



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Caracterización molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes en el estado de Veracruz

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias Biomédicas

PRESENTA:

M en SP Betzaida Cuevas Córdoba

Director de tesis:

Dr. Roberto Zenteno Cuevas

Xalapa, Ver.

6 de Julio, 2012

Becario CONACYT No. 171183

Dr. Raúl Arias Lovillo

Rector

Dr. Porfirio Carrillo Castilla

Secretario Académico

Dr. César Ignacio Beristáin Guevara

Director General de Investigaciones

Dr. Alejandro Carlos Cuervo Vera

Director General del Área Académica de Ciencias de la Salud

Dr. Mario Miguel Ojeda Ramírez

Director General de la Unidad de Estudios de Posgrado

Dr. Mario Salvador Caba Vinagre

Director del Centro de Ciencias Biomédicas

Dr. José Enrique Meza Alvarado

Coordinador del Doctorado en Ciencias Biomédicas

JURADO

PRESIDENTE

Dr. Juan Santiago García
Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana

SECRETARIO

Dr. Abraham Soto Cid
Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Universidad Veracruzana

VOCAL

Dra. Carolina Barrientos Salcedo
Facultad de Bioanálisis, Campus Veracruz, Universidad Veracruzana

VOCAL

Dr. Roberto Tapia Conyer
Director General del Instituto Carlos Slim de la Salud

VOCAL

Dr. Ángel Ramos Ligonio
LADISER INMUNOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR
Facultad de Ciencias Químicas, Campus Córdoba-Orizaba, Universidad Veracruzana

TUTOR Y DIRECTOR DE TESIS

Dr. Roberto Zenteno Cuevas
Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Roberto Zenteno Cuevas en el laboratorio de Ecología y Salud del Instituto de Salud Pública de la Universidad Veracruzana, con el apoyo financiero de CONACyT-COVEyT proyecto No. 95819. Además del recurso del programa de becas para estudios de posgrado otorgado por el CONACYT No. de Becario 171183.

AGRADECIMIENTOS

Antes de iniciar la lectura de este trabajo me gustaría agradecer el infinito apoyo de quienes han estado cerca de mí tanto en la parte personal como en la académica.

A mi madre por su ejemplo de vida, paciencia, cariño y apoyo absoluto; porque siempre encontró una respuesta a mis innumerables porqués de la infancia y consideró que mi curiosidad era algo que no debía bloquearse.

A mi padre, porque sin su visión y apoyo no hubiera sido posible estar aquí y porque su carácter y fortaleza me enseñaron las más grandes lecciones de vida que aún me acompañan y mantienen siempre firme su recuerdo.

A mi abuelo de quien tuve mucho que aprender y me hubiera gustado tener más tiempo para compartir.

A mi hermana que me apoyó y acompañó en los momentos más difíciles de mi vida y que es un excelente complemento a muchas de las cosas que ignoro.

A mis primas Gaby y Xóchitl que siempre han estado pendientes de mi y han cumplido el rol de hermanas en muchísimos sentidos.

A mis amigas Sol, Myriam, Maribel, Erika, Mago, y mi amigo Paco; por su presencia en las buenas y las malas, por la compañía, consejos y apoyo que siempre me han brindado. Muchas gracias y ojalá continúen siempre en mi vida.

Gracias, porque gran parte de lo que soy se lo debo a la participación en diferentes grados de todos ellos.

Muchas gracias también al Dr. Zenteno por todo el apoyo de casi 7 años, por dejarme aprender echando a perder, por tomar en cuenta mis iniciativas, por permitirme pensar de forma independiente, por todo el tiempo y paciencia dedicado a la elaboración de este trabajo.

De igual forma muchas gracias al Dr. Juan y al Dr. Ángel por casi cinco años de seguir este trabajo, por los valiosos comentarios que me ahorraron mucho tiempo y enriquecieron no sólo esta tesis sino muchos aspectos de mi formación académica.

Gracias al Dr. Tapia, Dr. Soto y la Dra. Carolina por su disponibilidad, comentarios y tiempo invertido.

Muchas gracias al personal del laboratorio, en especial de la Sra. Lupita de quien aprendí muchas cosas; y al personal del Instituto de Salud Pública que de quien siempre tuve apoyo en muchos sentidos.

Finalmente y no menos importante gracias a la Mtra. Parissi, a la Q.C. Aremy y todo su equipo; quienes amablemente nos abrieron las puertas del Laboratorio Estatal de Salud Pública y proporcionaron muestras biológicas y datos sin los cuales este trabajo no hubiese sido posible.

ÍNDICE DE CONTENIDO:

1. Resumen.....	1
Abstract	2
2. Introducción	3
3. Antecedentes	4
3.1. Definición de tuberculosis	4
3.2. Epidemiología	5
3.3. Aspectos microbiológicos <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
3.3.1. Morfología y constitución química.....	9
3.3.2. Cultivo	11
3.3.3. Acción patógena	12
3.3.4. Mecanismo de infección.....	12
3.4. Aspectos clínicos de la Tuberculosis pulmonar.....	14
3.4.1. Sintomatología	14
3.4.2. Métodos de diagnóstico	15
3.4.2.1. Diagnóstico Clínico, Radiológico y de Laboratorio	15
3.4.2.2. Baciloscopía y Cultivo	15
3.4.3. Tratamiento.....	18
3.5. Drogorresistencia	19
3.5.1. Mecanismos moleculares generadores de drogorresistencia en fármacos de primera línea.	21
3.5.1.1. Estreptomina (S).....	21
3.5.1.2. Isoniacida (I).....	21
3.5.1.3. Rifampicina (R).....	23
3.5.1.4. Etambutol (E)	24
3.5.1.5. Pirazinamida (P).....	24
3.6. Métodos diagnósticos de TB-DR.....	27
3.6.1. Métodos fenotípicos o asociados a cultivo bacteriano	27
3.6.1.1. Método de las proporciones/BACTEC.....	27
3.6.1.2. Bactec MGIT 960	28
3.6.1.3. MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility assay)	28
3.6.1.4. Métodos de óxido reducción: Alamar azul, Resazurina y Actividad Nitroreductasa	29
3.6.1.5. Micobacteriófagos	30
3.6.1.5.1. Amplificación biológica de fagos, PhaB.....	30
3.6.1.5.2. Fagos reporteros de luciferasa (LRPs).....	31
3.6.2. Métodos diagnósticos Genotípicos o moleculares	31
3.6.2.1. Polimorfismo conformacional de hebra sencilla por PCR. (Polymerase Chain reaction single stranded conformational polymorphism, SSCP)	32
3.6.2.2. Ensayo de prueba en línea. LiPA (Line probe assay, LiPA)	32
3.6.2.3. GenoType MTBDRplus	33

3.6.2.4. Sistemas de detección por fluorescencia mediante PCR en tiempo real.....	33
3.6.2.5. Microarreglos de ADN, (DNA Microarray).	35
3.6.2.6. Secuenciación genómica.....	35
4. Justificación	38
5. Objetivos.....	39
6. Metodología	40
6.1 Diseño	40
6.2 Materiales y Método.....	42
6.2.1 Obtención de muestras clínicas y datos del paciente	42
6.2.2 Estandarización de técnicas moleculares	43
6.2.2.1 Extracción de ADN.....	43
6.2.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	43
6.2.2.2 Purificación de productos de PCR.....	45
6.2.2.3 Marcaje: Reacción cíclica con terminadores BigDye.....	46
6.2.2.4 Purificación de productos marcados	47
6.2.2.5 Secuenciación por electroforesis capilar	47
6.2.2.6 Análisis de mutaciones.....	48
7. Resultados	50
7.1 Aislados clínicos de Mycobacterias con perfil de sensibilidad a antibióticos	50
7.1.1. Caracterización general de los pacientes portadores del bacilo	50
7.1.1.1. Características socio-epidemiológicas	50
7.1.1.2. Características clínico-epidemiológicas.....	51
7.1.1.3. Perfiles de sensibilidad a drogas.....	52
7.2. Obtención de ADN y análisis de genes en las cepas de Mycobacterium tuberculosis	55
7.3. Análisis de mutaciones.	55
7.3.1. Análisis del gen <i>rrS</i> (Resistencia a Estreptomicina, S)	56
7.3.2. Análisis del gen <i>katG</i> (Resistencia a Isoniacida, I)	58
7.3.3. Análisis del gen <i>inhA</i> (Resistencia a Isoniacida, I).....	61
7.3.4. Análisis del gen <i>rpoB</i> (Resistencia a Rifampicina, R)	64
7.3.5. Análisis del gen <i>embB</i> (Resistencia a Etambutol, E)	67
7.3.6. Análisis del gen <i>pncA</i> (Resistencia a Pirazinamida, P).....	70
7.4. Asociaciones fenotípicas y genotípicas en TB-DR.....	74
7.4.1. Asociaciones entre variables epidemiológicas y resistencias farmacológicas (Fenotípicas).....	74
7.4.2. Asociaciones entre variables epidemiológicas y mutaciones (Genotípicas).77	
7.4.3. Asociaciones entre resistencias farmacológicas (Fenotípicas)	79
7.4.4. Asociaciones entre resistencias farmacológicas y mutaciones más frecuentes (Fenotipo & Genotipo).....	83
7.4.5. Asociaciones genotípicas entre mutaciones	85
8. Discusión	89
9. Conclusiones	101

10. Referencias bibliográficas:.....	102
11. ANEXOS.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tasa de Incidencia de TB, 1999-2008..-----	5
Figura 2: Tasa de Mortalidad por TB, 1999-2008.-----	6
Figura 3 Casos de TB pulmonar, México 2008.-----	7
Figura 4: Defunciones por TB pulmonar, México, 2008.-----	8
Figura 5: Defunciones por TB pulmonar, de acuerdo al grupo de edad. Veracruz 2008.-----	9
Figura 6: Microfotografía electrónica de Bacilos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .-----	10
Figura 7: Estructura de la pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -----	11
Figura 8: Imagen radiológica de tórax.-----	15
Figura 9: Baciloscopía mediante el método de tinción de Ziehl-Neelsen.-----	16
Figura 10: Diagrama de flujo para la obtención de información-----	42
Figura 11: Gel de agarosa al 1.5% que muestra productos de PCR de genes asociados a TB-DR-----	45
Figura 12: Gel de agarosa al 1.5% que muestra los productos purificados de PCR, de los genes a estudiar.-----	46
Figura 13: Izquierda: Espectroferograma de una secuencia del gen <i>rpoB</i> y Derecha: Barras QV de cada base-----	47
Figura 14: Tabla de equivalencias entre valores de calidad (QV) y probabilidad de error en la asignación de base.-----	48
Figura 15: Izquierda: Espectroferograma de una secuencia en sentido 5'-3' y 3'-5. Derecha: Barras QV para evaluar un cambio de base.-----	49
Figura 16: Gráfica Porcentajes de pacientes con cepas TB-DR por fármacoresistencia y género-----	54
Figura 17: Izquierda: Espectroferogramas de <i>rrS</i> mostrando bases mixtas y cambios de base no reportados. Derecha: Mutaciones de <i>rrS</i> reportadas como de alta confiabilidad en la Base de datos <i>TB-DRMDB</i> .-----	57
Figura 18: Izquierda: Espectroferogramas de <i>katG</i> mostrando los cambios de base no reportados. Derecha: Mutaciones de <i>katG</i> reportadas con alta confiabilidad en la Base de datos <i>TB-DRMDB</i> .-----	60
Figura 19 Izquierda: Espectroferogramas de <i>inhA</i> mostrando mutaciones no reportadas y bases mixtas. Derecha: Mutaciones de <i>inhA</i> reportadas con alta confiabilidad en la Base de datos <i>TB-DRMDB</i> .-----	63
Figura 20: Izquierda: Espectroferogramas de <i>rpoB</i> mostrando los cambios de base no reportados. Derecha: Mutaciones de <i>rpoB</i> reportadas con alta confiabilidad en la Base de datos <i>TB-DRMDB</i> .-----	66
Figura 21: Espectroferogramas de <i>rpoB</i> , mostrando bases mixtas clasificadas según el código IUPAC como R (puRina A,G) e Y (pYrimidina C,T).-----	66
Figura 22 Espectroferogramas de <i>embB</i> mostrando: a la izquierda una base mixta de una mutación previamente reportada; a la derecha cambio de base no reportada la base de datos <i>TB-DRMDB</i> .-----	69
Figura 23. Espectroferogramas de <i>pncA</i> mostrando cambios de base, inserciones y deleciones.-----	72

Figura 24. Imagen de mutaciones de mutaciones de <i>pncA</i> reportadas con alta confiabilidad en la base de datos TB-DRMDB -----	73
Figura 25: Asociación entre la resistencia a fármacos de primera línea SIREP -----	82
Figura 26: Asociación estadística entre mutaciones -----	86
Figura 27: Patrones o juegos de mutaciones -----	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Genes asociados a TB-DR.-----	26
Tabla II: Métodos de diagnóstico de TB-DR-----	37
Tabla III: Variables -----	41
Tabla IV: Iniciadores utilizados para la amplificación de genes asociados a TB-DR -----	44
Tabla V: Aislados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> obtenidos del LESP, por año.-----	50
Tabla VI: Variables socio-epidemiológicas de los pacientes con TB-DR -----	51
Tabla VII: Variables clínico-epidemiológicas de los pacientes con TB-DR-----	52
Tabla VIII: Tipo de Farmacorresistencia de pacientes con TB-DR por género-----	53
Tabla IX: Número de Farmacorresistencias de pacientes con TB-DR por género -----	54
Tabla X: Relación de secuencias de genes asociados a TB-DR -----	55
Tabla XI: Mutaciones encontradas en el gen <i>rrS</i> -----	56
Tabla XII: Mutaciones encontradas en el gen <i>katG</i> -----	58
Tabla XIII: Mutaciones encontradas en el gen <i>inhA</i> -----	61
Tabla XIV: Mutaciones encontradas en el gen <i>rpoB</i> -----	65
Tabla XV: Mutaciones encontradas en el gen <i>embB</i> -----	67
Tabla XVI: Mutaciones encontradas en el gen <i>pncA</i> -----	71
Tabla XVII: Asociación entre variables epidemiológicas y resistencias fenotípicas (Fármacos). 76	
Tabla XVIII: Mutaciones más frecuentes en genes asociados con la resistencia a fármacos en tuberculosis-----	77
Tabla XIX: Asociación entre variables epidemiológicas y mutaciones identificadas -----	79
Tabla XX: Asociación entre resistencias farmacológicas y mutaciones-----	84

ÍNDICE DE ANEXOS

1: Asociación estadística entre variables epidemiológicas y resistencias farmacológicas -----	115
2: Asociación estadística entre variables epidemiológicas y mutaciones-----	116
3: Asociación estadística entre la resistencia a fármacos de primera línea SIREP -----	117
4: Asociación estadística entre mutaciones y resistencias farmacológicas. -----	118
5: Asociación estadística entre mutaciones -----	119
6 : Artículo de Revisión publicado-----	120
7: Artículo Científico aceptado para publicación -----	129
8: Artículo Científico enviado para publicación -----	140

LISTA DE ABREVIATURAS

¹⁴ C	<i>Carbono14</i>
BAAR	<i>Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes</i>
E	<i>Etambutol</i>
I	<i>Isoniacida</i>
LESP	<i>Laboratorio Estatal de Salud Pública</i>
OMS	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
OPS	<i>Organización Panamericana de la Salud</i>
OR	<i>Odds Ratio o Razón de Momios de Prevalencia</i>
P	<i>Pirazinamida</i>
QV	<i>Quality Value o Valor de Calidad</i>
R	<i>Rifampicina</i>
RDRR	<i>Región determinadora de resistencia a rifampicina</i>
S	<i>Streptomycin</i>
TB	<i>Tuberculosis</i>
TB-DR	<i>Tuberculosis Drogorresistente ó Farmacorresistente</i>
TB-DRMDB	<i>Base de datos de Mutaciones en Tuberculosis Drogorresistente</i>
TB MDR	<i>Tuberculosis Multi-Drogorresistente</i>
VIH	<i>Virus de la Inmunodeficiencia Humana</i>

1. Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha afectado a la humanidad desde hace mucho tiempo y continúa siendo un problema de salud pública; actualmente la resistencia a fármacos, es uno de los factores que han agravado su situación. Veracruz es uno de los estados con más casos de tuberculosis farmacorresistente a nivel nacional; sin embargo, no hay estudios que describan las características genético-moleculares y epidemiológicas de las cepas causantes de dicha enfermedad en la región.

Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización genética de las cepas de *Mycobacterium* drogorresistentes presentes en el estado de Veracruz. Para lo cual se secuenciaron fragmentos de los genes: *rrS*, *katG*, *inhA*, *rpoB*, *embB* y *pncA*, implicados en la resistencia a fármacos de primera línea. Las mutaciones encontradas, se relacionaron con variables epidemiológicas de los portadores, con la finalidad de identificar factores de riesgo asociaciones y/o agrupamientos.

Se analizaron 136 aislados clínicos de *Mycobacterium*, las farmacoresistencias presentes fueron: Isoniacida (83.1%), Rifampicina (69.9%), Estreptomina (66.9%), Etambutol (53.7%) y Pirazinamida (37.5%). El 66.2% de los aislados fueron multidrogorresistentes y el 23.5% presentó resistencia a los cinco fármacos de primera línea. Se identificó asociación importante entre el sexo femenino y la resistencia a múltiples fármacos. Los codones que explicaron el mayor porcentaje de resistencia a fármacos fueron: S531L/W de *rpoB*, (67.6%); S315N/T de *katG* (40%); M306V/I de *embB* (32.8%); L120P de *pncA*, (16.7%) y los nucleótidos 513 A-C de *rrS* (9%) y -15 C-T de *inhA* (7.8%); además se identificaron 35 mutaciones sin reportes previos. Esta heterogeneidad demuestra la gran diversidad de aislados con diferentes perfiles de mutaciones. Lo anterior, sin duda tendrá como consecuencia que las pruebas comerciales diagnósticas existentes presenten una baja sensibilidad.

Finalmente, se observaron asociaciones intrínsecas entre las mutaciones de distintos genes y los fármacos empleados, abriendo la posibilidad de que algunas puedan ser empleadas como marcadores para el diagnóstico a varios fármacos. La presencia de estas relaciones nos hace pensar en un mecanismo específico o señalización

direcciona, que conlleva a un proceso de mutación dirigida y por tanto, el proceso de generación de resistencia a fármacos en tuberculosis no sea un proceso aleatorio.

Abstract

Tuberculosis (TB) is a disease that has affected humanity for a long time, and remains as a public health problem. Drug resistance is one of the factors that have aggravated the situation. Veracruz is one of the states with more TB drug-resistant cases in México; however, there are no studies describing the genetic-molecular and epidemiological characteristics of strains causing this disease in the region.

Therefore, the aim of this study was to perform a genetic characterization of drug resistant strains of *Mycobacterium* present in the state of Veracruz. We sequenced fragments of the genes involved in resistance to first-line drugs: *rrS*, *katG*, *inhA*, *rpoB*, *embB* and *pncA*. The mutations found were related to the patients' epidemiological variables in order to identify risk factors, associations and clusters.

We analyzed 136 clinical isolates of *Mycobacterium* the drug resistances observed were: Isoniazid (83.1%), Rifampicin (69.9%), Streptomycin (66.9%), Ethambutol (53.7%) and Pyrazinamide (37.5%). Of the isolates 66.2% were multidrug resistant and 23.5% showed resistance to five first-line drugs. An important association between female gender and resistance to multiple drugs was identified. The codons that explained the highest percentage of drug resistance were: S531L/W of *rpoB* (67.6%), S315N/T of *katG* (40%), M306V/I of *embB* (32.8%), L120P of *pncA* (16.7%) and nucleotides 513 A-C of *rrS* and -15 C-T of *inhA* (7.8%). In addition, 35 new mutations were identified. This heterogeneity shows the diversity of isolates with different mutation profiles. These findings, will certainly suggest that existing commercial diagnostic tests will have a low sensitivity.

Finally, intrinsic associations were observed between mutations on different genes and drugs used, opening the possibility that some of them may be used as diagnostic markers for various drugs. The presence of these relationships makes us think that a specific mechanism of directional signaling leads to a process of directional mutations, suggesting that the generation of drug resistance in tuberculosis is not a random process.

2. Introducción

Considerando sólo las enfermedades infecciosas, la tuberculosis (TB) es actualmente la principal causa de muerte en adultos a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un tercio de la población mundial está infectada y estima una incidencia de 8.8 millones de casos, con una mortalidad de 1.45 millones (WHO,2011).

En los últimos años el control de dicha enfermedad se ha complicado, debido principalmente a factores como: la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) la Diabetes Mellitus y la resistencia a fármacos (TB-DR) (WHO,2010a). En este sentido, el mayor impacto de la TB-DR se debe a sus altos costos de tratamiento y el retraso en su diagnóstico, ubicándola como una amenaza para el control de la enfermedad (WHO,2010a).

Actualmente el diagnóstico de TB-DR se realiza mediante cultivos con antibiograma o técnicas radiométricas, obteniendo resultados en 6 u 8 semanas (Palma-Nicolás y Bocanegra-García,2007); en algunas ocasiones, durante dicho periodo, los pacientes no reciben el tratamiento adecuado, contribuyendo a la diseminación de la enfermedad, con el consecuente incremento en costos de tratamiento, menor probabilidad de curación, y aumento en la incidencia de TB-DR.

El desarrollo alcanzado en el campo de la biología molecular en los últimos años, ha permitido que se comience a responder ante esta necesidad, implementando técnicas de análisis molecular para la caracterización de *Mycobacterium* y la identificación de mutaciones causantes de resistencia a fármacos, siendo la secuenciación, la técnica de referencia para la identificación de modificaciones a nivel genético (Palma-Nicolás y Bocanegra-García,2007; Harris,1998; Tapia-Conyer,2006).

Existen investigaciones en otros países acerca de los tipos y frecuencia de mutaciones en genes que provocan resistencia a fármacos. En México este tipo de estudios son muy escasos y en el estado de Veracruz, aún no se han realizado caracterizaciones moleculares en Micobacterias drogorresistentes. La utilidad práctica de este tipo de estudios a largo plazo radica en que ayudarían a conducir metodologías diagnósticas para detección rápida de TB-DR que permitan llevar tratamientos farmacológicos efectivos e individualizados, lo cual sin duda contribuirá a limitar la progresión y diseminación de la enfermedad.

3. Antecedentes

3.1. Definición de tuberculosis

La TB es una enfermedad muy antigua, que presenta evidencias de afectación a la población desde el periodo neolítico (Harris,1998; Tapia-Conyer,2006). En 1993 la OMS declaró a la TB como un problema reemergente debido a su asociación con el VIH/SIDA y la drogoresistencia (DR); a la fecha pese a los esfuerzos en salud, continúa siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial (Farga,2004). Este problema de reemergencia y en general el difícil control de la enfermedad en los últimos tiempos, se ha visto favorecido por aspectos como el crecimiento de las poblaciones marginadas, la pobreza, la desnutrición, la migración, las enfermedades inmunosupresoras, y el deterioro en los programas de salud (Tapia-Conyer,2006).

