoB* (**Fig. 3**). Este estudio encontró 20 mutaciones en los nueve aislamientos secuenciados (100%). Nueve de estas mutaciones no reportadas se encontraron exactamente en cuatro codones 516, 521, 526, 531, los cuales hacen parte de la región central del gen *rpoB* (**Tabla 4**) (**43, 44,45, 83, 84, 85, 86**).

Nosotros hallamos doce de veinte mutaciones en los codones 526 y 531 y se ha observado como mutaciones en estos codones (526 531) tienen un costo biológico en la micobacteria, visto como una tasa de menor crecimiento *in-Vitro* y en los macrófagos (**87**). Aunque estas mutaciones tienen un costo biológico también se ha visto como mutaciones en estos dos codones están asociadas con altos niveles de resistencia (MIC > 32 mg/ml) lo que las hace completamente resistentes a la R siendo cepas mas difíciles de tratar ya que se hace necesario utilizar antibióticos de segunda línea, además se cree que tienen una ventaja selectiva en la supervivencia cuando se compara con otras mutaciones en este gen (**88**). Las ocho mutaciones restantes están en los codones 516 y 521 aunque asociadas a niveles de resistencia menores siguen siendo altos (CIM > 8 - 16 mg/ml).

Aunque son tres los genes paralogos de arabinosoltransferasas, *embC*, *embA*, y *embB* que han sido propuestos como blanco de etambutol (E), las mutaciones en *embB* se encuentran en un 47% a 69% de los aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a E (**89**), además la mayoría de aislamientos resistentes a E exhiben mutaciones en el gen *embB* asociadas con altos niveles de resistencia (**90**). Por esta razón fue que nuestro método para el diagnostico de aislamientos resistentes a E se baso en secuenciar una región del gen *embB* (41.94%), precisamente para conocer la secuencia del codón 306 en los aislamientos resistentes ya que la mayoría de mutaciones en cepas resistentes se han encontrado en este codón (**Fig. 6**).



Mediante análisis de aislamientos de *M. tuberculosis* cultivadas de pacientes antes y después del desarrollo de la resistencia a E se han identificado sustituciones en el codón 306, estas mutaciones no han sido encontradas en organismos susceptibles, y también fueron encontradas en cepas ER de *M. smegmatis* además experimentos de transferencia génica en *M. smegmatis* han mostrado que las mutaciones en *embB* confieren resistencia a E.

Nosotros pudimos detectar la mutación en el codón 306 en tres de los cinco aislamientos resistentes a E (60%) y adicionalmente identificamos una nueva mutación en una de estas tres cepas resistentes (**tabla 4**). En dos de estos aislamientos se encontró la sustitución de la Metionina 306 por una Valina, mutación que está asociada con altas tasas de resistencia a E (CIM > 40 mg/ml). Las otras dos sustituciones restantes en el codón 306 remplazaron la Metionina por Isoleucina, mutación asociada con una tasa de resistencia de (20 mg/ml). Estos datos son consistentes con la idea de que las sustituciones de aminoácidos específicos en *embB* afectan negativamente la interacción de E con un análogo putativo de arabinosa y *embB* probablemente sea un arabinosiltransferasa. En conjunto la sustitución de aminoácidos en el codón 306 del gen *embB* participa en la resistencia a E, actuando como marcadores indirectos de organismos resistentes al medicamento.

Mutaciones asociadas con resistencia a estreptomicina (S) en *M. tuberculosis* se han identificado en el gen *rrs* que codifica para el ARN ribosomal 16S y el gen *rpsI* que codifica la proteína ribosomal S12 (**91**). A diferencia de otras bacterias que tienen múltiples copias de ARN polimerasa, los miembros complejo *M. tuberculosis* poseen una sola copia. Por lo tanto, los cambios de un solo nucleótido en estos genes potencialmente pueden producir resistencia a los antibióticos. La mayoría de las mutaciones puntuales que inducen resistencia a S se producen en el gen *rpsL*, siendo esta la razón principal por la que decidimos secuenciar el mencionado gen. Las mutaciones comumente más reportadas asociadas a resistencia a S para el gen *rpsL* se han encontrado principalmente en el codon 43 seguidas con menos frecuencia por mutaciones en el codón 88 (**Fig. 6**) (**91, 92**).

Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio ya que cuando analizamos las secuencias de los veintiséis aislamientos resistentes a S que fueron secuenciados encontramos quince mutaciones nueve de ellas en el codón 43 y seis en el codón 88, sin embargo estas quince mutaciones no fueron similares a las reportadas en estos estudios ya que doce fueron nuevas mutaciones.

Mutaciones análogas se han observado en cepas resistentes a S (SR) en varias especies de bacterias, presumiblemente porque la proteína ribosomal S12 está altamente conservada. Aunque las primeras observaciones sugieren que las cepas resistentes a estreptomicina crecen más lentamente que las cepas de tipo salvaje, el resultado de varios estudios con aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a S mostró que las cepas aisladas en la práctica clínica tienen la misma virulencia que las cepas silvestres **(93, 94)**.

Aunque se localizaron mutaciones en catorce de los veintiséis aislamientos secuenciados (53,84%) no se encontraron mutaciones en doce de ellos, lo que puede sugerir la existencia de otros mecanismos de intervención en la resistencia a S, como lo pueden ser cambios en la permeabilidad celular, la producción de enzimas modificadoras de aminoglucosidos y alteraciones en otras moléculas ribosomales **(91)**. En resumen, dos tercios de las cepas resistentes de *M. tuberculosis* a S tienen mutaciones detectables asociadas a este gen. Lo que hace pensar en la existencia de al menos un mecanismo adicional de resistencia a S, deben dirigirse estudios moleculares para identificar los genes o mecanismos involucrados en este proceso.