La TB es una enfermedad pulmonar infecciosa crónica, causada por bacterias de dos complejos de *Mycobacterium* que incluye (Palma-Nicolás y Bocanegra-García,2007):

- 1) Complejo *Mycobacterium tuberculosis*
 - a) *M. tuberculosis*,
 - b) *M. bovis*,
 - c) *M. canetti*,
 - d) *M. africanum*
 - e) *M. microti*

- 2) Complejo *Mycobacterium avium-intracelulare*
 - a) *M. avium* subsp. *avium*,
 - b) *M. avium* subsp. *paratuberculosis*,
 - c) *M. avium* subsp. *silvaticum*
 - d) *M. intracelulare*

Entre estas bacterias, el principal patógeno que causa la TB en humanos es *M. tuberculosis*, seguido de *M. bovis*; mientras que el 70% de los pacientes con VIH e inmunodeprimidos (con conteo de células CD4+ $\leq 50/\mu\text{l}$) presentan infección por *M. avium* subsp. *avium* y *M. intracelulare* (Palma-Nicolás y Bocanegra-García,2007).

En relación a la infectividad de esa bacteria, se cree que el 30% de las personas que mantienen contacto continuo con un paciente que al toser expide bacilos de tuberculosis (bacilífero) se infectan, y del 5 al 15% desarrollarán una TB activa, que sin tratamiento puede seguir un curso prolongado y causar la muerte en dos o tres años (Zenteno,2006).

3.2. Epidemiología

La TB es la principal causa de muerte por enfermedades infecciosas de adultos en edades productivas a nivel mundial. Representa la cuarta parte de las defunciones prevenibles en países en desarrollo y está cobrando fuerza nuevamente en países industrializados.

La OMS informó que en el 2010 murieron alrededor 1.45 millones de personas a causa de la TB y se estima que uno de cada tres personas en el mundo está infectada. (WHO,2011; Zenteno,2006). Pese a que América Latina ocupa el último lugar en prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial, para el año 2009 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reportó más de 272 mil casos en los países de la región, siendo Brasil, Perú y México los más afectados, por lo que forman parte del programa de países prioritarios para el control de la TB. Se considera que esta situación conlleva importantes consecuencias sociales y económicas que generan un continuo e indeseable impacto en el desarrollo de las comunidades (OPS/OMS,2009).

En México tanto la morbilidad como la mortalidad por TB pulmonar han mantenido una tendencia descendiente desde hace más de diez años (Fuentes,2008), alcanzando en el 2010 una cifra de 14.19 casos nuevos de TB y 1.95 casos de defunción por cada cien mil habitantes a nivel nacional y de 24.5 casos nuevos con 3.43 casos de muerte para el estado de Veracruz (Secretaria de Salud,1999-2010a; Secretaría de Salud,1999-2010b) (Figuras 1 y 2).

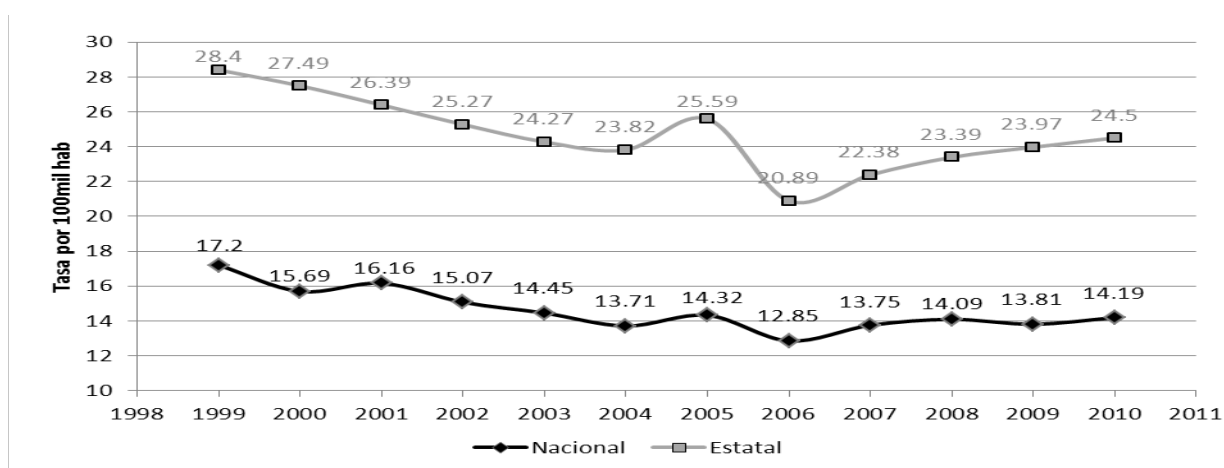


Figura 1: Tasa de Incidencia de TB, 1999-2010. Información tomada de Secretaria de Salud.

Dirección General de Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). Incidencia de Tuberculosis Respiratoria (A15, A16) en la República Mexicana. 1999-2010.

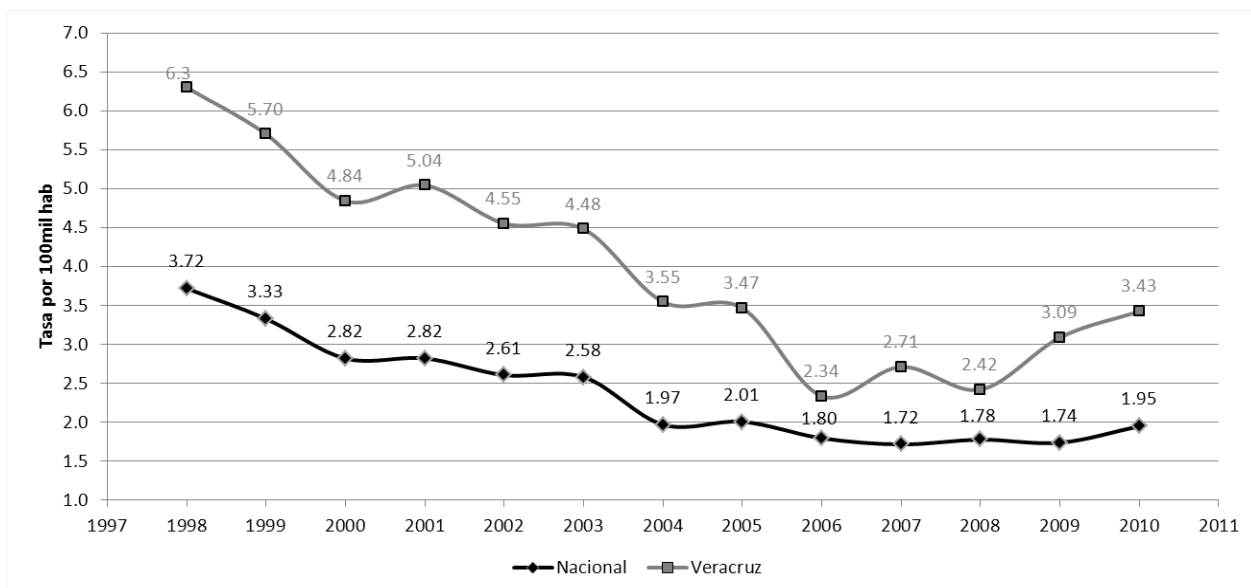


Figura 2: Tasa de Mortalidad por TB, 1999-2010. Información tomada de Secretaría de Salud.

Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de defunciones 1979-2010. Defunciones por Tuberculosis Respiratoria (A15, A16) en la República Mexicana. 1999-2010.

Los diez estados con mayores tasas de incidencia en 2010 fueron: Baja California, Tamaulipas, Guerrero, Nayarit, Sonora, Sinaloa, Veracruz, Chiapas, Tabasco y Nuevo León; mientras los estados con menor morbilidad fueron: Yucatán, Michoacán, Puebla, Querétaro, Distrito Federal, Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas, Tlaxcala y Estado de México (Secretaría de Salud, 1999-2010a).

Veracruz no es el estado con la tasa de incidencia ni mortalidad más altos del país; sin embargo, si es el estado con mayor número de casos y muertes por TB pulmonar a nivel nacional (Figuras 3 y 4); registrando en el 2010, 1787 casos y 250 defunciones, de las cuales casi el 80% correspondieron a población mayor de 40 años (Figura 5) (Salud de Secretaría, 1999-2010a; Secretaría de Salud, 1999-2010b).

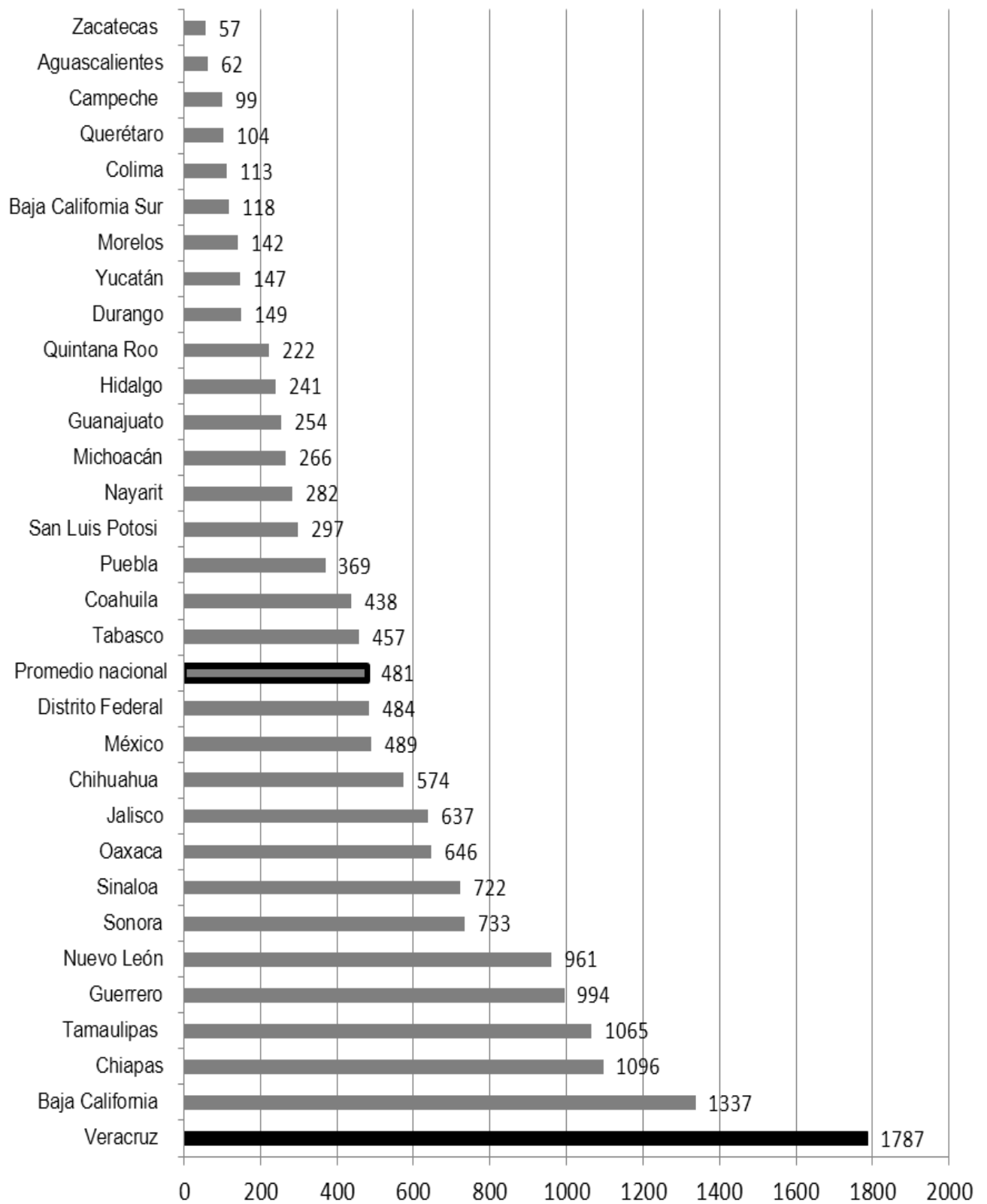


Figura 3 Casos de TB pulmonar, México 2010. Información tomada de Secretaria de Salud.

Dirección General de Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). Incidencia de Tuberculosis Respiratoria (A15, A16) en la República Mexicana. 1999-2010

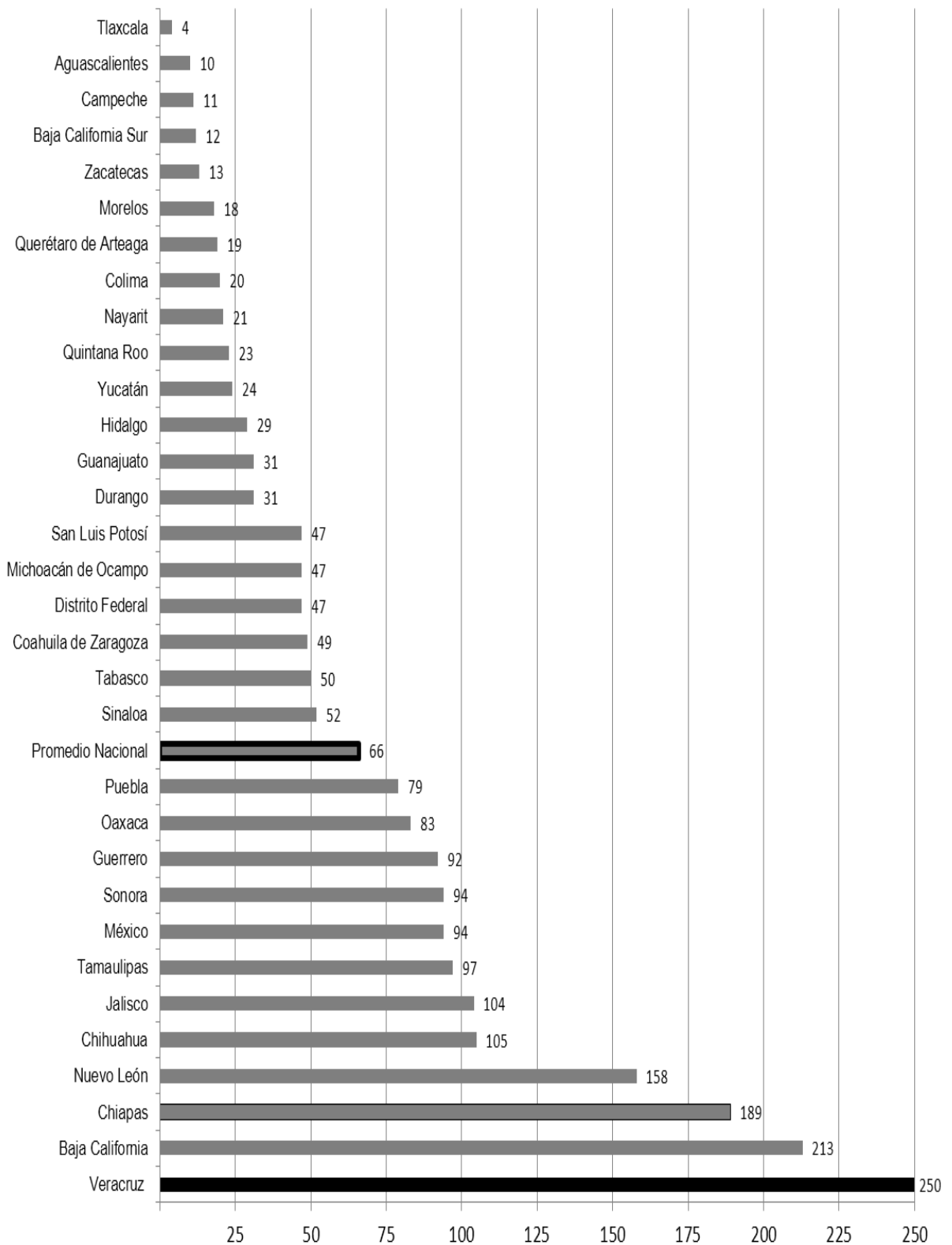


Figura 4: Defunciones por TB pulmonar, México, 2010. Información tomada de Secretaría de Salud.

Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de defunciones 1979-2010. Defunciones por Tuberculosis Respiratoria (A15, A16) en la República Mexicana. 1999-2010

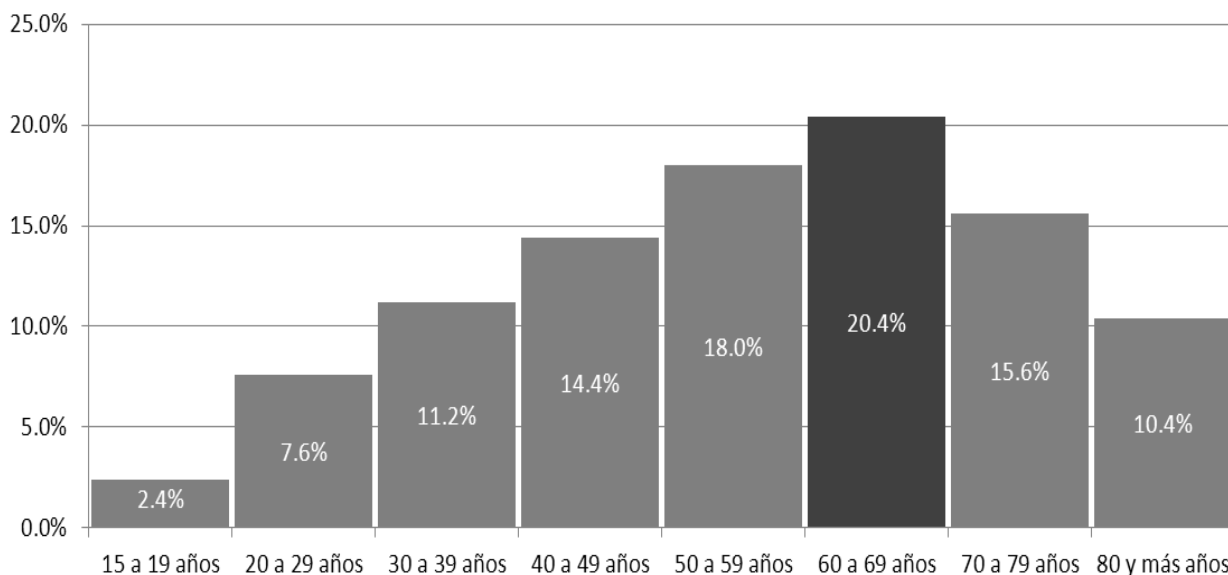


Figura 5: Defunciones por TB pulmonar, de acuerdo al grupo de edad. Veracruz 2010.

Información tomada de Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de defunciones 1979-2010. Defunciones por Tuberculosis Respiratoria (A15, A16) en la República Mexicana. 1999-2010.

En cuanto a las cifras de drogorresistencia a nivel mundial, la OMS estima que, en promedio del 3 al 4.4% de los casos de TB son resistentes a isoniacida y rifampicina (TB-MDR) y de estos, del 3.4 al 7.5% presentan tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR) (WHO, 2010 c).

La OPS notificó que México ocupa el tercer lugar en casos TB-MDR a nivel de América Latina y es uno de los ocho países que reporta casos de TB-XDR (OPS/OMS,2009). Sobre este aspecto, la Secretaria de Salud informó que Veracruz fue el estado con mayor prevalencia de TB-DR en el 2011, aportando el 14.72% del total de casos del país (58 casos de 395) (Castellanos, 2011).

3.3. Aspectos microbiológicos *Mycobacterium tuberculosis*

3.3.1. Morfología y constitución química

El bacilo de Koch es el causante de la TB, esta bacteria tiene un aspecto delgado, con lados paralelos y extremos redondeados, rectos o un poco curvos, mide de 1-5µm por

0.3-0.6 μ m, y se le puede encontrar sólo o en pequeños agregados (Figura 6). Entre sus características están el ser inmóviles, no esporulados, ni capsulados, grampositivos, aerobios y de crecimiento lento en medios de cultivo. Además son ácido-alcohol resistentes (BAAR), por lo cual se tiñen bien mediante coloración Ziehl-Neelsen, basada en la coloración con fucsina básica fenicada, y decoloración con HCl o H₂SO₄ de 3 a 5% en alcohol etílico al 95% (Carmona et al.,1997).

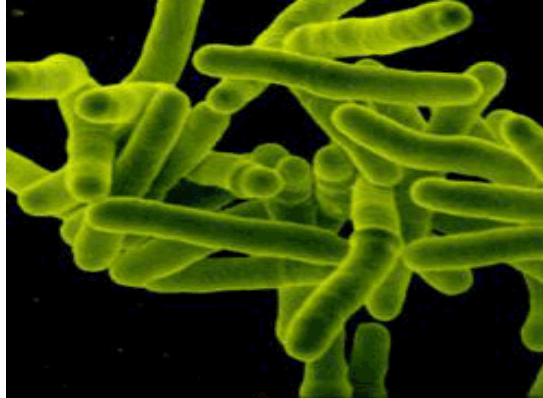


Figura 6: Microfotografía electrónica de Bacilos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Tomado del Portal de Salud del Principado de Asturias.

Entre el 40 y el 60% de su materia seca son lípidos, lo cual la hace fisiológicamente resistente a la mayoría de los antibióticos. La estructura lipídica de su pared celular (Figura 7) actúa como una barrera permeable únicamente a solutos hidrofílicos, los cuales atraviesan la pared celular lentamente debido al escaso número de porinas, a la escasa fluidez de los ácidos micólicos y al espesor total de la pared de *M. tuberculosis*. Entre los lípidos que lo componen se encuentran (Carmona et al.,1997):

- ácidos grasos, como el ácido micólico y tuberculoesteárico, que estimulan la fagocitosis mononuclear.
- ceras, como la cera D, la cual genera estados de hipersensibilidad y ayuda a la producción de anticuerpos.
- fósforo, que se encarga de producir metamorfosis del tejido conectivo.
- glucolípidos.

También presenta proteínas y polisacáridos, las primeras permiten descubrir el estado de sensibilización causado por el microorganismo y los segundos confieren la especificidad del grupo y contribuyen a la inmunidad (Quirós-Roldán et al.,2001).

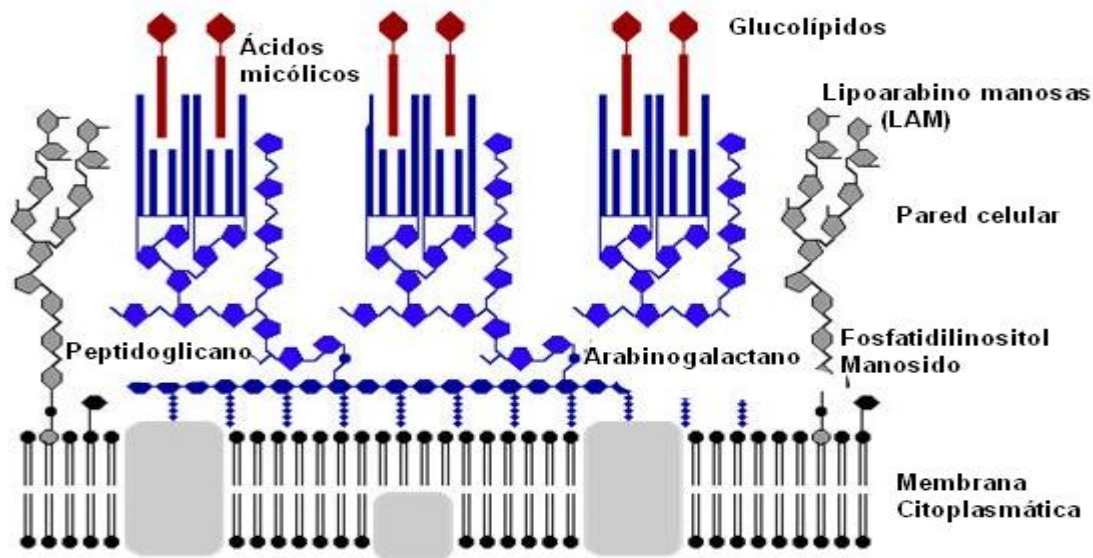


Figura 7: Estructura de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*

El alto contenido en lípidos de estas bacterias le confieren resistencia a desinfectantes químicos y desecación; sin embargo, son sensibles al calor, los rayos ultravioleta y la luz solar directa, así como fenol al 2%, los cresoles al 3%, el alcohol etílico al 70%, y la tintura de yodo (Carmona et al.,1997).

3.3.2. Cultivo

Para observar las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* se requieren 15 o más días, su crecimiento óptimo es a 37°C y pH de 7.4 a 8. Un buen medio de cultivo sólido para este microorganismo es el de Lowestein–Jensen, que está hecho a base de harina de papa, yema de huevo, glicerina, asparagina y verde de malaquita como agente inhibidor, también se utilizan otros medios como el de Petraghani, de Petroff, ATS, de Dubos-Davis, o de Dorset (Carmona et al.,1997).

En el medio Löwenstein-Jensen, las colonias de *Mycobacterium* se observan rugosas, no pigmentadas y formando cordones. Una característica que permite diferenciarlos de micobacterias atípicas o no tuberculosas, es la débil actividad catalasa que presentan, la cual desaparece al calentarlos a 68°C. Sin embargo, los bacilos resistentes a isoniacida generalmente son catalasa negativos (Nava y Prieto,2001).

3.3.3. Acción patógena

Como se mencionó anteriormente, en el humano la TB es causada generalmente por *M. tuberculosis* y *M. bovis*, provocando lesiones que comúnmente se localizan en pulmones, pero que también pueden afectar aparato digestivo y genitourinario, sistema nervioso y óseo, articulaciones, ganglios linfáticos y piel. Dichas lesiones se caracterizan por la formación de nódulos duros, blanco-cremosos o amarillentos, de unos 2mm de diámetro conocidos como tubérculos, en donde el grado de la lesión varía dependiendo del tejido afectado, número y virulencia de los microorganismos, resistencia y estado de sensibilidad del receptor (Carmona et al,1997).

Una vez que el bacilo se ha establecido, se presenta una respuesta celular que se inicia con linfocitos polimorfonucleares y se continúa con monocitos que generan un edema. Dependiendo del huésped, la infección puede evolucionar a curación, muerte tisular o formación del tubérculo, el cual está formado al exterior por tejido fibroso y al interior por células microbianas, epiteloides y células gigantes de Langhans. Después de un tiempo la obstrucción de la cápsula fibrosa ocasiona falta de riego sanguíneo al interior del tubérculo generando una necrosis. Este tubérculo persiste durante largo tiempo, después se puede vaciar, calcificar o eliminarse una parte, para finalmente ser invadido por tejido conectivo (Carmona et al.,1997).

3.3.4. Mecanismo de infección

El reservorio del bacilo de la tuberculosis, en el 99.5% de los casos, es el ser humano y sólo el 0.5% se presenta en ganado vacuno, con un periodo de incubación de 2 a 10 semanas (Carmona et al.,1997).

El mecanismo de transmisión de *M. tuberculosis*, es por vía aérea; ya sea por gotitas de saliva y esputo que los pacientes contagiados con lesiones pulmonares “abiertas” expiden al toser o estornudar, o por inhalación de polvo cargado de agentes vivos (1 a 3 bacilos) que entran a los espacios alveolares. Una ruta de transmisión menos frecuente es la ingestión de comida contaminada (leche o quesos) y el contacto directo como besos y alimentos u objetos contaminados (Said et al.,2005).

Cuando los bacilos entran a los alvéolos pulmonares, la enfermedad se puede presentar en cinco escenarios o etapas (Said et al.,2005):

- I. Normalmente los macrófagos alveolares residentes destruyen o inhiben a los bacilos; si esto no ocurre, los bacilos se multiplican y destruyen a los macrófagos.
- II. Se forma el tubérculo. Los bacilos crecen en forma logarítmica dentro de macrófagos inmaduros (no activados) provenientes de la corriente sanguínea, presentándose un estado de simbiosis, ya que los bacilos se multiplican dentro de los macrófagos sin causar un daño aparente al hospedero y los macrófagos se dividen y acumulan.
- III. Ocurre la necrosis caseosa; con lo cual el número de bacilos viables se estabiliza. Los macrófagos cargados con bacilos son destruidos por la respuesta inmune a antígenos parecidos a tuberculina. La lesión presenta un centro caseoso sólido (los bacilos no se multiplican) rodeado por macrófagos inmaduros o no activados, que permiten la multiplicación intracelular de los bacilos y macrófagos parcialmente activados.
- IV. En este estadio se determina si la enfermedad se hará visible clínicamente, lo cual se relaciona con la respuesta inmune celular. Si se desarrolló una respuesta celular sobre los bacilos, estos escapan del borde del foco caseoso y se multiplican dentro de macrófagos no-activados y en los parcialmente activados que se encuentran en la periferia del foco caseoso. De nuevo, los macrófagos conteniendo a los bacilos son destruidos por el sistema inmune, lo que causa el crecimiento del centro caseoso y la progresión de la enfermedad. En caso contrario, si se desarrolla una buena respuesta inmune celular, el centro caseoso es rodeado por macrófagos activados, quienes ingieren y destruyen o inactivan a los bacilos libres, lo cual detiene la evolución de la lesión, dejándola en un estado subclínico.
- V. En este estadio se observa licuefacción del centro caseoso, se presenta cuando el bacilo evade la respuesta inmune del hospedero. Por tanto, los bacilos se multiplican en el medio extracelular y suelen alcanzar un enorme número. A tal grado, que a pesar de que se desarrolle una adecuada respuesta inmune celular, ésta no será suficiente para controlar la infección. Además, la alta concentración

de productos de estos bacilos causa una respuesta de hipersensibilidad tardía, que erosiona la pared bronquial y forma una cavidad. Entonces, las micobacterias invaden el árbol bronquial y se dispersan por otras partes del pulmón y también en el medio ambiente, principalmente expedidas por la tos del paciente.

Las diferencias en el pH y otras condiciones fisiológicas de las lesiones tuberculosas, determinan que medicamentos de primera línea sean activos y cuáles no. Por ejemplo, pirazinamida es activa sobre bacilos que se encuentran en los focos caseosos en medio ácido, rifampicina actúa sobre las micobacterias intracelulares en un medio microaerófilico, e isoniacida sobre microorganismos que se desarrollan en las cavidades pulmonares en condiciones aeróbicas (Said S et al,2005).

3.4. Aspectos clínicos de la Tuberculosis pulmonar

3.4.1. Sintomatología

La TB se presenta con mayor frecuencia en ambientes cerrados y mal ventilados, en los cuales las personas que padecen la enfermedad cohabitan con (Instituto Nacional De Salud Pública,2006):

- personas inmunosuprimidas por enfermedades como: VIH/SIDA, Diabetes Mellitus, Desnutrición, Cáncer, y/o por uso de medicamentos esteroides o inmunosupresores.
- niños
- personas que residen en asilos, albergues o instituciones penales
- indigentes, alcohólicos y adictos a drogas intravenosas.

La sintomatología más frecuente es la tos con expectoración consistente, acompañada o no de sangre, fiebre intermitente, sudoración y pérdida de peso (Tapia-Conyer, 2006; Instituto Nacional De Salud Pública,2006).

3.4.2. Métodos de diagnóstico

Se considera como caso de TB, al paciente en quien se establece el diagnóstico clínico de la enfermedad y se clasifica como caso confirmado hasta comprobar el diagnóstico por baciloscopía, cultivo o histopatología (Secretaría de Salud,1993).

Diagnóstico Clínico, Radiológico y de Laboratorio

El primer paso para el diagnóstico de la TB consiste en realizar la historia clínica completa del paciente. En caso de descubrir la presencia de tos y expectoración inexplicable durante dos semanas o más se debe realizar análisis de laboratorio, el cual consiste en una serie de tres baciloscopías y en caso necesario cultivo. En paralelo se realiza telerradiografía de tórax (Figura 8), para examen radiológico. Aunque en la tuberculosis pulmonar no existe un patrón radiológico característico, es común encontrar cavernas en lóbulos superiores de los pulmones, condensaciones pulmonares, derrame pleural, imagen miliar o de mijo, ensanchamiento mediastinal, o cavernas en lóbulos inferiores. Este último signo se presenta con mayor frecuencia en pacientes inmunosuprimidos (Instituto Nacional De Salud Pública,2006).

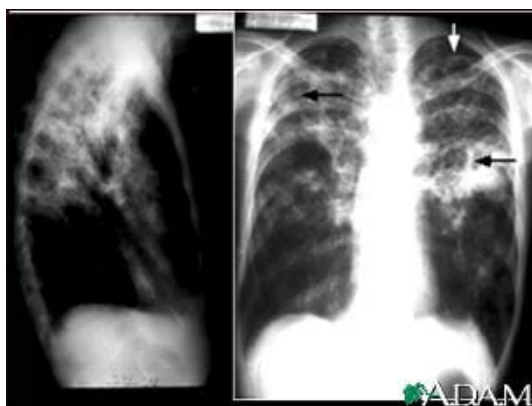


Figura 8: Imagen radiológica de tórax.

La flecha muestra lesiones de TB pulmonar. Tomada de Medlineplus.

Baciloscopía y Cultivo

En relación a las baciloscopías y los cultivos, más del 70% de las formas de TB pulmonar que eliminan bacilos por el esputo, se detectan con baciloscopía, y con el cultivo el rendimiento aumenta a más del 90%. Sin embargo, esto solo es útil para los

casos avanzados, ya que, aquellos pacientes con lesiones cerradas y que no eliminan bacilos tuberculosos por la expectoración o lo hacen en forma intermitente, no son detectados (Nava y Prieto,2001).

La baciloscopía se realiza mediante el método de tinción de Ziehl-Neelsen, que permite observar en el microscopio a los bacilos ácido-alcohol resistentes como bastoncillos ligeramente curvados, de color rojo sobre un fondo azul (Secretaría De Salud,1993) (Figura 9).

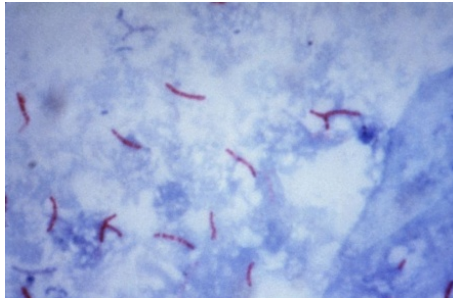


Figura 9: Baciloscopía mediante el método de tinción de Ziehl-Neelsen.

Tomado de Depto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

Otra opción es la microscopia fluorescente, que se utiliza cuando deben procesarse más de 50 muestras diarias. En este caso se usa auramina fenolada como colorante, con el cual los bacilos se tornan fluorescentes cuando se les expone a la luz ultravioleta, haciéndose visibles fácilmente. Aunque la especificidad de esta técnica es virtualmente del 100%, el rango de sensibilidad es bajo y oscila entre 50-80%. Este porcentaje varía dependiendo del tipo de muestra y la micobacteria involucrada, ya que deben existir entre 5mil a 10mil bacilos por ml de expectoración, para que tengan un 50% de posibilidades de ser detectados al microscopio. Cuando el número de bacilos es mayor a 100mil por ml de expectoración, se puede esperar que las baciloscopías sean consistentemente positivas utilizando tinción de Ziehl-Neelsen y 1.000 bacilos por ml para tinción fluorescente (Nava y Prieto,2001).

El número de bacilos encontrados está en relación directa con la gravedad de la TB y con el grado de contagiosidad. Según las recomendaciones de la OPS, las baciloscopías se informan en cruces, en función del número de Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes (BAAR). Así tenemos que para informar sobre la cantidad de bacilos observados se clasifica de la siguiente forma (Nava y Prieto,2001):

Negativa (-): No se encuentran BAAR en 100 campos observados

Positiva (+): <1 BAAR por campo en 100 campos observados

Positiva (++): Entre 1-10 BAAR por campo, en 50 campos observados

Positiva (+++): > 10 BAAR por campo, en 20 campos observados

El diagnóstico de tuberculosis se realiza con al menos una baciloscopía positiva en serie de tres; un resultado negativo, no excluye el diagnóstico de tuberculosis, por lo que se recomienda que el resultado se confirme por cultivo (Secretaría De Salud,1993).

El cultivo se debe realizar cuando los resultados revelan 2 de 3 baciloscopías negativas para micobacterias, en pacientes con VIH/SIDA, en pacientes con tuberculosis extrapulmonar sobre todo renal y genitourinaria, y en pacientes con fracaso al tratamiento, recaída o segundo abandono al tratamiento (Instituto Nacional De Salud Pública, 2006). Este método es considerado de elección para el diagnóstico de la TB ya que es una técnica con mayor sensibilidad (70–90%) y sólo se necesitan más de 10 bacilos/ml, en muestras digeridas y concentradas, para que se obtenga un diagnóstico positivo (Nava y Prieto,2001). Sin embargo, uno de los inconvenientes que presenta esta técnica es requerir de 5 a 6 semanas para ofrecer el resultado (Said et al.,2005).

Para realizar el cultivo, la muestra se licua y descontamina mediante el método de Petroff (NaOH), los bacilos se sedimentan mediante centrifugación y se siembran. Al procesar el esputo, los métodos de descontaminación son capaces de destruir gran cantidad de bacilos; además las lesiones de infección pulmonar con escasas poblaciones bacterianas no eliminan bacilos todos los días ni en todas las expectoraciones (Said et al,2005). Es por esto que alrededor del 10% de los casos de tuberculosis pulmonar pueden ser negativos, aunque la enfermedad sea severa, y en los casos sospechosos de tuberculosis, frecuentemente es necesario repetir los estudios bacteriológicos en días sucesivos para confirmar el diagnóstico (Nava y Prieto,2001).

El método BACTEC también se utiliza para el diagnóstico de TB, en este método las muestras se siembran en medio de cultivo de Middlebrook enriquecido, rico en ácido palmítico marcado con carbono14 (^{14}C). El ^{14}C es un isótopo radioactivo natural, que emite radiaciones beta, inofensivos para la salud. Cuando las micobacterias

metabolizan el ácido palmítico liberan al ambiente el isótopo en forma de CO₂, marcado con ¹⁴C. Este CO₂ es aspirado y llevado a una cámara de ionización y transformado en una corriente eléctrica, la cual es proporcional a la cantidad de bacilos en crecimiento que haya en la muestra. Dicha señal eléctrica se inscribe y expresa como un “índice de crecimiento”. Se trata de un método automatizado, de alta sensibilidad y especificidad, que en forma simple permite hacer el diagnóstico de tuberculosis en menos de una semana en el 95% de los casos. También se utiliza para hacer el diagnóstico diferencial entre especies micobacterianas, al sembrarlas en frascos con aditivos que favorecen o impiden la multiplicación de las diferentes micobacterias y en general se utiliza con mayor frecuencia para detectar la sensibilidad a fármacos antituberculosos, para lo cual se requiere otra semana (Nava y Prieto,2001).

Entre los inconvenientes que presenta este sistema se encuentran: contención final de los desperdicios radioactivos generados, gasto importante en los insumos y equipo, necesidad de personal capacitado especializado y una semana o más para generar resultados (Nava y Prieto,2001).

3.4.3. Tratamiento

En el caso de la TB, el tratamiento farmacológico utilizado puede ser de primera o segunda línea. El de primera línea incluye fármacos como Isoniacida (I), Rifampicina (R), Etambutol (E), Pirazinamida (P) y Estreptomina (S) (Secretaría De Salud,1993). De acuerdo a los estándares internacionales contra TB, todos aquellos pacientes que no han sido tratados previamente deben recibir tratamiento primario durante 6 meses con fármacos de primera línea. La fase inicial consiste en 2 meses con cuatro antibióticos: I, R, E y P; seguida por la fase de sostén con I y R durante 4 meses más (WHO,2006; WHO,2010b; Secretaria De Salud,2010).

Por otro lado, en aquellos pacientes con recaída, abandono o fracaso al tratamiento, se opta por un retratamiento durante 8 meses; en el cual se incluye S junto a los otros cuatro fármacos durante la fase inicial por 2 meses, seguida por 1 mes con I, R, E y P y una fase de sostén de 5 meses más con I, R y E (Secretaria De Salud,2010). Entre las reacciones adversas que estos fármacos generan se encuentran: neuropatía periférica,

hepatitis, hipersensibilidad, gota, vértigo hipoacusia, dermatosis o alteraciones de la visión (Secretaría De Salud,1993).

En caso que el tratamiento de primera línea no genere los resultados deseados, se opta por un tratamiento con fármacos de segunda línea. Este puede ser un retratamiento estandarizado, que se prolonga hasta 18 meses, o un retratamiento individualizado. Entre ellos se incluyen drogas como Kanamicina, Capreomicina, Etionamida, Ofloxacina y Protionamida (Tapia-Conyer,2006), cuyos efectos adversos pueden ir desde náusea, vómito, mareos, anorexia, letargia y cefalea hasta reacciones psicóticas, depresión, toxicidad del sistema nervioso central, altos niveles antiepilépticos y efectos anticoagulantes (García et al.,2003).

Pese a que estos fármacos antituberculosos se administran de forma combinada el tratamiento resulta prolongado y por tanto el incumplimiento de la terapia farmacológica es elevado. Esto aunado a que el abordaje farmacológico ha sido prácticamente el mismo en los últimos 30 a 35 años, que los médicos o trabajadores de la salud prescriben incorrectamente los tratamientos, o que existe un deficiente suministro del medicamento, ha ocasionado que se esté generando un proceso de resistencia a drogas como nunca se había observado en la historia de la TB (Carmona et al.,1997).

3.5. Drogorresistencia

La drogorresistencia (TB-DR) o farmacorresistencia es un fenómeno que se presenta cuando un microorganismo del complejo *Mycobacterium* aislado de un enfermo, no es susceptible a la acción de uno o varios fármacos antituberculosos (Tapia-Conyer,2006). Una forma particular y peligrosa de drogorresistencia a tuberculosis es la multidrogorresistencia (TB-MDR), la cual se define como una enfermedad causada por el bacilo de la tuberculosis resistente al menos a Isoniacida y Rifampicina, dos de las más poderosas drogas antituberculosas (WHO,2010b; Wada,2004). Mientras la tuberculosis extremadamente drogorresistente (TB-XDR), es aquella que presenta resistencia a Isoniacida, Rifampicina, alguna fluorquinolona y por lo menos un inyectable de segunda línea (WHO,2007; WHO,2010a).

Además de la evidente importancia clínica, terapéutica y epidemiológica de estas condiciones, también se ha generado un gran impacto económico, ya que el tratamiento

para este grupo de pacientes es más costoso que el considerado para el total de casos (Quirós-Roldán et al.,2001). En México se ha estimado que los costos de un tratamiento normal pasan de 1,500 hasta 250-300 mil pesos cuando se trata de micobacterias multidrogorresistentes (Nava y Prieto,2001).

La forma en la que se origina la drogorresistencia, se clasifica en: 1) resistencia primaria o inicial, en aquellos pacientes que nunca han recibido tratamiento, lo cual involucra a una cepa con resistencia natural y 2) resistencia adquirida o secundaria, que se da en personas que ya tuvieron un tratamiento previo, implicando un mal uso o manejo de los antimicrobianos (Tapia-Conyer,2006)

Según resultados de análisis genéticos y moleculares, las bacterias generalmente adquieren resistencia a los medicamentos antimicrobianos por tres mecanismos: modificando la estructura química del fármaco, sobre produciendo la diana respectiva, o mutando; este último mecanismo es el que ocasiona la resistencia en *Mycobacterium* (Said et al.,2005).

Así la drogorresistencia se produce como consecuencia de la aparición de mutaciones espontáneas en el interior de su genoma independientemente de la exposición a la terapia y suelen codificar resistencia a un sólo fármaco (Quirós-Roldán et al.,2001). En la tuberculosis farmacorresistente los bacilos resistentes conviven con una población de bacilos sensibles que fueron eliminados mediante la terapia, dando como resultado la selección de cepas resistentes. Si ahora estas cepas resistentes se exponen a un segundo tratamiento con otro fármaco sobrevivirán aquellas mutantes resistentes a este nuevo medicamento, haciendo así una selección seriada de cepas con número de resistencias cada vez mayor, es por esto que una misma micobacteria puede ser resistente a uno o más medicamentos en función de su tiempo de exposición al medicamento; lo cual explica la necesidad de concluir el tratamiento en los tiempos establecidos (Said S et al.,2005).

Ya que la drogorresistencia en *M tuberculosis* se presenta por acumulación de mutaciones en varios genes, es evidente que los medicamentos poco efectivos como tiacetazona, etionamida o capreomicina presentan una probabilidad muy alta de generar resistencia, mientras los fármacos con eficacia intermedia como Isoniacida, Estreptomina, Etambutol, Kanamicina y ácido p-amino-salicílico, disminuyen esta

probabilidad. Por este motivo el tratamiento de la infección tuberculosa se basa en la asociación de un determinado número de fármacos con mecanismos de acción diferentes para evitar la aparición de resistencias. La frecuencia de aparición de mutantes resistentes varía dependiendo del fármaco: 10^{-6} para la Isoniacida, Estreptomina y Etambutol y 10^{-8} para la Rifampicina (Quirós-Roldán et al.,2001). En este sentido, la rifampicina es el antituberculoso que ofrece la menor probabilidad de producir mutaciones (Said et al.,2005).

3.5.1. Mecanismos moleculares generadores de drogorresistencia en fármacos de primera línea.

Estreptomina (S)

La Estreptomina se descubrió en 1943, fue el primer fármaco con actividad antituberculosa probada, actúa específicamente en la forma extracelular de la micobacteria (Quirós-Roldán et al.,2001). El mecanismo de acción de este fármaco se basa en su unión al ARN ribosomal (ARNr) con lo cual inhibe la síntesis proteica de la bacteria. La resistencia a este fármaco se asocia con mutaciones en los genes *rpsL* y *rrS* (o *rrnS*), los cuales codifican respectivamente la síntesis de la subunidad proteica 12S y el ARNr 16S. El gen *rpsL* presenta mutaciones con mayor frecuencia, encontradas en los codones 43 (Lys→Arg y/o Thr) y 88 (Lys→Gln, Arg y/o Thr) (Caws y Drobniewski,2001) (Tabla I). Al igual que ocurre con otros fármacos, se cree que existen mecanismos adicionales de resistencia a estreptomina, en este caso probablemente relacionados con la permeabilidad de la pared y membrana bacteriana, ya que el 30% de las cepas resistentes no muestran mutaciones en los genes *rrS* o *rpsL* (Quirós-Roldán et al.,2001).

Isoniacida (I)

La *Isoniacida* es un potente fármaco antituberculoso y bactericida que se utiliza contra la tuberculosis desde 1952 (Quirós-Roldán et al.,2001), actúa específicamente contra bacterias que se encuentran en fase de multiplicación activa (Said et al.,2005). Su

mecanismo de acción aún no está del todo aclarado, pero se sugiere que la isoniacida se transforma en su principio activo gracias a la enzima catalasa-peroxidasa, inhibiendo la síntesis de ácido micólico de la pared bacteriana, lo cual permite que el microorganismo sea susceptible a la acción de radicales reactivos de oxígeno y a otros elementos externos de respuesta del huésped (Quirós-Roldán et al.,2001; Said et al.,2005)(Tabla I).