Varios estudios como los realizados por Zhang y colaboradores **(95)** han demostrado que los genes *katG* e *inhA* son objetivos farmacológicos de la H. Nosotros identificamos mutaciones en dieciséis de dieciocho aislamientos resistentes a H (88,8%). Con el análisis de un gran número cepas resistentes en varios países se han encontrado mutaciones en los genes *inhA* y *katG* asociados con aislamientos resistentes a isoniazida (HR). La mayoría de mutaciones reportadas para el gen *katG* comprende sustituciones en los codones 315 y 463 **(Fig. 1)** explicando aproximadamente el 50% de los casos de aislados clínicos resistentes a H **(37,39)**.

Aunque se hizo el esfuerzo de amplificar el gen *katG* completo para poder conocer mutaciones a lo largo del gen, en el proceso de secuenciación solo se obtuvieron secuencias en parciales de 400 pb, debido a esta razón no se pudo conocer las secuencias de los codones 315 y 463 ya que estas quedaron por fuera de la región secuenciada. Para los dieciocho aislamientos clínicos resistentes a H que fueron enviados a secuenciar para el gen *katG* solo se encontraron mutaciones para tres aislamientos en la región inicial del gen de 400pb, estas mutaciones nuevas están reportadas en la **tabla 4**.

A pesar de que no se pudo conocer la secuencia para estos dieciocho aislamientos por el proceso de secuenciación, fue posible detectar la mutación más frecuente en el codón 315 del gen *katG* para doce aislamientos resistentes (Sustitución AGC x ACC). Estas mutaciones fueron detectadas por medio de la AS-PCR que se diseñó para amplificar la mutación en el codón 315 en aislamientos resistentes a isoniazida (HR) (**Fig. 15**). Esto coincide con resultados reportados por otros investigadores donde este tipo de mutación es la más común (**35, 39**).

Es importante resaltar los resultados de la AS-PCR, esto confirma que es posible generar una PCR-AS para detectar mutaciones asociadas a resistencia en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. Esta vez no se diseñaron los cebadores alelo específicos para amplificar una mutación en específico, sino que estos fueron diseñados para amplificar el codón que está asociado a mayores tasas de mutación en cepas susceptibles (**Tabla 5**). Se han realizado ensayos *in-silico* demostrando que los cebadores diseñados para la PCR-AS amplifican las regiones deseadas pero esperamos probarlos en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a los antibióticos de primera línea.

Estudios de genética molecular de mutantes resistentes a H identificaron un operón con dos genes contiguos *mabA-InhA* (**Fig. 2**) que codifican productos que participan en la resistencia a H estando involucrados en la biosíntesis de ácidos micólicos (**96**). Aunque algunos reportes indican que la sustitución en el codón 94 del gen *inhA* de una serina por una alanina es la mutación de mayor asociación a cepas resistentes a H se ha encontrado como en otros reportes de análisis de secuencias de ADN del locus *inhA* en 115 aislamientos clínicos HR se hallaron sustituciones en el codón 16 del gen *inhA* pero curiosamente ninguna sustitución en el codón 94 (**97, 98**).

Otros estudios de aislados clínicos HR mostraron diversos aislados con la presencia de una sustitución de una C por una T en el codón -15, región promotora para los genes *mabA-InhA* (presumiblemente es el sitio de unión del ribosoma) (**98**).

Es por esta razón que decidimos secuenciar la región promotora para los genes *mabA-InhA*, ya que la mayoría de mutaciones reportadas se encuentran en esta región, así mismo otro motivo que nos llevó a elegir esta región es que se ha observado como aislamientos resistentes a H con ausencias de mutaciones en el codón 315 del gen *katG* tienen mutaciones en la región promotora de los genes *mabA-InhA*.

En total fueron secuenciados dieciocho aislamientos resistentes a H, se secuenció una región cercana a las 500pb, que incluía la región promotora de los genes *mabA-InhA* y una parte del gen *mabA*. En estos dieciocho aislamientos se encontraron trece mutaciones entre sustituciones y deleciones, pero cabe resaltar que tres aislados resistentes tenían la sustitución en el codón -15, región promotora de los genes *mabA-InhA*. Con la secuenciación de esta región se lograron identificar diez mutaciones nuevas asociadas al gen *mabA* (**tabla 4**). Estos resultados son muy importantes ya que son pocas las mutaciones reportadas en este gen.

Aunque no pudimos reportar mutaciones en el gen *pncA* asociadas a resistencia a Z en aislados clínicos de *M. tuberculosis* debido a que las secuencias presentaron poca similitud y los resultados obtenidos por el proceso de secuenciación para este gen no fueron confiables, con el alineamiento realizado en CLustalW entre los genes *pncA* de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* se puede observar la relación que hay entre las mutaciones en este gen y la resistencia a Z. Aunque el mecanismo de acción de la Z no ha sido identificado completamente se logra establecer mediante este análisis como el gen *pncA* se encuentra involucrado en la resistencia a la Z, esto se puede ver analizando las diferencias que existen entre ambos genes para las dos especies de micobacterias. Diferentes estudios reportan diversas mutaciones ubicadas a lo largo del gen *pncA* asociadas a resistencia a Z (**Fig. 4**). Es importante realizar comparaciones de este gen entre *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de micobacterias para poder identificar tal vez de esta manera las mutaciones puntuales que hacen naturalmente resistentes a otras micobacterias a la Z.

Algunos investigadores han descrito mutaciones que causan sustituciones de aminoácidos pero no resistencia a los fármacos (**83, 99, 100**). En el presente estudio nosotros identificamos cincuenticinco mutaciones de las cuales veintinueve mutaciones no han sido reportadas previamente. Los perfiles de fármaco – resistencia de los aislamientos probados tuvieron una correlación con las distintas mutaciones que identificamos. La sensibilidad del método basado en secuenciación de ADN (es decir, la capacidad de detectar mutaciones en los genes asociados a fármaco resistencia) fue del 100%, 88,8%, 57,6% y 60% para R, H, S, E. Estos resultados indican que este método es útil para la detección de susceptibilidad en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* fármaco-resistentes en especial cepas MDR.

## 8. CONCLUSIONES

- Aunque se identificaron veintinueve mutaciones nuevas, doce de ellas se encontraron en lugares no reportados anteriormente como sitios polimorficos por lo que no podemos asegurar que estas se encuentran involucradas en el proceso de resistencia.
- La caracterización molecular de los genes asociados a resistencia contribuye al entendimiento de las bases moleculares de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*, demostrando que son puntos claves que aportan evidencia para implementar estrategias futuras que ayuden a combatir los microorganismos emergentes con resistencia a los agentes antimicrobianos.
- Este estudio ha confirmado como para los genes *rpsL*, *rpoB*, *katG*, *embB* las mutaciones involucradas en el proceso de resistencia a los fármacos están asociadas a pequeñas regiones, incluso codones dentro de estos genes.
- Hemos demostrado la utilidad de este método basado en secuenciación de ADN para la detección de mutaciones asociadas a resistencia a los fármacos en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. Este método resultó muy eficaz al evaluar con rapidez y eficacia cepas MDR.

## 9. RECOMENDACIONES

- La posible existencia de al menos un mecanismo adicional asociado a resistencia a S y E en *M. tuberculosis* hace necesario realizar estudios moleculares para identificar otros genes o mecanismos que pueden estar involucrados en el proceso de resistencia, así generando un valioso aporte al conocimiento de los diferentes mecanismos que pueden estar involucrados en el proceso de resistencia a los antimicrobianos en la especie.
- Es preciso realizar experimentos (mutagénesis específica) para poder conocer con más detalles los efectos de las mutaciones puntuales y las manifestaciones fenotípicas de las mutaciones que no han sido reportadas anteriormente.
- Con estos resultados se pueden implementar técnicas de biología molecular como la PCR-AS, la cual sugerimos para detectar resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea en pacientes enfermos con sospecha de resistencia
- Se sugiere la caracterización completa de los genes asociados a la resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea en aislados colombianos de *Mycobacterium tuberculosis* para poder observar si existen otras regiones polimórficas asociadas a resistencia en *M. tuberculosis*.
- Cuando se hallen mutaciones nuevas es importante realizar pruebas de sensibilidad a los medicamentos, debido a que estas mutaciones no necesariamente pueden estar asociadas con los procesos de resistencia a los fármacos.
- Poder suministrar un diagnóstico rápido y oportuno permitiría ubicar al individuo dentro de un programa que incluya una administración oportuna y estrictamente supervisada del medicamento adecuado disminuyendo así la propagación de la enfermedad y la generación de bacterias resistentes a los medicamentos.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Raviglione MC, Snider DE, and Kochi A. Global Epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of worldwide epidemic. JAMA 1995; 273: 220-226.
2. Dolin PJ, Raviglione MC and Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull WHO 1994; 72: 213-220.
3. Murray CJ and Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. Lancet 1997; 349: 1269-1276.
4. Drobnieski FA, Pablos-Méndez and Raviglione MC. Epidemiology of tuberculosis in world. Semin Respir Crit Care Med 1997; 18: 419-429.
5. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V and Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999; 282: 677-686.
6. Control mundial de la TB-Informe. Organización Mundial de la Salud. 2009. [www.who.int/tb/publications/global\\_report/es/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/).
7. Dye C, Williams BG, Espinal MA, Raviglione MC. Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. Science 2002; 15: 295: 2042-6.
8. World Health Organization. WHO Tuberculosis Programme: Framework for effective tuberculosis control. Geneva, Switzerland. 1994; WHO/TB/94: 179.
9. World Health Organization. Treatment of tuberculosis. Guidelines for national Programmes. Geneva, Switzerland. 1997; WHO/TB/97.220.
10. Loddenkemper R, Sagebiel D and Brendel A. Strategies against multidrug-resistant Tuberculosis. Eur Respir J 2002; 20:66S-77S
11. Seung KJ, Gelmanova IE, Peremitin GG, Golubchikova VT, Pavlova VE, Sirotkina OB, Yanova GV, Strelis AK. The effect of initial drug resistance on treatment response and acquired drug resistance during standardized short-course chemotherapy for tuberculosis. Clin Infect Dis 2004; 39: 1321-1328.
12. World Health Organization. Guidelines for establishing DOTS-Plus Pilot Project 2000. Geneva, Switzerland. 2000; WHO/TB/2000.279.
13. Sterling TR, Lehmann HP, Frieden, TR. Impact of DOTS compared with DOTS-plus on multidrug resistant tuberculosis and tuberculosis deaths: decision analysis. BMJ 2003; 26: 574-574.
14. WHO/IUATLD. Global project on Anti-tuberculous Drug Resistance Surveillance. Anti-tuberculous drug resistance in the world. World Health Organization publication 1997. Geneva, Switzerland. WHO/TB/97.229.
15. Crofton J, Chaulet P, Maher D. Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland. World Health Organization publication 1997. Geneva, Switzerland. WHO/TB 97.220.
16. Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, Cohn DL, Lambregts-van Weezenbeek CS, Kim SJ, Chaulet P, Nunn P and World Health Organization-

International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. *N Engl J Med* 1998; 338: 1641-1649.