El gen *katG* codifica para la enzima catalasa-peroxidasa. La presencia de mutaciones o deleciones en este gen se ha relacionado con el 60% de la cepas de *M. tuberculosis* resistentes a isoniacida (Quirós-Roldán et al.,2001; Caws y Drobniowski,2001). *KatG* tiene un tamaño de 1771 pares de bases (pb), no obstante del 30 al 65% de las mutaciones se localizan en el codón 315 Ser, el cual cambia a Thr, Asn o Arg (Said et al.,2005; Kim et al.,2003); otras mutaciones de menor frecuencia se han reportado en los codones 300, 321, 418, 463, 501, 525, 587 y 700 (Uniprotkb/Swiss-Prot R,2011a; Mo et al.,2004) (Tabla I).

La segunda causa de resistencia a isoniacida se explica por mutaciones que afectan al gen *inhA* y con mayor frecuencia a su regulador (*García et al.,2003;Uniprotkb/Swiss-Prot Reviewed,2011b*), el cual codifica para la proteína *inhA*, responsable de la producción de ácidos grasos (Quirós-Roldán et al.,2001; Caws y Drobniowski,2001); recientemente se ha propuesto a este gen como el responsable de la coresistencia a isoniacida y etionamida (Said et al.,2005). Las mutaciones en los genes *katG* e *inhA* están asociadas al 70-80% de los aislados resistentes a isoniacida (Said et al.,2005); pero alrededor del 15-25% de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a este fármaco poseen el genotipo silvestre tanto en el gen *katG* como *inhA*, por lo cual se piensa debe existir otro mecanismo de resistencia (*Quirós-Roldán et al.,2001*).

En este sentido, se ha observado que un 15% de las cepas resistentes a isoniacida presentan mutaciones en el locus *kasA*, lo cual implica que otro posible objetivo de la isoniacida es la proteína *kasA*, involucrada en el mecanismo de elongación de los ácidos grasos (*Zhang et al.,2005*). También se han reportado con menor frecuencia, mutaciones involucradas en la adquisición de resistencia a isoniacida en el gen *oxyR-ahpC* (*Caws y Drobniowski.,2001; Wada et al.,2004*).

Rifampicina (R)

La *Rifampicina* es otro fármaco importante, que debido a su fuerte actividad bactericida ha sido empleado desde 1970 (Quirós-Roldán et al.,2001); desafortunadamente su mala administración ha generado un incremento considerable en cepas resistentes (Said et al.,2005).

Respecto a su mecanismo de acción, la rifampicina se une a la ARN polimerasa de la micobacteria e interfiere durante el proceso de transcripción (Kocagoz et al.,2005). La RNA polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por cuatro subunidades: α , β , β' y σ ; codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, respectivamente. Se ha demostrado que mutaciones en *rpoB* producen cambios conformacionales en la subunidad β de la RNA polimerasa, disminuyendo la afinidad por rifampicina y otorgando resistencia al fármaco (Said et al.,2005) (Tabla I).

Pese a que el gen *rpoB* tiene un tamaño de 3534pb, el 96 o 97% de las mutaciones que causan resistencia a rifampicina están localizadas en una región de 81pb entre los codones 507-533 y consisten por lo general en mutaciones puntuales no sinónimas (Kim et al.,2003; Zhang et al.,2005; Wada et al.,2004; Kocagoz et al.,2005). De acuerdo con los resultados de diversos estudios, en el 40 al 70% de los aislados, se observaron mutaciones puntuales en el codón 531 Ser por Leu (TCG→TTG) o por Thr (AGC→ACA); del 32 al 36% de las cepas estudiadas mostraron cambios en el codón 526 His; y del 7 al 9% en el codón 516 Asp (Kocagoz et al.,2005; Marín et al.,2004). También se han reportado mutaciones o deleciones de menor frecuencia en otros codones como: 498, 511-518, 524–527, 456, 531, 533 (Uniprotkb/Swiss-Prot R,2011c) (Tabla I). En los últimos años se han observado algunos aislados resistentes cuya mutación no se localiza en la región de 81pb, por lo cual se propone la existencia de mecanismos adicionales generadores de resistencia (Zenteno-Cuevas et al.,2009).

Las cepas resistentes a rifampicina presentan resistencia cruzada a drogas químicamente relacionadas o con sitios de acción similares dentro de la célula, como rifapentina y parcialmente a rifabutina y rifalacina (Somoskovi et al.,2001). Finalmente, el diagnóstico de resistencia a rifampicina es especialmente importante debido a su fuerte asociación con la resistencia a isoniacida, considerándose como un marcador importante de TB-MDR (Quirós-Roldán et al.,2001).

Etambutol (E)

El *Etambutol* es otro fármaco empleado en contra de TB, se utilizó por primera vez en 1961, tiene actividad bacteriostática, es un buen antimicobacteriano y sólo actúa contra bacterias en fase de multiplicación activa (Quirós-Roldán et al.,2001). Se recomienda para tratar infecciones diseminadas con bacterias pertenecientes al complejo *M. avium*, especialmente en personas infectadas con VIH, que cursan con Diabetes Mellitus, o con antecedentes de abandono o recaída. La probabilidad de resistencia es más baja que con otras drogas, por lo cual se incluye en la pauta básica de tratamiento primario en los países con una tasa elevada de resistencia primaria a otro fármaco de primera línea (WHO,2010c).

El mecanismo de acción de este medicamento no ha sido claramente definido, se cree que está relacionado con la interferencia en el metabolismo del ARNr, la síntesis de fosfolípidos, la síntesis de ácido micólico y la síntesis de polisacáridos de la pared celular bacteriana (Quirós-Roldán et al.,2001). Evidencias experimentales y clínicas indican que el etambutol ejerce un efecto sinérgico con otros fármacos antituberculosos como consecuencia del incremento en la permeabilidad bacteriana, permitiendo el ingreso en mayor cantidad de otros medicamentos (Said et al.,2005) (Tabla I).

La resistencia a etambutol está asociada a mutaciones en tres genes: *embA*, *embB*, y *embC* localizados en un locus de 10,000pb (*embABC*), que codifican para la enzima arabinosiltransferasa, relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular. Cerca del 70% de las cepas resistentes a etambutol presentan una mutación puntual en el codón 306 Met del gen *embB*, causando la sustitución por Val, Leu o Ile (Sreevatsan et al.,1997). Otras mutaciones reportadas se encuentran en los codones 297, 306, 328, 330, 334, 406, 497, 745, 959, 1000 y 1024 (UniProtKB/TrEMBL U,2011a) (Tabla I).

Pirazinamida (P)

El empleo de la *Pirazinamida* se inició en el año de 1952, funciona específicamente contra bacilos semilantes que no son afectados por ningún otro medicamento antituberculoso. Una de sus principales ventajas es que disminuye el tiempo de tratamiento, debido a su sinergia con isoniacida y rifampicina; sin embargo, su principal

desventaja radica en su alta especificidad en contra de *M. tuberculosis*, de manera que si la cepa infectante es diferente, como pudiera ser *M. bovis*, el tratamiento no es efectivo (Said et al.,2005).

Respecto a su mecanismo de acción, la pirazinamida es transformada por la enzima pirazinamidasa a su principio activo, ácido pirazinoico, el cual genera un pH ácido intrabacteriano, al parecer causante del efecto contra *M. tuberculosis* (Zhang y Mitchison,2003) (Tabla I). La pirazinamidasa es codificada por el gen *pncA*, mutaciones este gen explican el 80% de las cepas resistentes a este fármaco (Quirós-Roldán et al.,2001). Para el caso particular de *M. bovis* en el codón 57 del gen *pncA* se ha identificado una mutación puntual (C→G), que resulta en la sustitución de His por Asp, suficiente para inactivar la enzima pirazinamidasa (Said et al.,2005; Zhang y Mitchison,2003)(Tabla I).

Fármaco	Gen	Mecanismo de resistencia	Frecuencia de mutaciones	Mutaciones reportadas	Cita
Estreptomicina (S)	<i>rrS</i>	Codifica para el ARNr 16S, al cual se une la estreptomicina para inhibir la síntesis proteica	8-21%	516 (C→T), 1400 (A →G), 1539 (A →G)	(Arráiz et al.,2005; Sekiguchi et al.,2008)
Isoniacida (I)	<i>katG</i>	Codifica para la enzima catalasa-peroxidasa, encargada de transformar la isoniacida en el principio activo, inhibiendo la síntesis del ácido micólico	50-68%	315 (Ser→Thr, Asn, Arg), 300 (Trp→Gly), 321 (Trp→Gly), 418 (Arg→Gln), 463 (Arg→Leu), 501 (Pro→Arg), 525 (Glu→Pro), 587 (Leu→Pro) y 700 (Ser→Pro).	(Said et al.,2005; Caws y Drobniewski,2001; Uniprotkb/Swiss-Prot R,2011a; Arráiz et al.,2005; Sekiguchi et al.,2008)
	<i>inhA</i>	Codifica la síntesis de la proteína enoil ACP reductasa, implicada en la producción de ácidos grasos de la micobacteria	21-34%	94(Ser→Ala) 21(Ile→Thr,V), 258(Ile→Thr)	(Mo et al.,2004; García et al.,2003; Arráiz et al.,2005; Kim et al.,2003; Uniprotkb/Swiss-Prot R,2011b; Zhang et al.,2005)
Rifampicina (R)	<i>rpoB</i>	Codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa, a la cual se une la rifampicina, interfiriendo en la síntesis del ácido nucleico en el proceso de replicación bacteriana	96-98%	región de 81pb (507-533) 531 (Ser →Leu, Thr), 498 (Val→Ala), 511 (Leu→Pro), 512 (Ser→Thr), 513– 516 (Gln,Phe,Met,Asp→His), 513 (Gln→Leu), 514 (Phe→Val), 515-518 (Deletado), 516 (Asp→Val), 524–527 (Leu,Thr,His,Lis→Trp,Pro,Gln), 526 (His→Asp,Leu,Asn,Pro,Gln,Arg), 456 (Ser→Leu), 531 (Ser→Gln,Trp), 533 (Leu→Pro	(Somoskovi et al.,2001; WHO,2007; Quirós-Roldán et al.,2001; Said et al.,2005; Caws y Drobniewski,2001; Mo et al.,2004; Zhang et al.,2005; Marín et al.,2004; Arráiz et al.,2005; Wada et al.,2004; Kocagoz et al.,2005; Uniprotkb/Swiss-Prot R,2011c; Zenteno-Cuevas et al.,2009)
Etambutol (E)	<i>embB</i>	Codifica la síntesis de la enzima arabinosiltransferasa, relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular, lo cual incrementa en la permeabilidad y la entrada en mayor cantidad de los otros medicamentos	47-65%	306 (Met→Val, Leu,Ile). 297 (Ser→Arg), 306 (Met→Ile, Leu, Val), 328 (Asp→Gly, Tyr), 330 (Phe→Val), 334 (Tyr→His), 406 (Gly→Ala, Asp), 497 (Gln→Lys, Arg), 745 (Gly→Asp), 959 (Asp→Ala), 1000 (Mer→Arg), 1024 (Asp→Asn)	(WHO,2007; Zhang y Mitchison,2003; Sreevatsan et al.,1997; Arráiz et al.2005; Said et al.,2005; Wu et al.2005; UniProtkb/TrEMBL U,2011a)
Pirazinamida (P)	<i>pncA</i>	Codifica para la enzima pirazinamidasa, la cual transforma la pirazinamida en ácido pirazinoico, resultando un pH ácido que parece ser el causante del efecto contra M. Tuberculosis	72-97%	57(His→Asp),	(Quirós-Roldán et al.,2001;Arráiz et al.,2005;Somoskovi et al.,2007; Zhang y Mitchison,2003; UniProtkb/TrEMBL U,2011b)) .

Tabla I: Genes asociados a TB-DR.

3.6. Métodos diagnósticos de TB-DR

Dada la importancia de actuar de forma rápida y efectiva ante la sospecha de estar frente a una cepa de TB-DR y gracias al conocimiento de los mecanismos genéticos generadores de resistencias, así como al desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular, en los últimos años ha sido posible desarrollar una nueva serie de técnicas enfocadas al diagnóstico de drogorresistencia a fármacos antituberculosos, buscando aquellas con alta sensibilidad y especificidad, que al mismo tiempo sean rápidas y de bajo costo (Tabla II). En términos generales se ha establecido una clasificación de estos métodos, en fenotípicos, considerando el cultivo microbiológico de la muestra a diagnosticar, y genotípicos, basados en el empleo de ADN de micobacterias provenientes de la muestra para el diagnóstico.

3.6.1. Métodos fenotípicos o asociados a cultivo bacteriano

Método de las proporciones/BACTEC

Este método descrito por Canetti y Groset, mide la proporción de colonias que han crecido en medios con concentraciones críticas de antibióticos, en relación con el crecimiento observado en un medio sin antibiótico. Dicho método es la base del sistema automatizado BACTEC, el cual consiste en el sembrado de los bacilos previamente cultivados en un medio líquido Middlebrook, rico en ácido palmítico con carbono 14 (^{14}C). El ^{14}C es un isótopo radioactivo natural que emite radiaciones beta, de manera que cuando las micobacterias metabolizan el ácido palmítico liberan al medio ambiente dicho isótopo en forma de CO_2 , marcado con ^{14}C . Este CO_2 es aspirado y llevado a una cámara de ionización, en donde se transforma en una corriente eléctrica que se cuantifica y es proporcional a la cantidad de bacilos que se encuentran en crecimiento, es decir la señal eléctrica se expresa como “índice de crecimiento” (Nava y Prieto,2001).

En cuanto al diagnóstico de resistencia, se emplean frascos con medio de cultivo, en los cuales se inocula la cepa a estudiar y se agrega el fármaco antituberculoso a evaluar, de modo que la emisión de radioactividad en un medio de cultivo con determinada droga, significa que el bacilo se está multiplicando y por tanto es resistente (Nava y Prieto,2001). Este es un sistema completamente automatizado y presenta

sensibilidad y especificidad superiores al 90%. Entre sus inconvenientes se encuentran el generar desperdicios radioactivos, la importante inversión inicial en la compra de equipo, reactivos y materiales, y la necesidad de personal altamente capacitado. Quizá su principal desventaja es el tiempo requerido para confirmar una negatividad, pues incluye por lo menos de 3 a 4 semanas para el cultivo y una semana más para obtener resultados de farmacoresistencia, contribuyendo a la transmisión de la TB MDR y poniendo en entredicho su pertinencia futura en programas de salud específicos contra TB-DR y MDR (Tapia-Conyer,2006; Quirós-Roldán et al.,2001; Nava y Prieto,2001).

Bactec MGIT 960

El método del tubo indicador de crecimiento micobacteriano o Bactec-MGIT 960® (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Inc). Es un sistema para crecimiento y detección de *Mycobacterium* completamente automatizado; funciona mediante un sensor especial de fluorescencia sensible al consumo de O₂, que permite monitorear el crecimiento microbiano, presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 89.8%, para estreptomina. Al compararlo con el sistema BACTEC tiene la ventaja de detectar el crecimiento micobacteriano en forma más rápida (Sierra et al.,2008; Otu et al.,2008; Ugarte-Gil et al.,2008) y evitar la producción de desechos radioactivos; no obstante, mantiene varias de sus desventajas como requerir personal capacitado y altos costos de inversión en equipo, materiales y reactivos (Sierra et al.,2008; Augustynowicz-Kopec et al.,2002).

MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility assay)

Este método detecta la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a isoniacida y rifampicina, directamente de las muestras de esputo. Tomando como base que el crecimiento del bacilo es más rápido en medio líquido que en medio sólido, esta técnica consiste en examinar mediante un microscopio de luz invertida, placas de cultivo con medio Middlebrook 7H9 y el antibiótico a evaluar, inoculadas con muestras de esputo; detectando en un promedio de 7 días la forma de cordón de las microcolonias características de TB (Ugarte-Gil et al.,2008; Moore et al.,2006).

Estos últimos dos factores, además de su bajo costo, son sus principales ventajas, ya que reduce considerablemente el tiempo de diagnóstico y posee una mayor sensibilidad y especificidad que el medio sólido, al evidenciar el crecimiento característico de *M. tuberculosis* (Ugarte-Gil et al.,2006) (Tabla II).

Métodos de óxido reducción: Alamar azul, Resazurina y Actividad Nitroreductasa

El Alamar azul es un método colorimétrico utilizado desde 1995 para medir cuantitativamente la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a agentes antimicrobianos. Se basa en la utilización del colorante alamar azul como indicador de óxido reducción; cuando hay presencia de células viables, dicha reacción se lleva a cabo y el medio de cultivo cambia de una coloración azul a rosa (Yajko et al.,1995; Acosta et al.,2004).

Estudios realizados con este método concluyen que, mediante el empleo de determinados puntos de corte, es posible generar una buena detección de cepas sensibles y resistentes a isoniacida y rifampicina (con una sensibilidad de 89% y especificidad del 100%); sin embargo, aún no hay resultados concluyentes para los casos particulares de estreptomina y etambutol, ya que estas drogas son bacteriostáticas y no bactericidas. Quizá la principal ventaja de esta técnica es su bajo costo y la fácil disponibilidad de los reactivos, por lo que bien podría apoyar programas de control de TB-DR en países con escasos recursos económicos (Acosta et al.,2004; Caviedes et al.,2000) (Tabla II).

El ensayo de micro valoración con resazurina (o REMA por sus siglas en inglés), es un método colorimétrico que permite, determinar drogorresistencia en un periodo de 1 semana a partir de bacilos aislados de esputo. Consiste en la incorporación del indicador resazurina a medio de cultivo líquido con diferentes concentraciones de antibiótico, si el bacilo se mantiene vivo, se detecta un cambio de color azul a rosa, como resultado de la reducción del indicador. Es una técnica barata, sencilla y con buenos resultados de sensibilidad y especificidad; entre sus inconvenientes esta la producción de aerosoles y la posibilidad de transferir bacilos de un pozo a otro de la microplaca (Palomino et al.,2002; Rivoire et al.,2007; Affolabi et al.,2008) (Tabla II).

Otra técnica similar es Nitroreductasa o “Prueba de Griess”. Se fundamenta en la actividad de la enzima nitroreductasa, que le confiere a *Mycobacterium* la capacidad

para reducir el nitrito en nitrato al emplear NaNO_3 en el medio de cultivo, detectando la resistencia mediante un cambio de color, que puede ir del rosa al violeta en función de la cantidad de bacilos. Ofrece resultados de 10-14 días a partir de un cultivo positivo o de muestras de esputo con baciloscopía positiva.

Entre sus ventajas se encuentran que es de bajo costo, requiere equipamiento microbiológico básico y posee buenos niveles de sensibilidad y especificidad (Ugarte-Gil et al.,2008; Affolabi et al.,2007; Martin et al.,2008) (Tabla II).

Micobacteriófagos

El uso de micobacteriófagos para el diagnóstico de TB-DR ofrece resultados fenotípicos en poco tiempo y a bajo costo. Las dos técnicas de mayor aceptación basadas en micobacteriófagos son la amplificación biológica de fagos (the phage-amplified biological assay: phaB) y la identificación de fagos reporteros de luciferasa (luciferase reporter phages: LRPs) (Hazbón,2004).

Amplificación biológica de fagos, PhaB

Esta técnica se basa en la amplificación de fagos en micobacterias sospechosas previamente tratadas con antibiótico, de manera que después del proceso fago-infeccioso, los fagos extracelulares son retirados del medio, mientras los fagos que lograron ingresar a las bacterias que sobrevivieron aún con los fármacos, se multiplican; así nuevas partículas de fago serán liberadas dentro del medio y las placas de lisis en las células infectadas se podrán observar y cuantificar (Hazbón,2004). De esta manera las placas aparecerán sólo en las células de micobacterias resistentes.

Con esta base, los laboratorios Biotec (Biotec Laboratories, Ltd. Reino Unido) desarrollaron recientemente un sistema comercial para la detección de *M. tuberculosis* con resistencia a Rifampicina llamado prueba rápida de placa de TB-Rif (FASTplaqueTB-Rif assay), con la ventaja de requerir 48 hrs para proporcionar resultados confirmatorios, pero con el inconveniente de necesitar de un cultivo previo de la bacteria (Hazbón,2004).

Fagos reporteros de luciferasa (LRPs)

Esta técnica permite determinar la susceptibilidad a fármacos antituberculosos mediante fagos reporteros de luciferasa (LRPs). Se fundamenta en la infección de micobacterias con fagos que contienen inserto en su genoma el gen reportero *flux*, el cual codifica para la luciferasa de luciérnaga. Estos fagos son capaces de duplicar y expresar el gen *flux* sólo en células viables de *Mycobacterium*, de forma que la proteína luciferasa, en presencia de ATP, cataliza una reacción que libera O₂ y luciferina, emitiendo fluorescencia (Hazbón,2004;Hazbón et al.,2003;Bardarov et al.,2003).

En lo que se refiere a muestras clínicas con sospecha de contener TB-DR, estas se co-cultivan con el panel de antibióticos y finalmente se infectan con LRPs, de modo que sólo aquellas cepas resistentes al fármaco sobrevivirán y serán detectadas fácil y rápidamente por su emisión de fluorescencia mediante un luminómetro o una película radiográfica. La primera opción ofrece una alta sensibilidad y resultados cuantitativos en aproximadamente 54hrs (con una sensibilidad de 86-100% y especificidad del 73-99%, para rifampicina); mientras que la película radiográfica tiene valores similares de eficacia, pero su principal atributo es la disminución en costos; no obstante, requiere mayor tiempo (94 hrs) para proporcionar resultados confirmatorios (Hazbón,2004; Hazbón et al.,2003; Bardarov et al.,2003).

Esta técnica también se ha aplicado sobre muestras de esputo, donde aporta resultados en aproximadamente 12 días, y su utilización resulta atractiva en los países en vías de desarrollo con alta prevalencia de TB-DR (Bardarov et al.,2003).

3.6.2. Métodos diagnósticos Genotípicos o moleculares

La aplicación de métodos de diagnóstico genotípicos ha sido posible, entre otras cosas, gracias a la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*, y a la identificación y caracterización de genes asociados a drogorresistencia. Estos métodos ofrecen la posibilidad de identificar mutaciones asociadas a TB-DR de forma precisa y generar resultados a partir de 100 bacilos o menos por muestra. Quizá lo más importante es que permiten realizar el diagnóstico en cuestión de horas (Guevara et al.,2003), ya que al

utilizar la muestra clínica directamente como material biológico, se elimina el tiempo relacionado con el crecimiento del bacilo.