17. Ramaswamy SV, Musser JM. Molecular genetics basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuberc Lung Dis* 1998 79:3-29

18. Riska E, Jacobs WR, Allan D. Molecular determinants of drugs resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 42: S4-S10.

19. Caminero J. Guia de la tuberculosis para médicos especialistas. Union internacional contra la tuberculosis y Enfermedades respiratorias (UICTER).2003

20. Aranaz, A., E. Liebana, E. Gomez-Mampaso, J. C. Galan, D. Cousins, A. Ortega, J. Blazquez, F. Baquero, A. Mateos, G. Suarez, and L. Dominguez. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49 Pt 3:1263-73.

21. D. Cousins, R. Bastida, A. Cataldi, V. Quse, S. Redrobe, S. Dow, P. Duignan, A. Murray, C. Dupont, N. Ahmed, D. M. Collins, W. R. Butler, D. Dawson, D. Rodriguez, J. Loureiro, M. I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga, A. Bernardelli. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003 53/1305–1314.

22. Frothingham, R., H. G. Hills, K. Wilson. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 1994. 32:1639–1643.

23. Fenton M, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 1996;64:683–690

24. World Health Organization. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. WHO Report 2004. WHO/HTM/TB/2004.331.

25. World Health Organization. WHO Tuberculosis Programme: Framework for effective tuberculosis control. Geneva, Switzerland. 1994; WHO/TB/94: 179.

26. World Health Organization. Treatment of tuberculosis. Guidelines for national Programmes. Geneva, Switzerland. 1997; WHO/TB/97.220.

27. Seung KJ, Gelmanova IE, Peremitin GG, Golubchikova VT, Pavlova VE, Sirotkina OB, Yanova GV, Strelis AK. The effect of initial drug resistance on treatment response and acquired drug resistance during standardized short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1321-1328.

28. World Health Organization. Guidelines for establishing DOTS-Plus Pilot Project 2000. 2000. Geneva, Switzerland. 2000; WHO/TB/2000.279.

29. Sterling TR, Lehmann HP, Frieden, TR. Impact of DOTS compared with DOTS-plus on multidrug resistant tuberculosis and tuberculosis deaths: decision analysis. *BMJ* 2003; 26: 574-574

30. Crofton J, Chaulet P, Maher D. Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland. World Health Organization publication 1997. Geneva, Switzerland. WHO/TB 97.220.



31. Sharma SK and Mohan A. Multidrug-resistant tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120: 354-376.
32. Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. *Eur Respir J* 2002; 36: 87s-94s.
33. Ramaswamy SV and Musser JM. Molecular genetics basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*:1998 update. *Tuberc Lung Dis* 1998;79: 3-29.
34. Riska E, Jacobs WR, Allan D. Molecular determinants of drugs resistance in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 42: S4-S10.
35. Telenti A. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax* 1998; 53: 793-797.
36. Cockerill FR. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 199-212
37. Zhang Y. Genetic Basis of isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 1993; 144: 143-149.
38. Zhang Y, Young D. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Mol Microbiol* 1993; 8: 521-524.
39. Heym B, Alzari PM, Honoré N, Cole S. Missense mutations in the catalaseperoxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 1995; 15: 235-245.
40. S. Ramaswamy, J. M. Musser. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 79: 3–29
41. Sacchettini JC and Blanchard JS. The structure and function of the isoniazid target in *M. tuberculosis*. *Res Microbiol* 1996; 147: 36-43.
42. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, De Lisle G and Jacobs WR, Jr. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994; 263: 227-230.
43. Telenti A, Honoré N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B, Takiff HE and Cole ST. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A blind study at reference laboratory level. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 719-723.
44. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole ST, Colston MJ, Matter L, Schoolfer K and Bodmer T. Detection of rifampin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341: 647-650.
45. Avkan Oguz V, Eroglu C, Guneri S, Yapar N, Oztop A, Sanic A, Yuce A. *RpoB* gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in the Aegean region of Turkey. *J Chemother* 2004; 16: 442-445.
46. Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, Navskaya O. Allele-Specific *rpoB* PCR Assays for detection of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemoter* 2003; 47: 2231-2235.

47. Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine* 1996; 2: 662-667.
48. Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J, Brum L. *pncA* mutations in pyrazinamideresistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 2736-2738.
49. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM. Mutations associated with pyrazinamide-resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemoter* 1997; 41: 636-640.
50. Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A, Bottger EC. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alteration of the ribosomal protein S12 gene and point mutation within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* 1993; 9: 1239-1246.
51. Tracevska T, Jansone I, Nodieva A, Marga O, Skenders G, Baumanis V. Characterisation of *rpsL*, *rrs* and *embB* mutations associated with streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 2004; 155: 830-834.
52. Kapur, V., L.-L. Li, M. R. Hamrick, B. B. Plikaytis, T. M. Shinnick, A. Telenti, W. R. Jacobs, Jr., A. Banerjee, S. Cole, K. Y. Yuen, J. E. Clarridge III, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1995. 119:131–138.
53. Honoré N, Cole ST. Streptomycin resistance in micobacteria. *Antimicrob Agents Chemoter* 1994; 38: 238-242.
54. 55. Musser, J. Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. *Clinical microbiology reviews*, 1995; 8, No. 4: 496 – 514
56. Belanger AE, Besra GS, Ford ME, Mikusova K, Belisle JT, Brennan PJ, Inamine JM. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93: 11919-11924.
57. Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM, Jacobs WR Jr. The *emb* operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Medicine* 1997; 3: 567-570.
58. Srinand sreevatsan,<sup>1</sup> kathryn e. Stockbauer,<sup>1</sup> xi pan,<sup>1</sup> barry n. Kreiswirth,<sup>2</sup> Soraya I. Moghazeh,<sup>2</sup> william r. Jacobs, jr.,<sup>3</sup> amalio telenti,<sup>4</sup> AND James m. Musser<sup>1,5</sup>. Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Critical Role of *embB* Mutations. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 1997. 41, No. 8: 1677 = 1681
59. Shamputa IC, Rigouts L, And Portaels F. Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens. *APMIS* 2004; 112: 728-752

60. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T and Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1993; 37: 2054-2058.
61. Yue J, Zeng EL, Xie JP, Li Y, Liang L, Wang HH. Molecular mutations of *rpoB* gene of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Yi Chuan Xue Bao* 2004; 31:1332-1336.
62. Hunt JM, Roberts GD, Stockman L, Felmlee TA, Persing DH. Detection of a genetic locus encoding resistance to rifampin in mycobacterial cultures and in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 18: 219-27.
63. Consuelo garzón t, Dailyn gálvez, Claudia polo, Dora gamboa. Vigilancia de la resistencia del mycobacterium tuberculosis a los medicamentos Colombia. *Biomedica* 2008; Vol 28, 003: 319 – 326.
64. Tracevska T, Jansone I, Broka L, Marga O, Baumanis V. Mutations in the *rpoB* and *katG* Genes Leading to Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. *J. Clin. Microbiol* .2002; 40: 3789-3792.
65. B.L. Mertz; R.W. Douce; N. Brito. Anti-tuberculosis drug resistance in two clinics in Ecuador. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, Volume 4, Number 2, February 2000, pp. 115-117(3)
66. Ozturk c., Balbay r, kaya D; Ceyhan I, Bulut I, Sahin ildris, The resistance to major antituberculous drugs of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from the respiratory system specimens of tuberculosis patients in Duzce, Turkey. *Japanese journal of infectious diseases* 2005, vol. 58, n°1, pp. 47-49.
67. César A., Héctor L., Nhora L. Arias, Martha C., Beatriz E. Ferro, Ernesto J, Resistencia inicial a fármacos antituberculosos en Buenaventura, Colombia. *Biomédica* 2004 ;24:73-9.
68. Lucy Baker, Tim Brown, Martin C. Maiden, and Francis Drobniwski. Silent Nucleotide Polymorphisms and a Phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*, 2004. Vol. 10, No. 9,
69. Róger E, Luis S, Neyda T, Walter G, Ysabel M. Detección rápida de resistencia a fármacos en *mycobacterium tuberculosis* mediante pcr-sscp y pcr-heteroduplex. *Peru Med Exp Salud Publica* 2003; 20 (2)
70. Christian B V, Neyda Q T, César B , Dauma G, José Pro C, Luis F. Llanos Z. Perfiles Genéticos (RFLP-*IS6110*) y resistencia a fármacos en aislamientos de *m. tuberculosis* de pacientes internados en un hospital referencial del callao, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2003; 20 (2).
71. C. Elif ozturk, Ahmet Sanic, Demet Kaya and Ismail Ceyhan. Molecular Analysis of Isoniazid, Rifampin and Streptomycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients with Tuberculosis in Düzce, Turkey. *Japanese journal of infectious diseases* 2005. vol 58, 309-312,

72. Caroline Lavender, Maria Globan, Aina Sievers, Helen Billman-Jacobe, and Janet Fyfe. Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Collected in Australia. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Oct. 2005, p. 4068–4074.
73. Zhenhua Yang; Durmaz Riza; Dong Yang; Gunal; Lixin Zhang; Foxman Betsy; Sanic Ahmet; Marrs Carl F. Simultaneous detection of isoniazid, rifampin, and ethambutol resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by a single multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR) assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 53 (2005) 201–208.
74. Tatjana Tracevska,\* Inta Jansone, and Viesturs Baumanis. Spectrum of *pncA* Mutations in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. 48(8): 3209–3210.
75. Tanıl Kocagöz, Zeynep Sarıbaş Alpaslan Alp, Ayfer Günalp. Rapid Detection of Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Heteroduplex Analysis and Determination of Rifamycin Cross-Resistance in Rifampin-Resistant Isolates. *J Clin Microbiol.* 2003. 41(2): 816–818.
76. Surendra K. Sharma, Alladi Mohan. Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Chest.* 2006; 130; 261-272
77. Elif aktas, riza durmaz, dong yang, and zhenhua yang. Molecular characterization of isoniazid and rifampin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from malatya, turkey. *Microbial drug resistance.* 2005. Volume 11, number 2
78. Salvador Said Fernández, Pola Becerril Montes, Gloria María Molina Salinas, Hugo Barrios García, Javier Vargas Villarreal. Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes. *Enfermedades Emergentes* 2005;7(1):13-19.
79. Xing Tang, Sheldon L. Morris, John J. Langone, and Larry E. Bockstahler. Simple and effective method for generating single-stranded DNA targets and probes. *BioTechniques.* 2006 . 6: pp 759-763.
80. Gene Runner Version 3.05.. A fairly old Windows sequence analysis tool for everyday lab use Hastings Software Inc. program for Windows 95/98/NT. 1994
81. Chromas Version 2.33.. *Chromas Lite* An application that will allow you to view sequences and chromatograms. Software Inc. program for Windows 95/98/NT. 1998 – 2008 Technelysium Pty Ltd.
82. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999. 41:95-98.
83. Zhang, Y., and A. Telenti. Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*,. *Americ Socie for Microb*, Washington, DC.. 2000. p. 235–254
84. Telenti, A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M. J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, and T. Bodmer. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993. 341:647–650.
85. Bodmer T, Zürcher G, Imboden P, Telenti A. Mutation position and type of substitution in the b-subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 345–348.

86. Taniguchi H, Aramaki H, Nikaido Y et al. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett 1996; 144: 103–108.
87. Deneke H. Mariam, Yohannes Mengistu, Sven E. Hoffner, Dan I. Andersson. Effect of *rpoB* Mutations Conferring Rifampin Resistance on Fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 2004, 48: 1289–1294
88. Morlock, G.P., B.B. Plikaytis, and J.T. Crawford. Characterization of spontaneous, in-vitro selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. Antimicrob. Agents. Chemother. 2000. 44:3298–3301
89. Sreevatsan, S., K. E. Stockbauer, X. Pan, B. N. Kreiswirth, S. L. Moghazeh, W. R. Jacobs, Jr., A. Telenti, and J. M. Musser. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. Antimicrob. Agents Chemother. 1997. 41:1677–1681.
90. Alcaide, F., G. E. Pfyffer, and A. Telenti. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 1997. 41:2270–2273.
91. Meier A, Sander P, Schaper K-J, Scholz M, Böttger E C. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother . 1996, 2452-2454
92. Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A, Böttger E C. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. Mol Microbiol 1993; 9: 1239–1246.
93. Pyle, M. M. 1947. Relative numbers of resistant tubercle bacilli in sputa of patients before and during treatment with streptomycin. Proc. Staff Meet. Mayo Clin. 22:465–473.
94. Bottger, E. C., B. Springer, M. Pletschette, and P. Sander. Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations. Nat. Med. 1998. 4:1343–1344.
95. Zhang, Y., B. Heym, B. Allen, D. Young, and S. Cole. The catalaseperoxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature 1992. 358:591–593.
96. Lefford M J. The ethionamide sensitivity of British pretreatment strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle Lond 1966; 47: 198–206.
97. Kapur V, Li L-L, Hamrick M R et al. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. Arch Pathol Lab Med 1995; 119: 131–138.
98. Musser J M, Kapur V, Williams D L, Kreiswirth B N, van Soolingen D, van Embden J D A. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazidresistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing:. J Infect Dis 1996; 173: 196–202.
99. Takiff, H. E., L. Salazar, C. Guerrero, W. Philipp, W. M. Huang, B. Kreiswirth, S. T. Cole, W. R. Jacobs, Jr., and A. Telenti. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. Antimicrob. Agents Chemother. 1994 38:773–780.

100. van Doorn, H. R., E. J. Kuijper, A. van der Ende, A. G. A. Welten, D. van Soolingen, P. E. W. de Haas, and J. Dankert. The susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and the Arg3Leu mutation at codon 463 of *katG* are not associated. *J. Clin. Microbiol.* 2001. 39:1591–1594.

## ANEXO 1

Aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* fármaco-resistentes utilizados en este estudio cada uno caracterizado con su perfil de resistencia.

Aislamientos Utilizados en este estudio					
Registro Valle	SUSCEPTIBILIDAD MEDICAMENTOS (INS)				CIBM
	S	H	R	E	
V-1	R	R	R	R	S
V-2	R	R	R	S	R
V-3	R	R	R	S	S
V-4	R	R	R	S	R
V-5	R	R	R	S	S
V-6	R	R	R	S	R
V-7	R	R	R	S	R
V-8	R	R	R	S	S
V-9	R	R	R	S	R
V-10	R	R	S	R	S
V-11	R	R	S	S	S
V-12	R	R	S	S	S
V-13	R	R	S	S	S
V-14	R	R	S	S	S
V-15	R	R	S	S	S
V-16	R	R	S	S	S
V-17	R	R	S	S	S
V-18	R	S	S	S	S
V-19	R	S	S	S	S
V-20	R	S	S	S	R
V-21	R	S	S	S	S
V-22	R	S	S	S	R
V-23	R	S	S	S	R
V-24	R	S	S	S	S
V-25	R	S	S	S	R
V-26	R	S	S	S	S
V-27	R	S	S	S	R
V-28	R	S	S	S	R
V-29	R	S	S	S	R
V-30	R	S	S	S	S
V-31	R	S	S	S	R
V-32	R	S	S	R	S
V-33	R	S	S	S	S
V-34	S	R	R	S	R
V-35	S	R	S	S	R
V-36	S	R	S	S	R
V-37	S	R	S	S	R
V-38	S	R	S	S	R
V-39	S	S	S	R	S
A-40 (Aislado Armenia)	R	R	R	R	R

<b>Z</b>	Prazinamida
<b>S</b>	Estreptomina
<b>H</b>	Isoniazida
<b>R</b>	Rifampicina
<b>E</b>	Etambutol
<b>R</b>	<b>Resistente</b>
<b>S</b>	<b>Sensibles</b>

## **ANEXO 2**

Prueba de susceptibilidad a los fármacos antituberculosos de Primera línea por la técnica de las proporciones múltiples en su variante simplificada

### INTRODUCCION

Desde el advenimiento de lo agentes micobacterianos para el tratamiento de la tuberculosis, los clínicos se han preocupado por las fallas al tratamiento. A pesar de la existencia de regímenes modernos, una proporción de pacientes puede presentar tuberculosis persistente o recaídas a causa de la emergencia de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos, los cuales pueden infectar a otros individuos causando resistencia inicial a los medicamentos.