En todas las técnicas moleculares el primer paso es la extracción de ADN y la amplificación de fragmentos de gen, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (de acuerdo a sus siglas en inglés), de la región que contiene la(s) mutación(es) responsable(s) de la resistencia, para posteriormente identificarse mediante el empleo de alguno de los siguientes métodos:

Polimorfismo conformacional de hebra sencilla por PCR. (Polymerase Chain reaction single stranded conformational polymorphism, SSCP)

Este método ha sido utilizado en investigaciones asociadas con la identificación de mutaciones relacionadas a enfermedades genéticas y recientemente se ha extendido su empleo al estudio de mutaciones coligadas con la resistencia a antibióticos en tuberculosis (Estrada-Cuzcano et al.,2005). Se fundamenta en que bajo condiciones no desnaturalizantes, un fragmento de una hebra de ADN adopta una conformación espacial, en función de su secuencia de nucleótidos; sin embargo, ante la existencia de una mutación, la secuencia nucleotídica y el plegamiento serán distintos, generando un patrón de migración electroforético diferente, detectable en una matriz de poliacrilamida (Hazbón,2004).

Esta técnica se ha aplicado al estudio de TB-DR (Estrada-Cuzcano et al.,2005; Bobadilla-Del-Valle et al.,2001; Cheng et al.,2007; Wu et al.,2005). Si bien es de bajo costo y sencilla de realizar, existen estudios que cuestionan su sensibilidad y especificidad para la detección de mutaciones en los genes responsables de generar resistencia a isoniacida, rifampicina y etambutol (Bobadilla-Del-Valle et al.,2001; Cheng et al.,2007; Wu et al.,2005) (Tabla. I).

Ensayo de prueba en línea. LiPA (Line probe assay, LiPA)

Este método se utiliza para identificar aislados de micobacteria con diagnóstico previo por cultivo en BACTEC. Se basa en la hibridación de fragmentos biotinilados de ADN de una muestra sospechosa de ser TB-DR, sobre una tira de membrana en la cual se

encuentran adheridos sondas de oligonucleótidos en línea, detectando dicho acoplamiento mediante un sistema colorimétrico vía biotina-streptavidina (Miller et al.,2000). El kit comercial para identificar resistencia a rifampicina contiene diez sondas con las cuales se puede determinar tanto la pertenencia al complejo *M. tuberculosis*, como la detección de cuatro mutaciones específicas en el gen *rpoB* (Morgan et al.,2005). Estudios realizados mediante el empleo de esta técnica concluyen que es altamente sensible (95% o más) y específica (100%) para detectar tuberculosis resistente a rifampicina tanto de medios de cultivo como aislados y ligeramente menor para especímenes clínicos (Morgan et al.,2005).

GenoType MTBDRplus

Es una técnica disponible comercialmente que permite la detección rápida de cepas del complejo *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina e isoniacida, detectando mediante hibridación con sondas específicas, una variedad de mutaciones en el fragmento de 81pb del gen *rpoB*, así como la mutación del codón 315 del gen *katG* y mutaciones en la región promotora del gen *inhA* (Ugarte-Gil et al.,2008; Hillemann et al.,2007).

Entre las ventajas que presenta se encuentra el poder aplicarse tanto en cultivo como directamente en esputo; además ofrece una sensibilidad para detectar resistencia a rifampicina de 98.1% y para isoniacida de 90.2%, con una especificidad de 97.8% y 100% para cada droga respectivamente (Ugarte-Gil et al.,2008; Hillemann et al.,2007).

Sistemas de detección por fluorescencia mediante PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real permite la detección de mutaciones con ayuda de sondas de ADN marcadas con diferentes tipos de fluorescencia. Para ello se amplifica la región en donde se ubica la mutación causante de resistencia al fármaco y se analiza la fluorescencia del producto generado (Zhang et al.,2005; Kocagoz et al.,2005; Marín et al.,2004; Parashar et al.,2006). De esta forma se han identificado mutaciones en los genes *rpoB*, *katG*, *inhA* y *embB*.

Este sistema detecta el ADN de micobacterias provenientes de esputo, lavado bronco alveolar, fluido cerebro espinal, fluido pleural o muestras de tejido, lo que amplía su

utilidad como técnica diagnóstica. Además se puede emplear, en un mismo ensayo, diversas sondas marcadas con diferentes fluorógenos, evidenciando distintas mutaciones en varias muestras clínicas, inclusive si difieren por un sólo nucleótido (SNP, single nucleotide polymorphism), proporcionándole una versatilidad y rapidez importante (Zhang et al.,2005; Kocagoz et al.,2005; Marín et al.,2004; Bobadilla-Del-Valle et al.,2001; Parashar et al.,2006):

Para este procedimiento se han desarrollado diversos tipos de sondas, con diferentes características y niveles de eficiencia. Destacan las sondas “*Molecular Beacons*” y las sondas “*FRET*”, ambas permiten detectar SNPS de manera eficiente; sin embargo, comparten el inconveniente de ser costosas, requerir equipo sofisticado y personal especializado. Las ventajas de esta técnica radican en el corto tiempo para obtener resultados y los valores de especificidad superiores a 85%, con sensibilidad entre 70-90% en su aplicación al diagnóstico de resistencia a rifampicina e isoniacida (Zhang et al.,2005; Kocagoz et al.,2004; Hazbón,2004; Bobadilla-Del-Valle et al.,2001; Parashar et al.,2006) Tabla II.

Recientemente se ha introducido un nuevo sistema llamado Xpert® MTB/RIF, como una prometedora técnica para el diagnóstico de tuberculosis drogorresistente. Es una prueba de PCR en tiempo real que utiliza cinco sondas molecular beacons sobrelapadas, complementando las 81pb de la región determinante de resistencia a rifampicina (RDRR) en el gen *rpoB* de *M tuberculosis*. Según los autores esta prueba ofrece una sensibilidad para el diagnóstico de TB superior a 95%, y el 90% de las cepas resistentes a rifampicina con mutaciones en la RDRR también son resistentes a Isoniacida, por lo cual el sistema puede utilizarse como marcador sustituto para MDR en TB (Helb et al.,2010). Sin embargo, otros autores mencionan que la sensibilidad de este procedimiento necesita ser evaluada con mayor detalle en las regiones con altos niveles de resistencia primaria y adquirida y gran diversidad de cepas circulantes, ya que la diversidad, distribución y ausencia de mutaciones en la región RDRR de *rpoB* pueden variar y causar diferentes prevalencias de mutaciones (Van Deun et al.,2010; Van Rie et al.,2010)

Microarreglos de ADN, (DNA Microarray).

Esta es una de las técnicas genotípicas más recientes que emplea la hibridación de sondas específicas marcadas con fluorocromos, con el ADN derivado de las muestras clínicas con sospecha de drogorresistencia. El sistema requiere el empleo de un microdispositivo, el cual consta de un cristal recubierto con una película de oro, sílice o algún otro material al que se adhieren genes o grupos de genes, silvestres y mutados, de modo que al colocar el material genético proveniente de una muestra, esta hibrida con la sonda complementaria y emite una señal fluorescente, cuyo análisis posterior permite identificar los genes portadores o carentes de las mutaciones, identificando así la resistencia o susceptibilidad por al antibiótico (Betts,2002; Palomino et al.,2009).

Quizá el mejor atributo de esta técnica es su capacidad de analizar de manera global, automatizada y simultánea cientos de mutaciones de un mismo o diferentes genes, en un sólo ensayo y por lo tanto generan un ahorro de tiempo considerable. Esta técnica actualmente está abriendo un nuevo panorama en el diagnóstico de la drogorresistencia de TB (Betts,2002; Palomino et al.,2009); sin embargo, no se cuenta con estudios que evalúen su sensibilidad y especificidad. Por otro lado los altos costos del equipo para el análisis, así como los relacionados con el diseño y construcción de los microdispositivos y la necesidad de contar con personal altamente calificado, limitan su utilidad en países con escasos recursos.

Secuenciación genómica

Esta técnica es la más exacta y está considerada como el estándar molecular para definir genotípicamente a una cepa drogorresistente. Permite la ubicación concreta de la(s) mutación(es) y consiste en identificar y analizar la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN específico (Tapia-Conyer,2006; Caws y Drobniowski,2001; Hazbón,2004). Sólo se requiere obtener el ADN de la cepa a estudiar, amplificar por PCR la región del gen de interés y este producto es analizado por un secuenciador automático, el cual finalmente presenta la secuencia del fragmento de ADN (Hazbón,2004).

Para el caso del diagnóstico de resistencia a fármacos en micobacterias, es posible secuenciar el gen involucrado en dicho mecanismo, e identificar la mutación o

mutaciones específicas mediante comparación con el gen de una cepa sensible (Tapia-Conyer,2006; Hazbón,2004). Sin embargo, las limitaciones de esta técnica son los altos costos del equipo, los materiales y reactivos que se requieren, y la necesidad de contar con personal capacitado. Pese a estas desventajas, varios estudios demuestran que la secuenciación es considerada la técnica de elección para la detección genotípica de resistencias en cepas de *M. tuberculosis* (Marín et al.,2004).

Método	Descripción	Principal (es) desventajas	Cita
Fenotípicos			
Bactec	Método radiométrico basado en la identificación del crecimiento de micobacterias en medios de cultivo con determinada droga, mediante el marcaje con C14	Disponibilidad de desperdicios radioactivos, altos costos, personal capacitado, 3 semanas para obtener resultados.	(Nava y Prieto,2001; Sierra et al.,2008; Moore et al.,2006)
Bactec MGIT	Método fluorométrico basado en la identificación de crecimiento de micobacterias en medios con antibiótico, mediante un sensor de fluorescencia sensible al consumo de O2.	Altos costos, personal capacitado, tiempo para crecimiento de los bacilos.	(Nava y Prieto,2001; Sierra et al.,2008; Otu et al.,2008; Ugarte-Gil et al.,2008; Augustynowicz-Kopeć et al.,2002)
MODS	Método basado en el rápido crecimiento de bacilos en placas de cultivo líquido, inoculadas con muestras de esputo y antibiótico; detectando la forma de cordón de las microcolonias de TB con microscopio de luz invertida.	Necesidad de microscopio invertido y personal capacitado	(Ugarte-Gil et al.,2008; Augustynowicz-Kopeć et al.,2002; Moore et al.,2006)
Alamar azul	Método colorimétrico que identifica la presencia de micobacterias en medios con antibiótico, con base en reacciones de óxido reducción evidentes por el colorante alamar azul.	No hay resultados contundentes para drogas bacteriostáticas como estreptomycin y etambutol	(Yajko et al.,1995; Acosta et al.,2004; Caviedes et al.,2000)
Resazurina	Método similar al Alamar azul, que emplea el indicador resazurina, detecta cambio de coloración de azul a rosa.	Genera aerosoles bio-contaminantes, falsos positivos por contaminación de placas.	(Ugarte-Gil et al.,2008; Palomino et al.,2002 ; Rivoire et al.,2007; Affolabi et al.,2008)
Nitroreductasa	Cuantifica la actividad de la enzima oxidoreductasa, que reduce el nitrito en nitrato en medio líquido, detecta bacilos resistentes por un cambio en la coloración de rosa a rojo o violeta.	Genera aerosoles bio-contaminantes	(Ugarte-Gil et al.,2008; Affolabi et al.,2007; Affolabi et al.,2008; Martin et al.,2008)
LPRs	Método basado en la identificación de micobacterias mediante la emisión de luz por luciferina, como respuesta a la infección de bacilos con fagos que tienen inserto el gen <i>lux</i> .	Requiere de personal capacitado,	(Hazbón et al.,2003; Hazbón,2004; Bardarov et al.,2003)
Genotípicos			
Secuenciación	Método que identifica y analiza la secuencia nucleotídica de un fragmento de gen específico mediante un paquete de computo, con la finalidad de identificar mutaciones que se sabe causan drogoresistencia.	Alto costo, personal altamente capacitado.	(Tapia-Conyer,2006; Caws y Drobniowski.,2001;Marín et al.,2004; Hazbón,2004)
Q-PCR	Método que permite la detección de mutaciones en fragmentos de genes causantes de drogoresistencia mediante el uso de sondas de ADN marcadas con fluorescencia.	Alto costo, personal altamente capacitado, conocimiento de posibles lugares de mutación, baja sensibilidad para la identificación de resistencia fenotípica,	(Zhang et al.,2005; Parashar et al.,2006)
SSCP	Método que identifica cepas mutadas con base en que las diferencias en la secuencia de hebras individuales de ADN en condiciones no desnaturalizantes, ocasionan diferencias en autoplegamiento y por tanto distinto patrón de migración en geles de poliacrilamida en comparación con cepas sensibles.	Baja sensibilidad en especial para mutaciones en isoniacida, rifampicina y etambutol.	(Bobadilla-Del-Valle et al.,2001; Cheng et al.,2007)
LiPA	Sistema colorimétrico que identifica mutaciones basado en la hibridación reversa de fragmentos de PCR de <i>Mycobacterium</i> biotinilados, con sondas de nucleótidos colocados en línea en una tira de membrana.	Comercialmente sólo hay disponibilidad para detección de mutaciones de resistencia a rifampicina	(Augustynowicz-Kopeć et al.,2002; Miller et al.,2000; Morgan et al.,2005)
GenoType MTBDRplus	Técnica similar a LiPA, detecta resistencia a rifampicina e isoniacida	Sólo está disponible para diagnóstico de resistencia a isoniacida y rifampicina.	(Ugarte-Gil et al.,2008;Palomino et al.,2009)
Microarreglos	Fundamentado en el diagnóstico de drogoresistencia en la hibridación de ADN de <i>Mycobacterium</i> con múltiples sondas específicas con fluorocromos adheridas a una membrana, permitiendo el análisis de miles de genes en un solo ensayo.	Conocimiento previo de todas las mutaciones causantes de drogoresistencia, alto costo, personal altamente capacitado.	(Betts,2002;Palomino et al.,2009)

Tabla II: Métodos de diagnóstico de TB-DR

4. Justificación

Tomando en cuenta las cifras epidemiológicas y la información anteriormente referida es clara la trascendencia que representa la TB-DR como un problema de salud pública en Veracruz. En este sentido, no existen estudios acerca de las características moleculares de las cepas de TB DR que existen en el estado, ni tampoco sobre las principales mutaciones de las cepas causantes de drogorresistencia.

Esta situación podría estar favoreciendo la implementación de tratamientos farmacológicos generalizados inespecíficos, poco efectivos y por tanto más costosos. Con menor probabilidad de curación, mayor riesgo de exposición del bacilo y contagio de personas cercanas al paciente, llevando al incremento de la drogorresistencia, y haciendo de este un fuerte problema social, económico y de salud.

Dichas condiciones, en contraposición a los avances tecnológicos en el campo molecular, muestran la necesidad de incorporar técnicas que proporcionen información precisa acerca de las características genéticas asociadas a la farmacorresistencia de las cepas de *Mycobacterium* que circulan en uno de los estados con mayor número de casos de tuberculosis y drogorresistencia en el país.

La caracterización molecular que se desarrolló en este trabajo permite generar información sobre las mutaciones que se encuentran con mayor frecuencia en aislados de *Mycobacterium* provenientes del estado de Veracruz, con lo cual será posible el desarrollo posterior de procedimientos de diagnóstico molecular específicos, sensibles y rápidos. Adicionalmente estos cambios serán de un enorme beneficio para evaluar la utilidad, efectividad, validez y seguridad de emplear localmente métodos diagnósticos validados y aprobados inicialmente en otros países.

5. **Objetivos**

General: Realizar una caracterización genética de las cepas drogorresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* presentes en Veracruz, mediante la identificación de mutaciones asociadas con la resistencia a fármacos de primera línea y su relación con el contexto epidemiológico del portador.

Específicos:

1. Identificar mediante secuenciación, la frecuencia de mutaciones en regiones de genes conocidos, que ocasionan resistencia a fármacos de primera línea:

- *rrS* → estreptomina
- *katG* e *inhA* → isoniacida
- *rpoB* → rifampicina
- *embB* → etambutol
- *pncA* → pirazinamida

2. Identificar la existencia de asociaciones entre las mutaciones de genes relacionados a farmacorresistencia, y variables del portador:

- resistencia a otros fármacos
- edad
- sexo
- ubicación geográfica
- comorbilidad
- toxicomanías
- tiempo transcurrido desde el primer diagnóstico de TB
- tipo de tratamiento

6. Metodología

6.1 Diseño

Estudio observacional que permitirá caracterizar las mutaciones encontradas en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistente, de pacientes del estado de Veracruz.

Este proyecto se realizó en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP), quienes proporcionaron los aislados clínicos inactivados por calor de *Mycobacterium tuberculosis* (2007-2010) con perfil de DR determinado por la técnica Bactec y MGIT. Así como el acceso a información sobre las características generales del portador de dichos bacilos (paciente diagnosticado con TB-DR).

Teniendo como unidades de estudio a las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistente, se analizaron aquellas muestras que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Diagnóstico de tuberculosis confirmado por baciloscopía.
- Diagnóstico de drogorresistencia confirmado por Bactec-MGIT a por lo menos uno de los medicamentos de primera línea (Isoniacida $>0.1\mu\text{g/ml}$, Rifampicina $>1.0\mu\text{g/ml}$, Pirazinamida $>100\mu\text{g/ml}$, Estreptomina $>1.0\mu\text{g/ml}$ y Etambutol $>5.0\mu\text{g/ml}$).
- Datos sobre el paciente portador del bacilo de *M tuberculosis* drogorresistente.

En dichas unidades de estudio, se midieron las siguientes variables con sus respectivas escalas:

Variable	Definición	Tipo de variable y Escala
Paciente		
Lugar de procedencia	Jurisdicción o Municipio del cual procede el paciente que donó la muestra de expectoración con tuberculosis.	<i>Cualitativa</i> Nominal Politómica
Edad	Edad en años cumplidos, que tiene la persona al momento de entregar la muestra con tuberculosis al LESP	<i>Cuantitativa</i> Razón Discreta
Sexo	Sexo de la persona que acude al LESP a llevar la muestra.	<i>Cualitativa</i> Nominal Dicotómica: <ul style="list-style-type: none"> • Masculino • Femenino
Comorbilidad	Enfermedad que presenta el paciente además de la TB	<i>Cualitativa</i> Nominal Politómica: <ul style="list-style-type: none"> • Diabetes • VIH • Desnutrición • Anemia • Cáncer • Ninguna
Toxicomanía	Hábito alcohólico o drogadicción manifestada en las notas del expediente clínico	<i>Cualitativa</i> Nominal Dicotómica: <ul style="list-style-type: none"> • Alcoholismo: Sí, No • Drogadicción Sí, No
Tiempo de evolución de TB	Años transcurridos desde el primer diagnóstico de TB hasta la fecha, independientemente del número de recaídas o los lapsos de tiempo sano	<i>Cuantitativa</i> Razón Discreta
Tratamiento	Tipo de tratamiento farmacológico llevado por el paciente, respecto al éxito o fracaso de tratamientos previos.	<i>Cualitativa</i> Nominal Dicotómica: <ul style="list-style-type: none"> • Primario • Retratamiento
Bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
Resistencia	Antibiótico de primera línea al cual tiene resistencia la muestra clínica identificado por BACTEC	<i>Cualitativa</i> Nominal Politómica: <ul style="list-style-type: none"> • Estreptomina (S) • Isoniacida (I) • Rifampicina (R) • Etambutol (E) • Pirazinamida (P)
Gen de resistencia	Gen en el cual está presente por lo menos una mutación dentro de la región amplificada, con respecto a la cepa silvestre.	<i>Cualitativa</i> Nominal Politómica: <ul style="list-style-type: none"> • <i>katG</i>, • <i>inhA</i>, • <i>rpoB</i>, • <i>pncA</i> , • <i>rrS</i>, • <i>embB</i>
Codón de mutación	Codón de cada gen en el cual se presenta la mutación.	<i>Cuantitativa</i> Razón Discreta
Tipo de Mutación	Tipo de mutación encontrada en función de si la expresión del de nucleótido generaría el mismo aminoácido (sinónima) o uno diferente (no sinónima).	<i>Cualitativa</i> Nominal Dicotómica: <ul style="list-style-type: none"> • Mutación sinónima • Mutación no sinónima

Tabla III: Variables

Una vez con las cepas se procedió de acuerdo al siguiente diagrama de flujo:

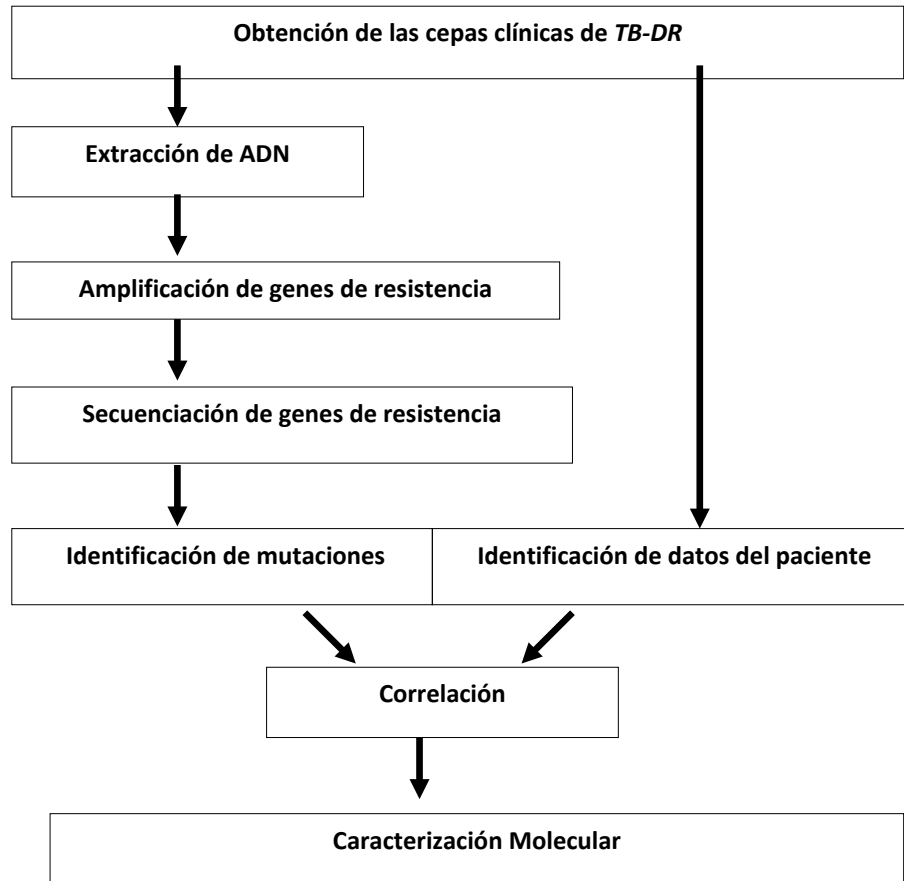


Figura 10: Diagrama de flujo para la obtención de información

6.2 Materiales y Método

6.2.1 Obtención de muestras clínicas y datos del paciente

Este estudio incluyó cepas de TB-DR resistentes a antibióticos de primera línea previamente identificadas mediante el sistema BACTEC o MGIT, obtenidas en el Departamento de Micobacterias del LESP durante un periodo de recolección de 2 años (2009-2010), más algunas cepas previamente recuperadas en los años 2007 y 2008.

Las condiciones de aislamiento fueron las tradicionales, mediante descontaminación de la muestra por el método de Petroff y sembrado simultáneo en medio Middlebrook y Lowenstein-Jensen, dichos procedimientos fueron realizados por personal del LESP. Mediante un acuerdo de confidencialidad establecido entre los participantes del proyecto, se accedió al resumen clínico que el médico tratante envía al LESP para

solicitar el servicio de perfil de drogorresistencia; de dicho documento se obtuvieron los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes. Es importante mencionar que en todo momento se mantuvo el anonimato de los individuos y la información recuperada solamente fue empleada para el desarrollo de este trabajo.

6.2.2 Estandarización de técnicas moleculares

6.2.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN de las cepas en cultivo líquido se llevó a cabo en una campana de bioseguridad nivel IIA (Telstar), siguiendo la metodología de Van Solingen (Van Solingen et al,1991). Las muestras etiquetadas se centrifugaron 15min a 1400xg y decantaron, el botón se resuspendió en 400µl de TE 1X e incubó 15 min a 95°C. La lisis celular se realizó incubando con lisozima (10mg/ml) 1hr a 37°C, proteinasa K (10mg/ml) en presencia de SDS 10% durante 1hr a 65°C; y NaCl 5M con CTAB-NaCl por 10min a la misma temperatura. Para extraer el ADN se utilizó cloroformo alcohol isoamílico (24:1) se centrifugó 10min a 26500xg, se recuperó la fase acuosa y añadió isopropanol dejando precipitar toda la noche a -20°C. Finalmente se centrifugó 15min a 26500xg para obtener el botón de ADN, el cual se lavó con etanol al 70% y resuspendió en agua libre de nucleasas. La concentración de ADN se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop ND1000).

6.2.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la estandarización de la reacción de PCR de punto final se empleó ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis H37Rv*, la cual se utilizó como control positivo interno. Quedando establecidas las siguientes concentraciones: Tris 10 mM pH 8.0 (5µl), MgCl₂ 1.5 mM (1.5µl), deoxinucleótidos trifosfatados 0.8 mM (0.5µl), iniciador 5'-3' y 3'-5' 0.4µM, (2µl) 1U de enzima *Taq* polimerasa (0.1µl) (Fermentas), 5% de glicerol (1.25µl), 100 ng de ADN cromosomal de cada cepa y agua libre de nucleasas para llevar a volumen final de 25 µl.

Los iniciadores utilizados para los siete genes se muestran en la siguiente tabla:

Antibiótico	Gen	Iniciadores	Secuencia	Posición (Codón)	TM	Tamaño del producto	Cita
Estreptomina (S)	rrS	PR13 F	5_AAACCTCTTTCACCATCGAC_3	428	52.6	552pb	(Sekiguchi et al.,2007)
		PR30 R	3_CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTG_5	979	56.1		
Isoniacida (I)	katG 1	<i>katG</i> F	5_GCAGATGGGGCTGATCTACG_3	224	57.7	555pb	(Zenteno-Cuevas et al.,2009)
		<i>katG</i> R	3_AACTCGTCGGCCAATTCCTC_5	408	57.5		
	InhA	<i>inhA</i> F	5_AGGTCGCCGGGTGGTCAGC_3	-115*	60	517pb	(Morlock et al.,2003)
		<i>inhA</i> R	3_AGCGCCTTGGCCATCGAAGCA_5	134	60		
Rifampicina (R)	rpoB 1	<i>rpoB</i> F	5_AGCGGATGACCACCCAGGAC_3	477	61.9	266pb	(Zenteno-Cuevas et al.,2009)
		<i>rpoB</i> R	3_TCAGGGGTTTCGATCGGGCA_5	575	61.3		
Etambutol (E)	embB	<i>embB</i> F	5_CGGCATGCGCCGGCTGATTC_3	264	64.7	259pb	(Chaoui et al.,2009)
		<i>embB</i> R	3_TCCACAGACTGGCGTCGCTG_5	349	62.2		
Pirazinamida (P)	pncA	PR9 F	5_GGCGTCATGGACCCTATATC_3_	-80*	54.7	670pb	(Sekiguchi et al.,2007)
		PR10 R	3_CAACAGTTCATCCCGGTTTC_5_	196	53.6		

*) Nucleótido

Tabla IV: Iniciadores utilizados para la amplificación de genes asociados a TB-DR

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial 3 minutos a 95°C,
- 35 ciclos de:
 - Desnaturalización 40 segundos a 95°C;
 - Hibridación 30 segundos a 57 °C
 - Extensión 1 minuto a 72°C
- Extensión Final durante 3 minutos a 72°C.

Posteriormente, los productos de PCR se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio, para examinar la presencia y coincidencia en tamaño, de las bandas del producto de interés. (Figura 11).

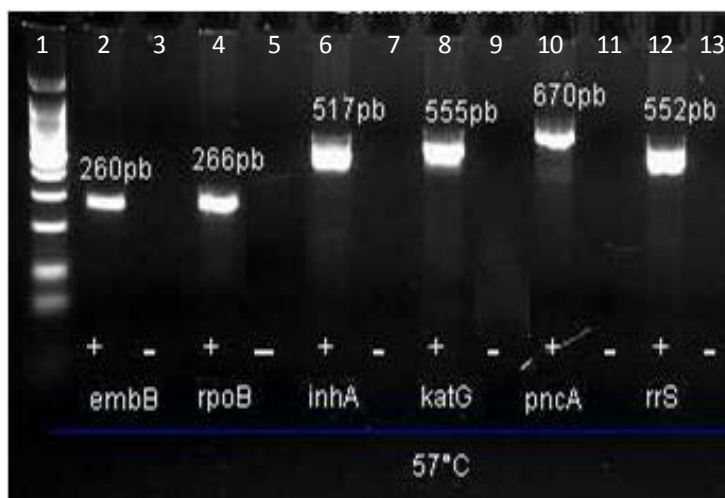


Figura 11: Gel de agarosa al 1.5% que muestra productos de PCR de genes asociados a TB-DR.

+) Indica la presencia de ADN. -) No se adicionó ADN a la reacción. 57°C indica la temperatura de hibridación de los iniciadores. Carril 1) Marcador de pb, Carril 2) producto de *embB*, Carril 3) control negativo de *embB*, Carril 4) producto de *rpoB*, Carril 5) control negativo de *rpoB*, Carril 6) producto de *inhA*, Carril 7) control negativo de *inhA*, Carril 8) producto de *katG*, Carril 9) control negativo de *katG*, Carril 10) producto de *pncA*, Carril 11) control negativo de *pncA*, Carril 12) producto de *rrS*, Carril 13) control negativo de *rrS*.

6.2.2.2 Purificación de productos de PCR

Los productos amplificados de cada gen, de la cepa H37Rv, se purificaron para remover los excesos de dNTPs, iniciadores, Mg, etc., de la reacción de PCR por medio de columnas Millipore (Amicon Ultra 0.5ml 30k Centrifugal Filters for DNA Purification and Concentration) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Para comprobar la presencia de los productos purificados y conocer su concentración se realizó una nueva electroforesis con un marcador de peso/masa molecular para cuantificación (MassRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use, 80-1031 bp, Fermentas), mediante el cual se relaciona la intensidad de la banda del producto de PCR con la intensidad de las bandas del marcador de peso molecular de concentración conocida según el volumen cargado (Figura 12).

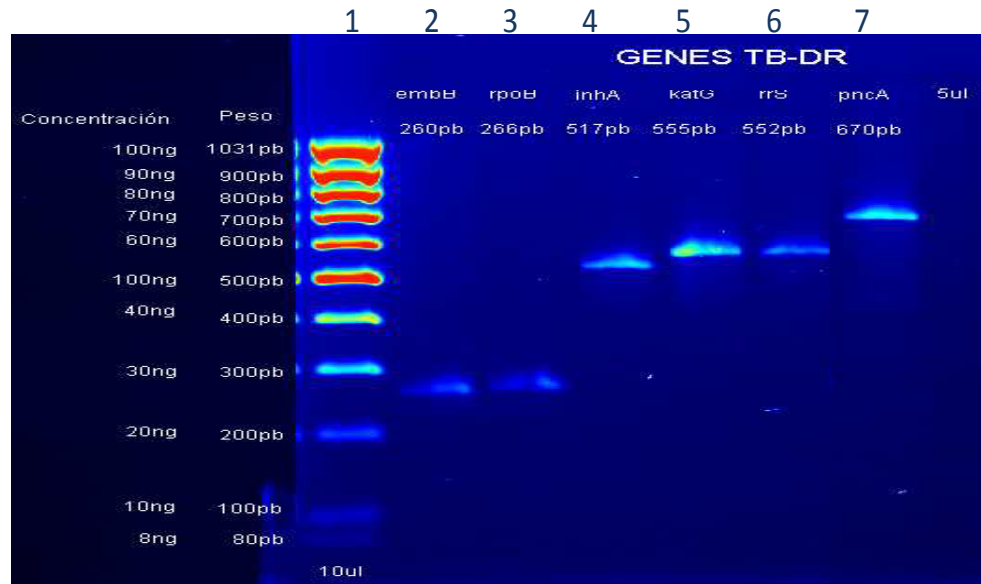


Figura 12: Gel de agarosa al 1.5% que muestra los productos purificados de PCR de los genes a estudiar.

Carril 1) Marcador Peso/Masa, Carril 2) producto de *embB*, Carril 3) producto de *rpoB*, Carril 4) producto de *inhA*, Carril 5) producto de *katG*, Carril 6) producto de *rrS*, Carril 7) producto de *pncA*

6.2.2.3 Marcaje: Reacción de secuenciación con terminadores BigDye

La reacción de secuenciación se realizó mediante amplificación cíclica y marcaje, para lo cual se adicionó 15-20ng de producto de PCR purificado (1-4µl de acuerdo a lo estimado por el mass ruler en el corrimiento electroforético), buffer de secuenciación 5X (4µl), terminadores BigDye (2µl) (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems), iniciadores 5'-3' y 3'-5' 1pM (3.2µl) en tubos separados (Tabla IV) y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen final de 20µl.

Las condiciones de termociclado utilizadas fueron las siguientes: 25 ciclos con desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante 15 segundos y extensión a 60°C durante 4 minutos, haciendo rampa de 1°C por segundo en cada paso.

6.2.2.4 Purificación de productos marcados

Para remover los restos de marcadores fluorescentes se filtraron los 20µl de reacción de secuenciación con columnas ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research), siguiendo las condiciones del proveedor. El ADN se eluyó de la columna con 10µl de formamida al 20% y se adicionaron 10µl de formamida concentrada para obtener un volumen final de 20µl, el cual se sometió a un proceso de desnaturalización por calor durante 5 min a 95°C e inmediatamente se mantuvieron a 0°C con la finalidad de mantener los productos lineales y evitar su renaturalización.

6.2.2.5 Secuenciación por electroforesis capilar

La electroforesis de los productos se llevó a cabo en un secuenciador de ocho capilares Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). En el programa Data Collection se indicaron las siguientes condiciones para la electroforesis:

- Longitud del Arreglo: 50cm,
- Tipo de Polímero: POP7,
- Química de secuenciación: BigDye Terminator V3.1,
- Módulo de corrida: “rapid” (migración de productos en aproximadamente 1hr)

El análisis en crudo de las secuencias se hizo en el programa Sequencing Analysis, en el cual se revisó el número de bases secuenciadas, el espectroferograma y los valores de calidad (QV) arrojados por el programa Basecaller (KB) (Figura 13).

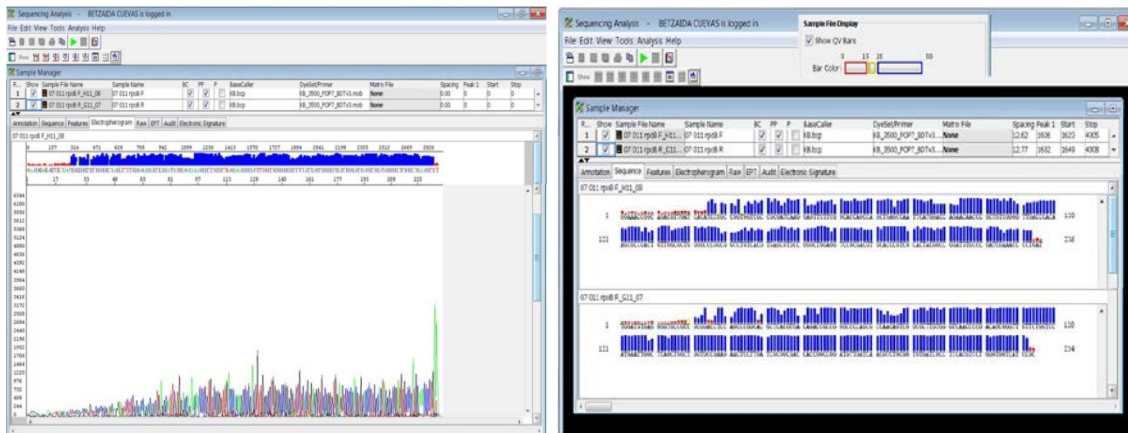


Figura 13: Izquierda: Espectroferograma de una secuencia del gen *rpoB* y Derecha: Barras QV de cada base.

Sólo se analizaron aquellas secuencias cuyos QV fueron ≥ 20 , asegurando con esto que la probabilidad de error en la asignación de bases fue menor al 1%. La siguiente tabla relaciona los valores de QV con la posibilidad de error ocurrida durante la asignación de bases en función de la intensidad de fluorescencia registrada y espacios entre ellas (Figura 14).

QV Quality Value, Valor de Calidad= $-10\log_{10}(PE)$ Pe = probabilidad de error KB bascaller o llamador de bases genera QVs de 1 a 99 Bases puras de alta calidad tendrán QV 20-50 Bases mixtas de alta calidad tendrán QV 10-50 Tamaño y color de barras QV son idénticas para QVs 50-99					
QV	Pe	QV	Pe	QV	Pe
1	79%	21	0.790%	41	0.0079%
2	63%	22	0.630%	42	0.0063%
3	50%	23	0.500%	43	0.0050%
4	39%	24	0.390%	44	0.0039%
5	31%	25	0.310%	45	0.0031%
6	25%	26	0.250%	46	0.0025%
7	20%	27	0.200%	47	0.0020%
8	15%	28	0.150%	48	0.0015%
9	12%	29	0.120%	49	0.0012%
10	10%	30	0.100%	50	0.0010%
11	7.9%	31	0.079%	60	0.0001%
12	6.3%	32	0.063%	70	0.00001%
13	5.0%	33	0.050%	80	0.000001%
14	4.0%	34	0.040%	90	0.0000001%
15	3.2%	35	0.032%	99	0.00000012%
16	2.5%	36	0.025%		
17	2.0%	37	0.020%		
18	1.6%	38	0.016%		
19	1.3%	39	0.013%		
20	1.0%	40	0.010%		

Figura 14: Tabla de equivalencias entre valores de calidad (QV) y probabilidad de error en la asignación de base.

6.2.2.6 Análisis de mutaciones

El alineamiento y análisis de mutaciones se realizó con el programa SeqScape, en donde se observó el QV de la secuencia y se verificó el cambio de base en función del espectroferograma en sentidos 5'-3' y 3'-5' (Figura 15).



Figura 15: Izquierda: Espectroferograma de una secuencia en sentido 5´-3´y 3´-5´. Derecha: Barras QV para evaluar un cambio de base.

La línea amarilla indica la secuencia de referencia. El color azul de las barras indican QV >20. A la izquierda se observa la secuencia completa y a la derecha el espectroferograma de la región con cambio de base flanqueada por puntos en donde la secuencia es igual a la referencia.

La secuencia se tradujo a aminoácidos para identificar si la mutación encontrada fue sinónima o no sinónima y se establecieron las frecuencias de aparición de cada una.

Se correlacionó con la secuencia de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv de acuerdo al gen analizado, con los siguientes números de identificación del Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>): *rrS* Gene ID: 2700429, *katG* Gene ID: 885638, *inhA* Gene ID: 886523, *rpoB* Gene ID: 888164, *embB* Gene ID: 886126, *pncA* Gene ID: 888260.

6.2.3 Correlación de variables de paciente con las mutaciones de *M tuberculosis*

Se buscaron asociaciones entre las mutaciones encontradas en cada gen y las variables relacionadas con el paciente portador de TB-DR, lo cual permitió caracterizar los bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* tomando en cuenta el contexto del portador de la cepa.

Con las variables anteriormente mencionadas se construyó una base de datos empleando el programa estadístico Epi-Info versión 3.3. Este mismo paquete se utilizó para realizar los análisis de datos mediante estadística descriptiva y analítica; se utilizaron las pruebas: Anova, chi cuadrado con corrección de Yates, la prueba exacta de Fisher y Kruskal Wallis en función del tipo de variables implicadas. Los riesgos fueron evaluados mediante la razón de prevalencias (OR), considerando como significativo un valor de $p < 0,05$.

7. Resultados

7.1 Aislados clínicos de *Micobacterias* con perfil de sensibilidad a antibióticos

Se colectaron 164 aislados de TB-DR, de los cuales se descartaron 28 (17%), debido a que provenían de pacientes previamente incluidos; por lo cual el análisis se realizó con 136 (83%) cepas provenientes de pacientes distintos.

La recolección se llevó a cabo de la siguiente forma:

Año	Cepas	Cepas repetidas	Total
2007	20	0	20
2008	26	5	31
2009	42	5	47
2010	48	18	66
Total	136	28	164

Tabla V: Aislados de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos del LESP, por año.

La información epidemiológica de los pacientes portadores de estos aislados se capturó en la base de datos y se realizaron los análisis correspondientes.

7.1.1. Caracterización general de los pacientes portadores del bacilo

7.1.1.1. Características socio-epidemiológicas

Respecto a las características de los pacientes portadores de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes, la media de edad fue de 45 años (± 15) con límite inferior de 15 años y superior de 87 años, encontrando una frecuencia máxima entre los 40 y 49 años. En cuanto al género, el 65% fueron hombres y el 35% mujeres, con una razón de masculinidad de casi dos hombres por mujer (H:M 1.83:1). Por otro lado las jurisdicciones con mayor prevalencia de TB-DR en este estudio fueron: Veracruz (40.4%), seguida de Xalapa (11.8%) y Córdoba (11.8%) (Tabla VI).

Variable		Rango	Media ± DE
Edad (años)		15 – 87	44.6 ± 15.6
Variable		N	%
Sexo	Masculino	88	64.7%
	Femenino	48	35.3%
Jurisdicción de Residencia	I Pánuco	1	0.7%
	II Tuxpan	3	2.2%
	III Poza Rica	11	8.1%
	IV Martínez de la T	6	4.4%
	V Xalapa	16	11.8%
	VI Córdoba	16	11.8%
	VII Orizaba	12	8.8%
	VIII Veracruz	55	40.4%
	IX Cosamaloapan	1	0.7%
	X San Andrés T	5	3.7%
	XI Coatzacoalcos	8	5.9%
	Sin Datos	2	1.5%

Tabla VI: Variables socio-epidemiológicas de los pacientes con TB-DR

7.1.1.2. Características clínico-epidemiológicas

Dentro de las comorbilidades, la más frecuente fue Diabetes Mellitus presente en 29.4% de los pacientes con TB-DR. Esta patología se presentó en 39.6% de las mujeres contra 23.9% de los hombres, lo cual significó que en este grupo de pacientes, las mujeres tuvieron un riesgo 2 veces mayor para presentar DM (OR=2 p=0.05). En menor proporción se encontraron pacientes con TB-DR y enfermedades o padecimientos tales como: desnutrición (6.6%), anemia (3.7%), cáncer (1.5%) o VIH (0.7%) (Tabla VII).

En cuanto a las toxicomanías, 13.2% de los pacientes presentaron alcoholismo; del total de hombres 19.3% lo refirieron, así como 2.1% del total de mujeres, lo cual significó que en este grupo de pacientes con TB-DR, los hombres tuvieron un riesgo 11 veces mayor para tener Alcoholismo (OR=11.25 p=0.01). Del mismo modo, el 4.4% presentó drogadicción, de forma más frecuente en los hombres (5.7% & 2.1% OR=2.8 p=0.4); ambas adicciones han sido comúnmente relacionadas con el abandono del tratamiento (Tabla VII).

Referente al tipo de tratamiento farmacológico para TB menos de la cuarta parte (22.8%) estaba siendo atendida con tratamiento primario y el 73.5% con retratamiento; encontrándose mayor frecuencia de mujeres en tratamiento primario y de hombres en retratamiento. El promedio general de años desde el diagnóstico inicial de TB fue de 3 años 7 meses (\pm 5 años 7 meses), con límite inferior de 1 mes y superior de 480 meses (40 años) (Tabla VII).

Variable	General		Mujeres		Hombres		OR	Valor de p
	n=136	%	n=48	%	n=88	%		
Comorbilidades								
Diabetes Mellitus	40	29.4%	19	39.6%	21	23.9%	2.1	0.05*
Desnutrición	9	6.6%	2	4.2%	7	7.9%	1.9	0.32**
Anemia	5	3.7%	3	6.2%	2	2.3%	2.9	0.23**
Cáncer	2	1.5%	2	4.2%	0	0.0%	s/d	0.12**
VIH	1	0.7%	0	0.0%	1	1.2%	s/d	0.64**
Toxicomanías								
Alcoholismo	18	13.2%	1	2.1%	17	19.3%	11.2	<0.01**
Drogadicción	6	4.4%	1	2.1%	5	5.7%	2.8	0.40**
Tipo de Tratamiento								
Retratamiento	100	73.5%	16	66.7%	70	81.4%	2.2	0.05*
Primario	31	22.8%	15	33.3%	30	18.6%	0.5	0.05*
Variable	(Rango) Media \pm DE							
Tiempo de Evolución (meses)	(1-480)	43.8 \pm 67.2	(1-257)	34.6 \pm 47.3	(1-480)	48.8 \pm 75.5		0.44***

*)Chi cuadrada con corrección de Yates, **) Prueba exacta de Fisher, ***)Anova

Tabla VII: Variables clínico-epidemiológicas de los pacientes con TB-DR

7.1.1.3. Perfiles de sensibilidad a drogas

Los aislados clínicos de *Mycobacterium*, obtenidos a partir de las muestras de pacientes con TB-DR, presentaron mayor frecuencia de resistencia farmacológica a Isoniacida (I+) (83.1%) seguida de Rifampicina (R+) (69.9%) y el fármaco que se presentó con menor frecuencia fue Pirazinamida (P+) (37.5%). El 66.1% de los aislados fueron

multidrogorresistentes (MDR) y el 23.5% presentó resistencia a los cinco fármacos de primera línea (SIREP).

Al estratificar los datos, la frecuencia de resistencias a cualquier antibiótico fue mayor en las mujeres que en los hombres, dichas diferencias fueron estadísticamente significativas para la resistencia a Isoniacida y Rifampicina es decir en cepas con TB-MDR (Tabla VIII), encontrando que las mujeres tuvieron un riesgo siete veces mayor de tener cepas I+, dos veces más riesgo de tener cepas R+ y casi tres veces más riesgo de tener cepas MDR (Tabla IX y Figura 16).

Tipo de Resistencias	General		Hombres		Mujeres		OR	Valor de p
	n	%	N	%	n	%		
(S) Estreptomina	91	66.9%	55	62.5%	36	75.0%	1.8	0.14*
(I) Isoniacida	113	83.1%	67	76.1%	46	95.8%	7.2	<0.01**
(R) Rifampicina	95	69.9%	56	63.6%	39	81.3%	2.4	0.03*
(E) Etambutol	73	53.7%	45	51.1%	28	58.3%	1.3	0.42*
(P) Pirazinamida	51	37.5%	31	35.2%	20	41.7%	1.3	0.46*
MDR	90	66.2%	52	59.1%	38	79.2%	2.6	<0.01*
SIREP	32	23.5%	18	20.5%	14	29.2%	1.6	0.24*
TOTAL (N)	136	100.0%	88	100.0%	48	100.0%		

^{*)}Chi cuadrada con corrección de Yates, ^{**)}Test exacto de Fisher

Tabla VIII: Tipo de Farmacorresistencia de pacientes con TB-DR por género

En promedio, cada paciente era portador de una cepa con resistencia a 3 fármacos (± 1.4); siendo dicho promedio mayor si se trataba de mujeres (3.5, ± 1.2) que de hombres (2.8, ± 1.5), con diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p=0.01$, Anova) (Tabla IX), lo cual coincide con que el ser mujer representó un riesgo 3 veces mayor de tener resistencia a tres o más fármacos con relación a los hombres (OR 3.3 $p= \leq 0.01$).