Por lo tanto es necesario realizar pruebas de susceptibilidad para seleccionar los agentes antimicobacterianos apropiados para el tratamiento y monitoreo de la transmisión de los organismos resistentes. Los procedimientos utilizados en estas pruebas deben ser estandarizados, para emitir resultados consistentes y confiables de tal forma que se pueda tener resultados que permitan el manejo individual de los pacientes y para el manejo de todo lo concerniente con la salud pública al respecto.

Las pruebas de susceptibilidad a los medicamentos antituberculosos que se consideran como pruebas de referencia son la técnica de las proporciones múltiples de Canetti, Risk y Grosset en sus diferentes variantes utilizando el medio de lowenstein jensen (LJ) o el medio en agar Middlebrook; otra metodología de referencia es la técnica bactec 460, que tiene varios inconvenientes como son el uso de material radiactivo, equipo sofisticado y su costo elevado. Para los países en desarrollo como Colombia la técnica recomendada y utilizada es la técnica de las proporciones múltiples en su variante simplificada.

### ANTECEDENTES

La determinación de la susceptibilidad a los medicamentos por la técnica simplificada de las proporciones múltiples, se viene usando en el laboratorio de micobacterias del instituto nacional de salud, desde los años 70 del siglo pasado habiéndose obtenido muy buenos resultados de sensibilidad, especificidad, valores predictivos de resistencia y sensibilidad y eficiencia cuando el laboratorio supranacional correspondiente ha realizado un control de calidad externo al laboratorio de micobacterias. Esta metodología es la que se continúa utilizando y describe a continuación.

### DEFINICION DE TÉRMINOS



Resistencia: disminución de la sensibilidad a un medicamento a un grado suficiente como para estar razonablemente seguro de que el aislamiento en estudio es diferente de las cepas salvajes de tipo humano que nunca ha estado en contacto con el medicamento.

Para entender esta definición es necesario recordar que la resistencia de *M. tuberculosis* a los medicamentos es un fenómeno de mutación y selección, donde la mutación es espontánea y al azar, y la selección se da por la mala utilización de los medicamentos que seleccionan las mutantes naturalmente resistentes, ya sea por mala indicación del tratamiento o tratamientos irregulares debidos a la no adherencia a los medicamentos por parte del paciente.

Concentración crítica: Cantidad mínima de medicamento a la cual una cepa silvestre no se desarrolla. Por ejemplo: rifampicina = 40ug/ml.

Proporción crítica: Cantidad de crecimiento que se puede admitir sobre la concentración crítica para diferenciar resistencia de sensibilidad. Para la rifampicina es del 1%.

Medicamento	Concentración crítica (ug/ml)	Proporción crítica (%)
Estreptomina	4	1
Isoniazida	0.2	1
Rifampicina	4	1
Etambutol	2	1
Etionamida	30	10
Tioacetazona	2	10

## METODOS

### Material biológico

Aislamientos de bacilos ácido alcohol resistentes previamente identificados como *Mycobacterium tuberculosis*.

### Medios de cultivo

Medio LJ sin medicamento, 6 tubos por prueba

Medio LJ con medicamentos: Isoniazida (H), estreptomina (S), rifampicina (R), etambutol (E), Pirazinamida (Z) dos tubos por prueba.

### Material de laboratorio

Frascos con perlas de vidrio de diferentes tamaño, 1 por prueba.

Espátulas de madera, una por prueba.

Tubos secos, una por prueba.

Tubos con 9 ml de agua destilada estéril, 6 tubos por prueba.

Pipetas estériles de 1 ml, 6 por prueba.

Pipetas de 2 ml, una por prueba.

### Condiciones del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

Cultivo de cuatro a seis semanas de desarrollo.

Cultivo de desarrollo con 20 colonias como mínimo.

#### Montaje de la prueba

1. Raspar la totalidad del crecimiento del aislamiento del estudio de *M. tuberculosis* y llevarlo a un frasco con perlas de vidrio que contiene 0,5ml de agua destilada estéril, homogenizar por agitación en vortex durante 30 segundos.
2. Adicionar agua destilada estéril alrededor de 5ml y homogenizar.
3. Dejar en reposo y pasar el sobrenadante a un tubo vacío y llevar el homogenizado a una concentración de 1mg/ml de masa bacilar, lo cual se logra equilibrando la opacidad del cultivo a la del tubo n. 3 de la escala de MacFarland, utilizando agua destilada estéril ( $10^6$ s x  $10^8$  UFC/ml)
4. A partir de este tubo preparar diluciones en base 10, utilizando 9ml de agua destilada estéril y 1ml de la suspensión vacilar hasta llegar a una concentración de  $10^{-6}$  mg/ml.
5. Sembrar 2 tubos de LJ sin medicamento con 0.2ml de las diluciones:  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$  mg/ml de masa bacilar.
6. Sembrar un tubo de LJ que contiene la concentración crítica de cada medicamento utilizando 0.2ml de las diluciones:  $10^{-5}$ ,  $10^{-3}$  mg/ml de masa bacilar.
7. Esparcir el inóculo en el plano inclinado del tubo para permitir un crecimiento disperso que permita el recuento de colonias.
8. Llevar a incubación a 37° C, con las tapas flojas y asegurarlas a los 10 días de incubación.
9. Hacer la lectura a las 4 y 6 semanas