En concordancia a lo anterior, sólo el 6.3% de las mujeres presentaron cepas monorresistentes, a diferencia del 24% de hombres con cepas resistentes a sólo un antibiótico. Mientras el 79% de las mujeres presentaron bacilos de TB resistentes a 3 o más fármacos, en contraposición al 53% de los hombres (Tabla IX).

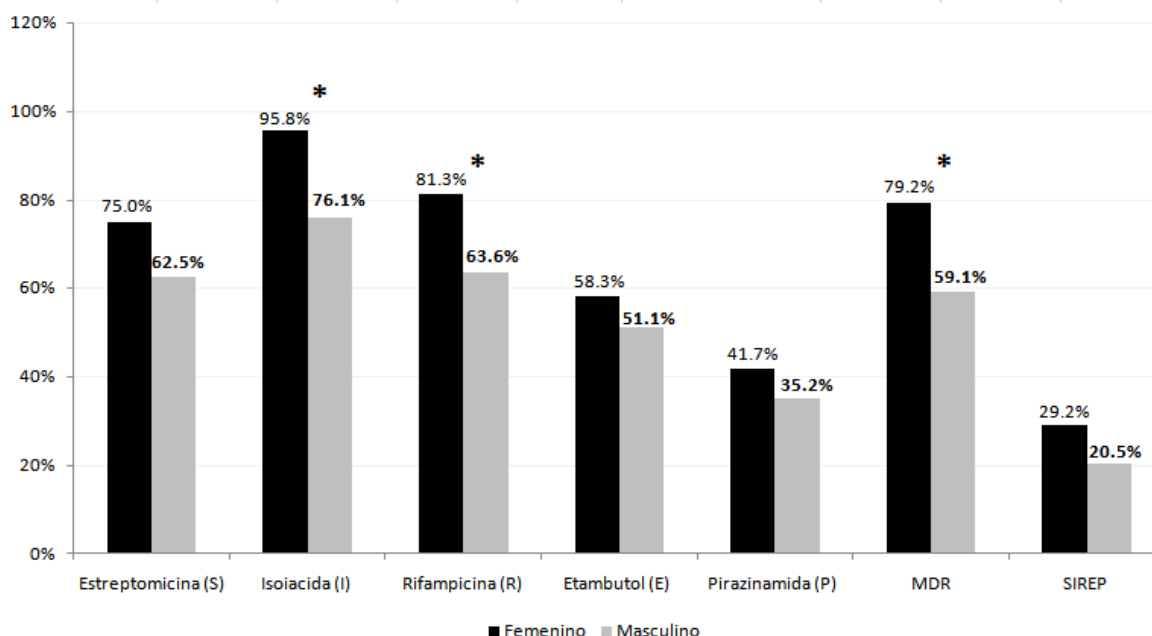


Figura 16: Gráfica Porcentajes de pacientes con cepas TB-DR por farmacorresistencia y género.

Número de Resistencias	General		Hombres		Mujeres		OR	Valor de p
	n	%	n	%	n	%		
Una	24	17.6%	21	23.9%	3	6.3%	3.3[§]	<0.01*
Dos	29	21.3%	21	23.9%	8	16.7%		
Tres	23	16.9%	11	12.5%	12	25.0%		
Cuatro	28	20.6%	17	19.3%	11	22.9%		
Cinco	32	23.5%	18	20.5%	14	29.2%		
TOTAL (N)	136	100.0%	88	100.0%	48	100.0%		
Media	Media	± DE	Media	± DE	Media	± DE		< 0.01***
	3.1	1.4	2.8	1.5	3.5	1.2		

*) Chi cuadrada con corrección de Yates, ***) Anova §) Riesgo para ≥ 3

Tabla IX: Número de Farmacorresistencias de pacientes con TB-DR por género

7.2. Obtención de ADN y análisis de genes en las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

En total se obtuvieron 387 fragmentos amplificados y sus respectivas secuencias. En este sentido fue posible secuenciar el 72% del total de genes posibles de las muestras, con variaciones del 61.5% hasta un 83.6%. Estas variaciones obedecieron a diferencias en la concentración del ADN obtenido, el número de genes a analizar en cada aislado y la degradación del material genético (Tabla X).

Fármacos	Genes	Aislados colectados con resistencia al fármaco	Secuencias obtenidas	Porcentaje analizado
(S) Estreptomicina	<i>rrS</i>	91	56	61.5%
(I) Isoniacida	<i>inhA</i>	113	77	68.1%
	<i>katG</i>	113	80	70.8%
(R) Rifampicina	<i>rpoB</i>	95	71	74.7%
(E) Etambutol	<i>embB</i>	73	61	83.6%
(P) Pirazinamida	<i>pncA</i>	51	42	82.4%
Total		536	387	72.2%

Tabla X: Relación de secuencias de genes asociados a TB-DR

7.3. Análisis de mutaciones.

Las 387 (72%) secuencias generadas corresponden a los genes *rrS*, *katG*, *inhA*, *rpoB*, *embB* y *pncA*. En este sentido se establecieron dos parámetros para determinar la correcta asignación de las mutaciones: 1) obtención de secuencias en dirección 5´-3´ y 3´-5´ para corroborar los cambios, 2) secuencias con valores de calidad >20, es decir con probabilidades de error en la asignación de base menores al 1%, lo cual permitió incrementar el porcentaje de confiabilidad en los cambios encontrados, eliminando errores producidos por el ruido generado debido a las señales de fluorescencia adyacentes.

7.3.1. Análisis del gen *rrS* (Resistencia a Estreptomicina, S)

De 56 aislados con resistencia a estreptomicina se secuenciaron el mismo número de fragmentos en ambos sentidos, del gen *rrS* (552pb), del nucleótido 428 al 979, incluyendo los nucleótidos 512, 513 y 516 reportados con el mayor número de mutaciones asociadas a resistencia a estreptomicina. Sólo el 28.6% presentaron mutaciones en 8 posiciones, distribuidas del nucleótido 483 al 907 (Tabla XI).

El cambio de base encontrado con mayor frecuencia se ubicó en la posición 513 con un cambio de A → C, presente en el 8.9% (5) de los aislados, seguido por los cambios en 516 y 795 ambos C → T, encontrados en el 7.1%(4) de las muestras.

Nucleótido	Polimorfismo	Frecuencia		Porcentaje Acumulado
		n	%	
483	A → T *	1	1.8%	28.6%
485	A → G *	1	1.8%	
496	G → A *	1	1.8%	
513	A → C	5	8.9%	
516	C → T	4	7.1%	
795	C → T * **	4	7.1%	
870	C → T * **	2	3.6%	
907	A → C *	2	3.6%	
s / mut		40	71.4%	71.4%
Total de cepas analizadas		56	100.0%	100.0%
Total de cambios		8	8	

Se utilizó la cepa de referencia H37Rv. Producto amplificado de 552 pb del nucleótido 428 al 979 *) Mutación no reportada **) Base mixta

Tabla XI: Mutaciones encontradas en el gen *rrS*

De las mutaciones encontradas solo las mutaciones de las posiciones 516 y 513 tuvieron reportes previos. Por otro lado, seis cambios no se identificaron en la Base de datos *TB Drug Resistance Mutation Database (TB-DRMDB)*, dentro de las mutaciones reportadas con alta confiabilidad, en dos de estos se identificaron bases mixtas (Figura 17, Tabla XI). Finalmente el 71.4% (40) de los aislados no presentaron cambios de base en la región del gen analizada. Se consideró como base mixta aquella cuyo pico menor de fluorescencia tuviera una altura de por lo menos el 30% respecto a la altura del pico mayor.

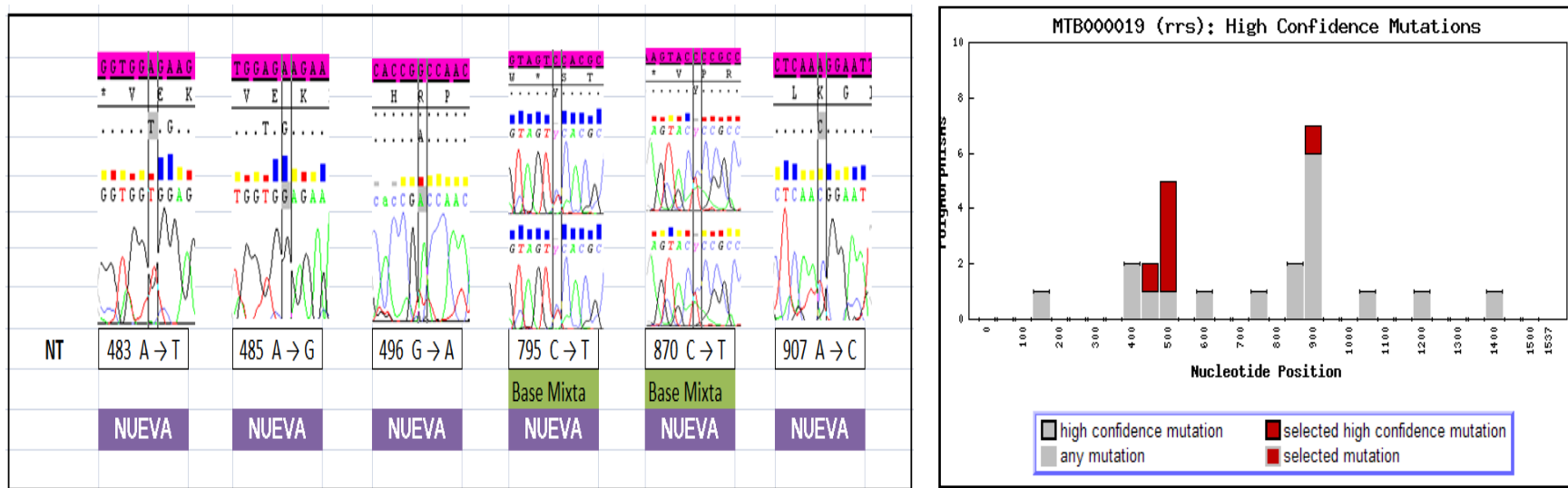


Figura 17: Izquierda: Espectroferogramas de *rrS* mostrando bases mixtas y cambios de base considerados como nuevas mutaciones. Derecha: Mutaciones de *rrS* reportadas como de alta confiabilidad en la Base de datos *TB-DRMDB*.

7.3.2. Análisis del gen *katG* (Resistencia a Isoniacida, I)

Se secuenciaron 80 fragmentos de 555pb del gen *katG*, del codón 224 al 407, incluyendo el codón 315 reportado con el mayor número de mutaciones asociadas a resistencia a Isoniacida.

De las 80 secuencias obtenidas, sólo 46.2% presentaron mutaciones no sinónimas en 6 codones del fragmento analizado (269, 299, 315, 353, 380 y 387). Dichas mutaciones se explicaron por 7 cambios de base ubicados en 6 posiciones distintas entre los nucleótidos 137-491, generando 7 cambios de aminoácido (Tabla XII).

La mutación encontrada con mayor frecuencia fue en el codón 315 (40%), con cambios de base en el nucleótido 276 de G→A o C, lo cual genera un cambio de aminoácido de Ser a Asn o Thr. Pese a que la mayoría de las mutaciones se ubican en este codón y se explican con sólo 2 cambios de base, la frecuencia en que se presentan es muy baja (Tabla XII).

Codón	Aminoácido	Nucleótido	Polimorfismo	Frecuencia		Porcentaje Acumulado
				N	%	
269	G → S	137	G → A *	2	2.5%	
299	G → S	227	G → A	1	1.3%	
315	S → N	276	G → A ●	3	3.8%	46.2%
	S → T		G → C ●	29	36.3%	
353	Y → H	389	T → C *	1	1.3%	
380	T → I	471	C → T *	1	1.3%	
387	D → N	491	G → A *	1	1.3%	
s / mut				43	53.8%	53.8%
Total de cepas analizadas				80	100.0%	100.0%
Total de cambios						
6	7	6	7			

Se utilizó la cepa de referencia H37Rv.

*) Mutación no reportada

Producto amplificado de 555 pb del AA 224 al 407

●) Sondas utilizadas en GenoType MTBDR

Tabla XII: Mutaciones encontradas en el gen *katG*

Entre las mutaciones encontradas, cinco cambios no se identificaron en la Base de datos *TB-DRMDB*, dentro de las mutaciones reportadas con alta confiabilidad (Figura 18, Tabla XII).

Finalmente, 53.8% (43) de los aislados no presentaron cambios en el fragmento secuenciado. Sobre este punto, 18.6% (8) de estos cuarenta y tres aislados presentaron cambios en la región analizada del gen *inhA*, en 56.25% (27) no se observaron variaciones en ninguno de los dos fragmentos y en el otro 18.6% (8) no fue posible determinar la secuencia del gen *inhA* (Tabla XII).

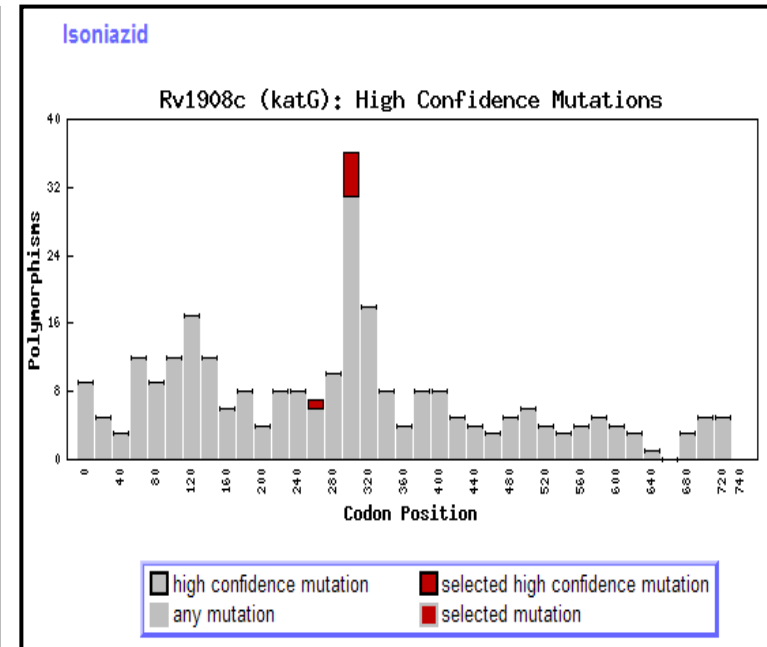
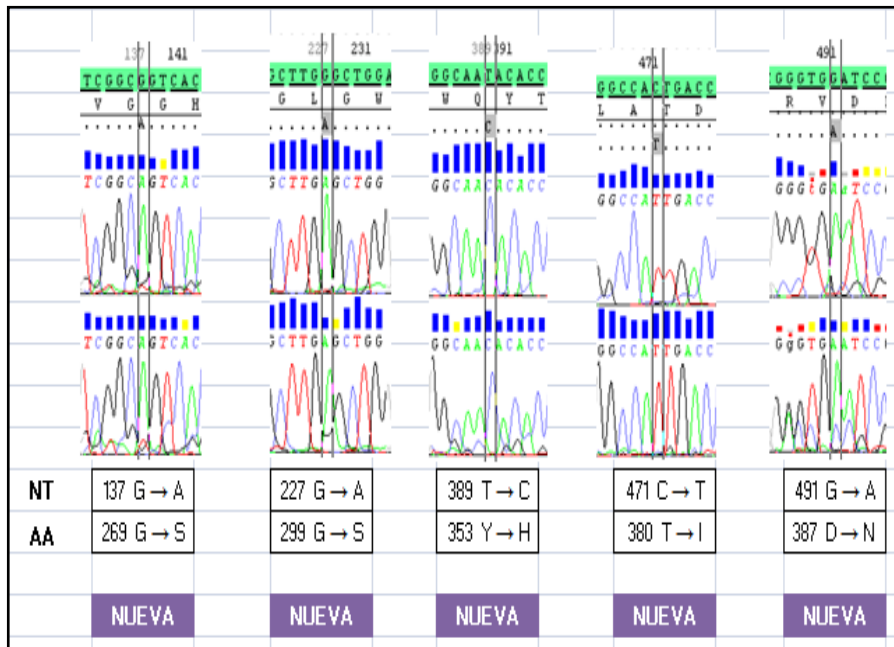


Figura 18: Izquierda: Espectroferogramas de *katG* mostrando los cambios de base no reportados. Derecha: Mutaciones de *katG* reportadas con alta confiabilidad en la Base de datos *TB-DRMDB*.

7.3.3. Análisis del gen *inhA* (Resistencia a Isoniacida, I)

Otro de los genes asociados a la resistencia a Isoniacida es el gen *inhA*; se secuenciaron 77 fragmentos de 517pb de dicho gen; del nucleótido -115 al codón 134, incluyendo el nucleótido -15 de la región promotora reportado como aquel donde se encuentra el mayor número de mutaciones asociadas con resistencia a Isoniacida.

De las 77 secuencias obtenidas, sólo 16.9% (13) presentaron mutaciones no sinónimas en la región promotora y en 4 codones (-15, 21, 80, 98 y 101). Dichas mutaciones se explicaron por 5 cambios de base ubicados en 5 posiciones distintas entre el nucleótido -15-303, generando 4 cambios de aminoácido (Tabla XIII).

La mutación encontrada con mayor frecuencia en un 7.8% (6), fue en la región promotora, con cambio de base en el nucleótido -15 de C→T. De los 6 aislados con este cambio, 4 presentaron mutación en el codón S315N,T del gen *katG*, mientras los otros dos no presentaron cambios en dicho gen; sin embargo, en uno de ellos se identificó una mutación tanto en la región promotora como en el codón I21V de *inhA*.

Codón	Aminoácido	Nucleótido	Polimorfismo	Frecuencia N	Porcentaje %	Porcentaje Acumulado
‡	‡	-15	C → T *	6	7.8%	
21	I → V	61	A → G *	5	6.5%	
80	E → ^{Paro}	238	G → T */**	1	1.3%	16.9%
98	M → I	294	G → T */**	2	2.6%	
101	T → T	303	C → T */ **	1	1.3%	
s / mut				64	83.1%	83.1%
Total de cepas analizadas				77	100.0%	100.0%
Total de cambios						
4	4	5	5			

Se utilizó la cepa de referencia H37Rv

AA 134 ‡) Región promotora no codificante

Producto amplificado de 517pb del NT-115 al

*) Mutación no reportada **) Bases mixtas

Tabla XIII: Mutaciones encontradas en el gen *inhA*

Entre las mutaciones encontradas, ninguna se encontró reportada de alta confiabilidad en la Base de datos *TB-DRMDB* (Figura 19, Tabla XIII).

El 83.1% (64) de los aislados no presentaron cambios del nucleótido -115 al codón 134 del gen *inhA*; sin embargo, 31 (48.4%) de ellos presentaron mutaciones en el gen *katG*, en 27 (42.2%) no se observaron cambios en ninguno de las dos genes, y finalmente en 6 aislados (9.4%) se desconoció la existencia de cambios en *katG* ya que no fue posible realizar la secuenciación respectiva (Tabla XIII).

De los 8 aislados con cambios dentro del gen *inhA*, siete no presentaron cambios en el gen *katG*, y en uno no fue posible analizar dicho gen debido a la baja concentración y calidad del ADN obtenido.

Solo dos aislados presentaron cambios en dos posiciones del gen simultáneamente, en uno se identificaron los cambios en el nucleótido -15 de C→T y 61 A→G (I21V), mientras que en otro se observó una base mixta (k=G ó T) en el nucleótido 238 G→T que originaría paro en el codón 80 y otra base mixta (y=C ó T) en el nucleótido 303 C→T, que generaría una mutación sinónima (T101T) (Figura 19).

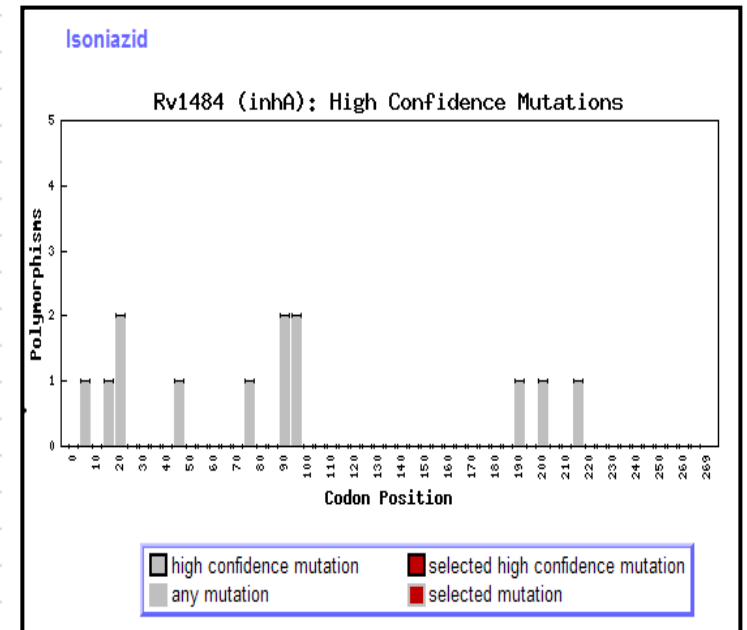
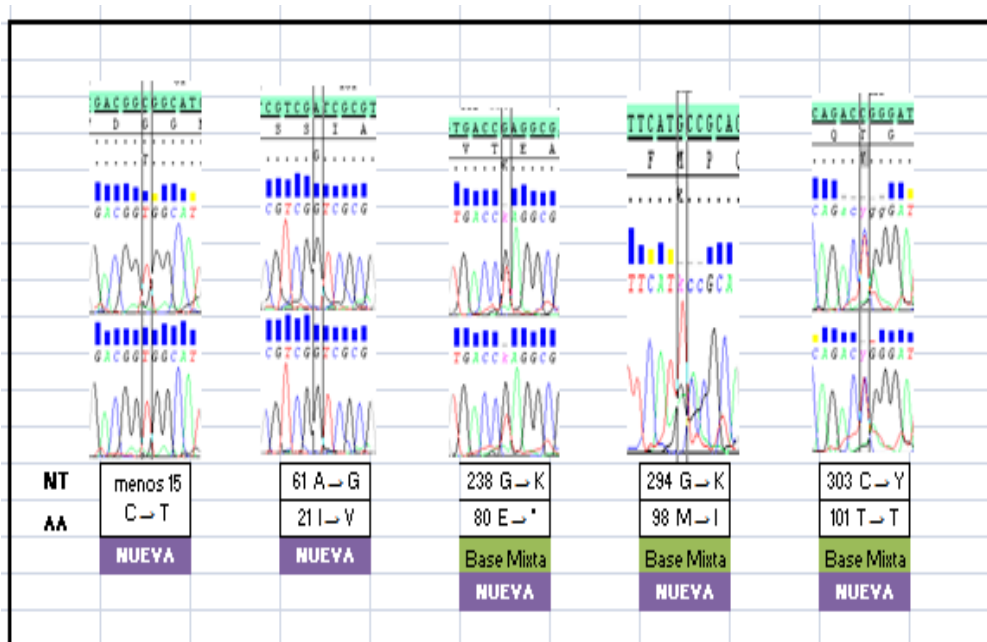


Figura 19 Izquierda: Espectroferogramas de *inhA* mostrando mutaciones no reportadas y bases mixtas. Derecha: Mutaciones de *inhA* reportadas con alta confiabilidad en la Base de datos *TB-DRMDB*.