#### Lectura e interpretación de los resultados

1. Contar las UFC en los dos tubos de LJ sin medicamento de la dilución  $10^{-6}$  mg/ml y obtener el promedio.
2. Contar las UFC en los dos tubos de LJ sin medicamento de la dilución  $10^{-5}$  mg/ml y obtener el promedio.
3. Leer el desarrollo de los dos tubos de LJ sin medicamento de la dilución  $10^{-3}$  mg/ml y obtener el promedio. El desarrollo deberá ser masivo y se informara haciendo un calculo de las UFC a partir del promedio de la dilución de  $10^{-5}$  mg/ml, el cual debe guardar correlación con el de  $10^{-6}$  mg/ml. En esta dilución debe haber un desarrollo de 200 UFC o mas, si el desarrollo es mayor de 200 colonias , los resultados de la prueba no son validos por bajo recuento, ya que se podrían dar falsamente sensibles dado que una pequeña población y teniendo en cuenta que la proporción critica para la mayoría de los medicamentos es de 1%, los mutantes resistentes podrían no verse por efecto de la pequeña población y no de sensibilidad al medicamento, en estos casos la prueba se debe repetir por bajo recuento. Sin embargo en el medicamento que se observe resistencia se puede informar teniendo en cuenta que a pesar del bajo desarrollo se pudieron detectar las mutantes resistentes.
4. Contar las UFC de los tubos de LJ con medicamento de  $10^{-5}$  y  $10^{-3}$  mg/ml de masa bacilar.

5. Establecer la proporción de crecimiento para cada medicamento tomando como referencia el promedio de crecimiento en los tubos control LJ sin medicamento de la correspondiente dilución Ej.: en S crecieron 10 colonias en la dilución  $10^{-5}$  mg/ml y el promedio de crecimiento en los controles sin medicamento fue de 20 UFC, esto quiere decir que el 50% de la población total es resistente a S, teniendo en cuenta que la proporción crítica es del 1% ese aislamiento se considera resistente.

6. Antes de dar cualquier resultado se debe revisar el control de calidad del medio de cultivo utilizado. Si se presentó desarrollo superior al admitido en cualquier medicamento, no se puede informar ese medicamento ya que perdió su actividad antimicobacteriana permitiendo el desarrollo de la cepa de referencia y se estaría informando una falsa resistencia, se debe repetir la prueba para ese medicamento. En caso de encontrarse aislamientos sensibles en ese medicamento se pueden informar, ya que aun cuando la actividad del medicamento esta disminuida el aislamiento presenta sensibilidad.

### ANEXO 3

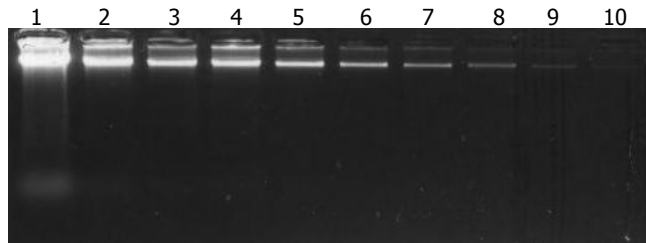
#### Aislamiento de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis*

1. Agitar en vortex el tubo donde se tiene guardada la cepa, tomar 200ul y sembrar en medio sólido lowenstein jensen e incubar a 37°C hasta tener crecimiento visible.
2. Obtener una masa bacilar a partir de una única colonia por raspado y transferir las células dentro de un tubo de microcentrífuga (1.7-2.0 mL de capacidad) que contenga 400 µL de solución tampón TE (Tris-EDTA)1x .
3. Calentar durante 20 minutos a 80°C por ebullición para inactivar las bacterias y dejar enfriar a temperatura ambiente.
4. Adicionar 50 µL de Lisozima de 10 mg/mL, mezclar mecánicamente por vortex e incubar toda la noche a 37°C o dos horas como mínimo.
5. Adicionar 80 µL de la mezcla SDS 10%/ Proteinasa K (70 µL y 10 µL respectivamente), mezclar por inversión e incubar 10 minutos a 65°C.
6. Adicionar 100 µL de NaCl 5M.
7. Adicionar 100 µL de solución CTAB /NaCl precalentada a 65°C durante 10 minutos. Mezclar manualmente por inversión hasta que el líquido sea blanco. Incubar 10 minutos a 65C.
8. Adicionar 750 µL de cloroformo/alcohol Isoamil (24:1), mezclar por inversión mínimo 10 segundos y centrifugar a temperatura ambiente por 10 minutos a 12000g.
9. Transferir la fase acuosa superior a otro tubo de microcentrífuga, teniendo en cuenta no contaminarla con la interfase blanca.
10. Añadir 0.6 volúmenes (500 µL) de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos y mezclar por inversión unas 20 veces.
11. Incubar 60 minutos a menos -20°C y centrifugar 20 minutos a 4°C a 12000g.
12. Descartar el sobrenadante lavar dos veces por centrifugación adicionando al pellet 1 mL de etanol al 70%.
13. Dejar secar el pellet a temperatura ambiente y resuspender el ADN genómico en 50 µL de tampón TE 0.1x. Resuspender a 65°C por una hora. El ADN genómico puede ser almacenado a 4°C o -20°C.

#### ANEXO 4

Estimación de la concentración de ADN por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio

1. Preparar un gel de agarosa al 1.0% en tampón TBE (Tris-Borato-EDTA) 0.5x con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL.
2. Tomar un 1µL de ADN y añadir tampón de carga con ARNasa y agua 1x hasta tener 10 µL de muestra.
3. Transferir la muestra a un pozo del gel y correr la electroforesis 45 minutos a 100 v.
4. Estimar la concentración de ADN usando el transiluminador UV por comparación.



**Contenido de ADN:** 1=1, 0=0.5, 3=0.25, 4=0.20, 6=0.17, 7=0.13, 8=0.11, 9=0.08 y 10=0.05