7.3.4. Análisis del gen *rpoB* (Resistencia a Rifampicina, R)

Se secuenciaron 71 fragmentos de 266pb del gen *rpoB*, del codón 478 al 564, incluyendo la reportada como la región determinante de resistencia a rifampicina (RDRR), que incluye al mayor número de mutaciones asociadas con la resistencia a Rifampicina, y que comprende del codón 507 al 533.

De las 71 secuencias obtenidas, 83.1% (59) presentaron mutaciones no sinónimas en 4 codones del fragmento analizado (516, 522, 526 y 531). Dichas mutaciones se explicaron por 11 cambios de base ubicados en 6 posiciones distintas entre el nucleótido 117-163, generando 10 cambios de aminoácido (Tabla XIV).

La mutación en el codón 531 se presentó en 67.6% (48) de los aislados, con un cambio de base en el nucleótido 163 de C→T ó G, lo cual genera un cambio de aminoácido de Ser a Leu o Trp. De los 59 aislados que presentaron cambios en la región analizada, 58 se ubicaron en sólo dos codones (531 y 526), dichas mutaciones se explicaron con 8 de los 11 cambios de base encontrados (Tabla XIV). Sólo un aislado no presentó cambios en los codones 531 ó 526, no obstante se observó un cambio en el codón D516Y.

En contraste, 16.9% (12) de los aislados no presentaron cambios de base del codón 478 al 564, lo cual señala la presencia de mutaciones de la RDRR del gen u otros genes (Tabla XIV).

Entre las mutaciones encontradas, tres cambios no se identificaron en la Base de datos *TB-DRMDB*, dentro de las mutaciones reportadas con alta confiabilidad (Figura 20, Tabla XIV).

Un aislado presentó 3 cambios de base en la región analizada, dichos cambios fueron en los tres casos, bases mixtas ubicadas en las posiciones G118 (R=G ó A), C136 (Y=C ó T) y C163 (Y=C ó T). El último de ellos se presentó en dos cepas más (Figura 21, Tabla XIV).

Codón	Aminoácido	Nucleótido	Polimorfismo	Frecuencia		Porcentaje Acumulado
				N	%	
516	D → Y	117	G → T	1	1.4%	83.1%
	D → G		A → G * **	1	1.4%	
522	S → L	136	C → T **	1	1.4%	
526	H → D●	147	C → G	5	7.0%	
	H → Y ●		C → T	2	2.8%	
	H → C		C → T *	1	1.4%	
			A → G *			
	H → R		148	A → G	1	
531	H → P	163	A → C *	1	1.4%	
	S → L●		C → T **	43	60.6%	
	S → W		C → G	5	7.0%	
s / mut				12	16.9%	16.9%
Total de cepas analizadas				71	100.0%	100.0%
Total de cambios						
4	10	6	11			

Se utilizó la cepa de referencia H37Rv. Producto amplificado de 266 pb del AA 478 al 564. Una cepa presentó mutación en 3 codones

*) Mutación no reportada

***) Bases mixtas

●) Sondas utilizadas en LIPA más D516V

Tabla XIV: Mutaciones encontradas en el gen *rpoB*

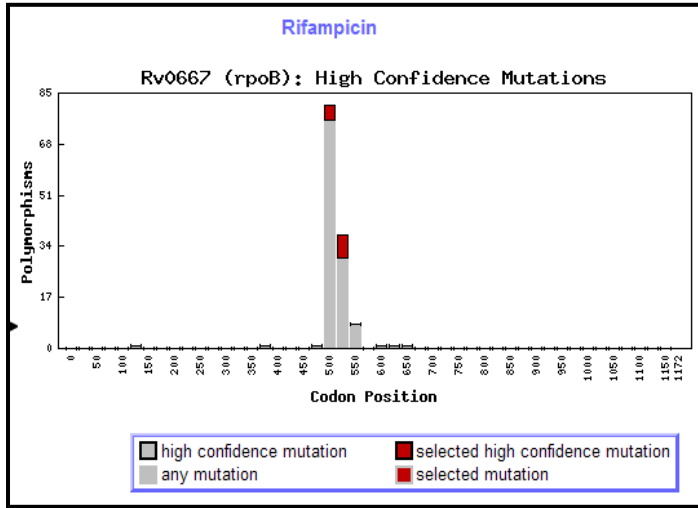
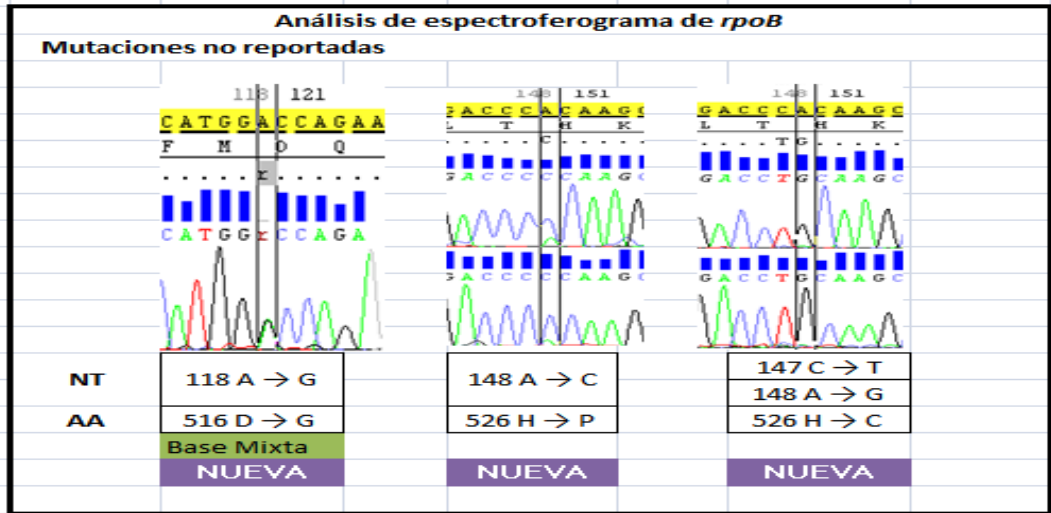


Figura 20: Izquierda: Espectroferogramas de *rpoB* mostrando los cambios de base no reportados. Derecha: Mutaciones de *rpoB* reportadas con alta confiabilidad en la Base de datos *TB-DRMDB*.

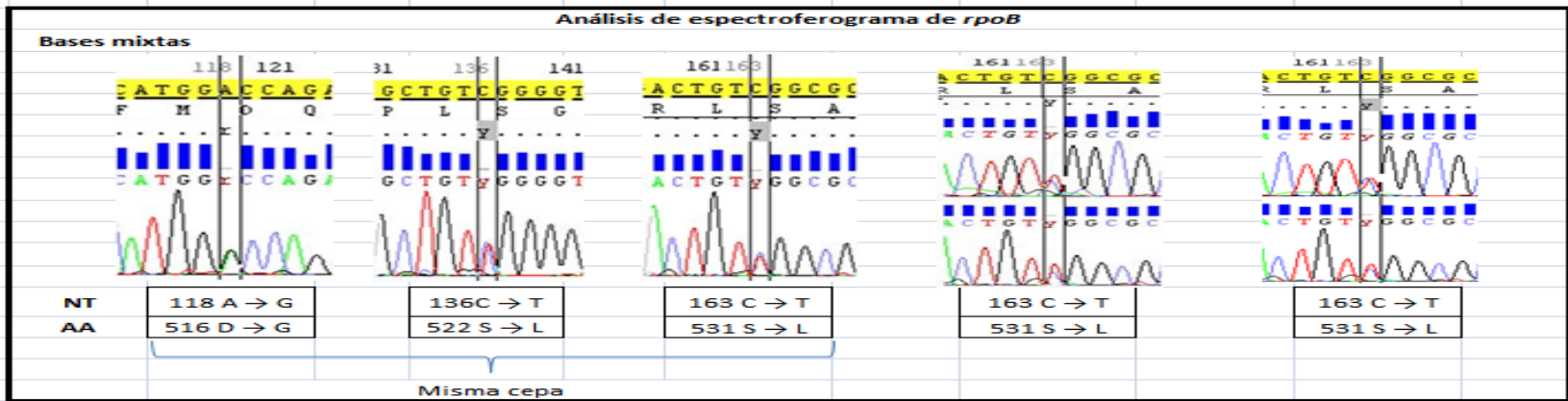


Figura 21: Espectroferogramas de *rpoB*, mostrando bases Mixtas clasificadas según el código IUPAC como R (puRina A,G) e Y (pYrimidina C,T).

7.3.5. Análisis del gen *embB* (Resistencia a Etambutol, E)

Se secuenciaron 61 fragmentos de 260pb del gen *embB*, del codón 264 al 349, incluyendo al codón 306 que es donde se reporta el mayor número de mutaciones asociadas con resistencia a Etambutol.

De las 61 secuencias obtenidas, 37.7% presentaron mutaciones no sinónimas distribuidas en 3 codones del fragmento analizado. Dichas mutaciones se explicaron por 6 cambios ubicados en 4 posiciones distintas entre el nucleótido 128-200, generando 4 cambios de aminoácido. La mutación encontrada con mayor frecuencia fue en el codón 306 (32.8%), con cambios de base en los nucleótidos 128 de A→ G, o 130 de G→ C, A ó T, lo cual generó el cambio de Met a Val o Ile. Pese a que 37.7% de las muestras presentaron mutaciones explicadas con 6 cambios de base (codones 128, 130, 195 y 200), dichos porcentajes son aún muy bajos para utilizarlos como marcadores (Tabla XV).

Codón	Aminoácido	Nucleótido	Polimorfismo	Frecuencia		Porcentaje Acumulado
				N	%	
306	M → V	128	A → G **	8	13.1%	37.7%
			G → C	5	8.2%	
	M → I	130	G → A	5	8.2%	
			G → T	2	3.3%	
328	D → G	195	A → G	2	3.3%	
330	F → L	200	T → C *	1	1.6%	
s / mut				38	62.3%	62.3%
Total de cepas analizadas				61	100.0%	100.0%
Total de cambios						
3	4	4	6			

Se utilizó la cepa de referencia H37Rv

Producto amplificado de 260 pb del AA 264 al 349

*) Mutación no reportada

**) Bases mixtas

Tabla XV: Mutaciones encontradas en el gen *embB*

Entre las mutaciones identificadas, el cambio en la posición 200 T → C (F300L) no se encontró en la Base de datos TB-DRMDB, dentro de las mutaciones reportadas con alta confiabilidad (Figura 22, Tabla XV). Finalmente, 62.3% de los aislados no presentaron cambios de base del codón 264 al 349 (Tabla XV).

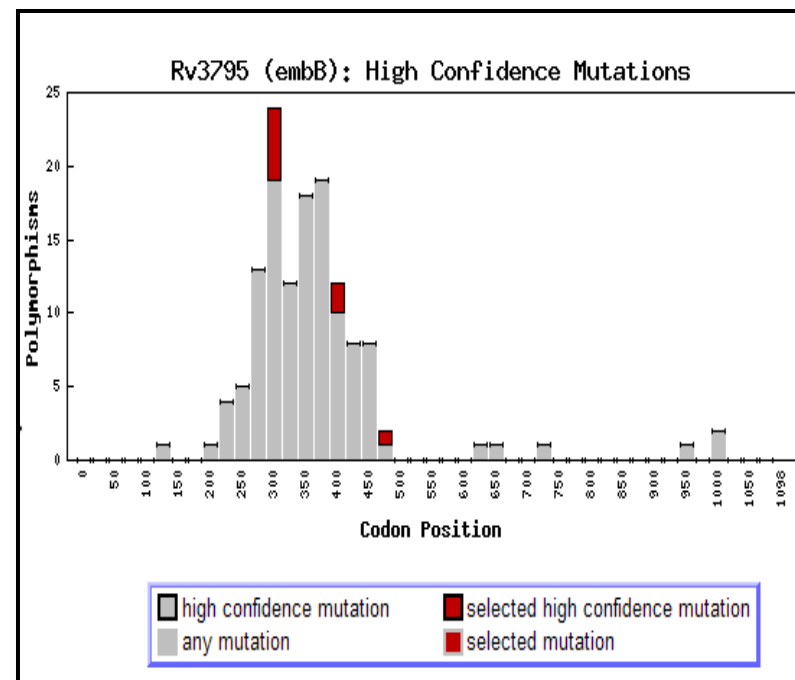
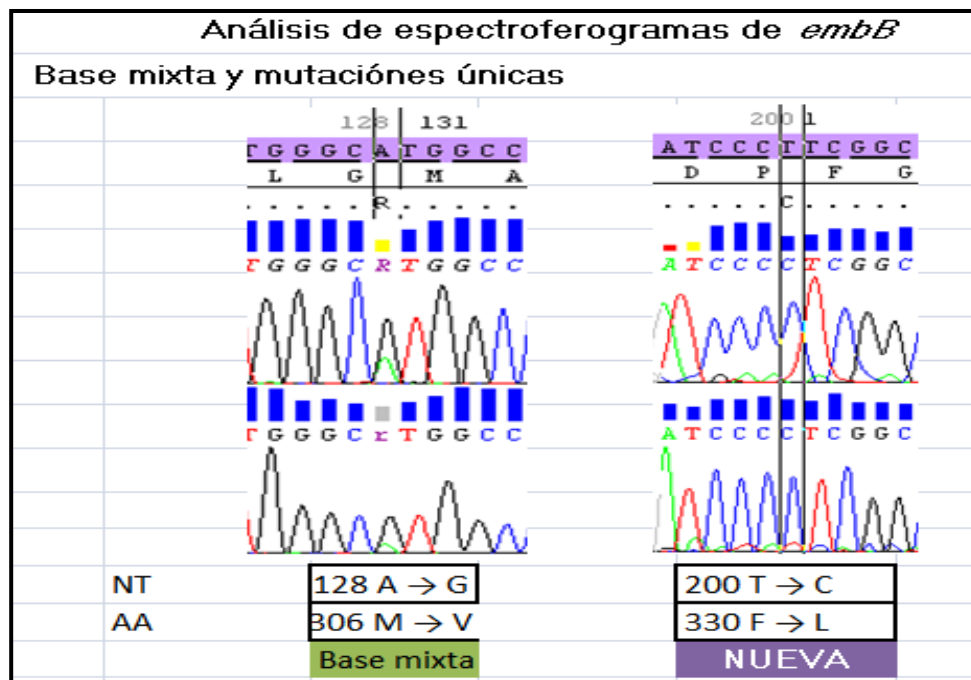


Figura 22 Espectroferogramas de *embB* mostrando: a la izquierda una base mixta de una mutación previamente reportada; a la derecha cambio de base no reportada la base de datos *TB-DRMDB*.

7.3.6. Análisis del gen *pncA* (Resistencia a Pirazinamida, P)

Se secuenciaron 42 fragmentos de 670pb del gen *pncA*, del nucleótido -80 al codón 196, por lo que se incluyó el operón. De estas secuencias, 81% (34) presentaron cambios distribuidos en el fragmento analizado; de estos cambios, 9.5% (4) fueron inserciones, 9.5% (4) deleciones y 61.9% (26) fueron mutaciones. Ninguno de los aislados mostró cambios en la región promotora y en 8 (19%) no se observó ningún tipo de cambio.

Se observaron inserciones cuya longitud fue desde 1 a 7 pares de bases, en todos estos casos se generaron cambios en el marco de lectura que tuvieron como consecuencia la presencia de codones de paro en los codones 56, 127 y 160, en un aislado no se identificó el codón de paro (Tabla XVI).

Entre las deleciones, se observaron pérdidas de 1 a 30 pares de bases; en dos aislados se eliminaron 10 o 3 aminoácidos, mientras que en otros dos se generaron cambios en el marco de lectura (Tabla XVI).

Las mutaciones se ubicaron en 18 posiciones distintas entre el nucleótido 35-515, generando 18 cambios de aminoácido. La mutación encontrada con mayor frecuencia fue en el codón 120 (16.7%), con un cambio de base en el nucleótido 359 de T→C, lo cual genera un cambio de aminoácido de Leu a Pro y la mutación en el codón 96 (9.52%), con un cambio de base en el nucleótido 287 de A→G, lo cual genera un cambio de aminoácido de Lys a Arg. Esta gran heterogeneidad de cambios dificulta utilizar alguno de ellos como marcador de diagnóstico (Tabla XVI).

Por otro lado, 19.1% de los aislados no presentaron cambios de base del nucleótido -80 al codón 196, lo cual señala que posiblemente presenten mutaciones fuera de dicha región, en otros genes, o existan errores en el diagnóstico de resistencia a este medicamento (Tabla XVI).

Entre las mutaciones encontradas, catorce no se identificaron en la Base de datos TB-DRMDB, dentro de las mutaciones reportadas con alta confiabilidad (Figura 23-24, Tabla XVI).

Codón	Aminoácido	Nucleótido	Polimorfismo	Frecuencia n	%	Porcentaje Acumulado	
Inserción							
47	T → CML	141;1-7	C → Ins 7b ●*	1	2.38%	9.52%	
126	D → CML	375;1	C → Ins 1b ^α *	1	2.38%		
131	CML	390;1-2	G → Ins GG‡	1	2.38%		
131	CML	391;1	G → Ins G	1	2.38%		
Delección							
127-136	Del 10AA	379-408	G → Del 30b *	1	2.38%	9.52%	
127-129	Del 3AA	380-388	A → Del 9b *	1	2.38%		
147	CML	440	T → Del 1b‡ *	1	2.38%		
163	CML	487-496	T → Del 10b *	1	2.38%		
Mutación							
12	D → A	35	A → C	2	4.76%	61.9%	
47	T → A	139	A → G	1	2.38%		
49	D → H	145	G → C *	1	2.38%		
54	P → L	161	C → T *	1	2.38%		
63	D → A	188	A → C *	1	2.38%		
68	W → G	202	T → G	1	2.38%		
71	H → Y	211	C → T *	1	2.38%		
75	G → G	225	T → C	2	4.76%		
76	T → P	226	A → C	1	2.38%		
94	F → S	281	T → C	1	2.38%		
96	K → R	287	A → G *	4	9.52%		
102	A → V	305	C → T	1	2.38%		
120	L → P	359	T → C *	7	16.67%		
125	V → F	374	G → T	1	2.38%		
139	V → L	415	G → C *	1	2.38%		
143	A → P	427	G → C	1	2.38%		
160	T → K	479	C → A *	1	2.38%		
172	L → P	515	T → C	1	2.38%		
s / mut				8	19.05%		19.05%
Total de cepas analizadas				42	100.00%		100.00%

Se utilizó la cepa de referencia H37Rv. Producto amplificado de 670pb del Nucleótido -80 al AA 196. **CML**) Cambio de marco de lectura; *) Mutación no reportada

Tabla XVI: Mutaciones encontradas en el gen *pncA*

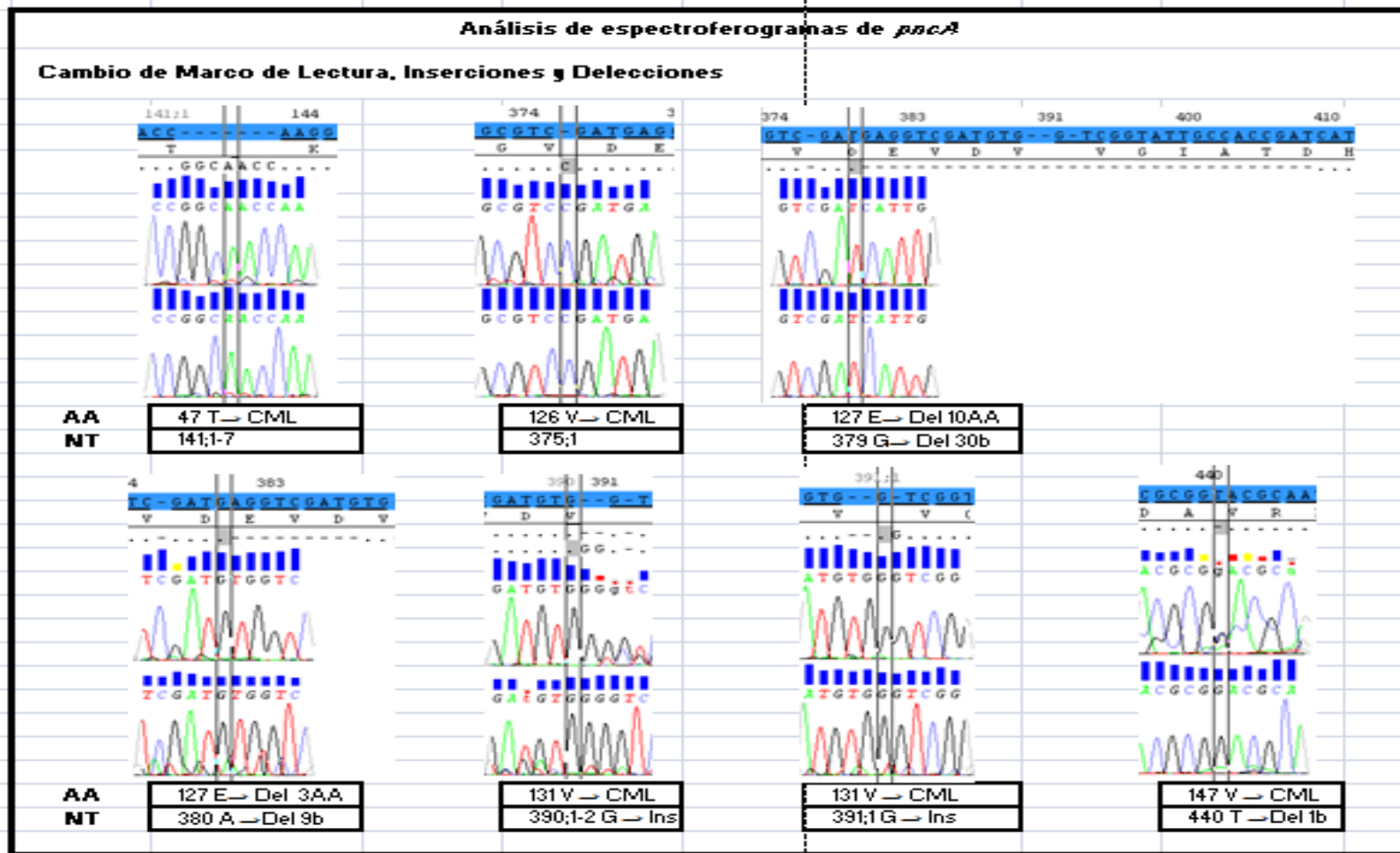


Figura 23. Espectroferogramas de *pncA* mostrando cambios de base, inserciones y delecciones.

Pyrazinamide

Rv2043c (pncA): High Confidence Mutations

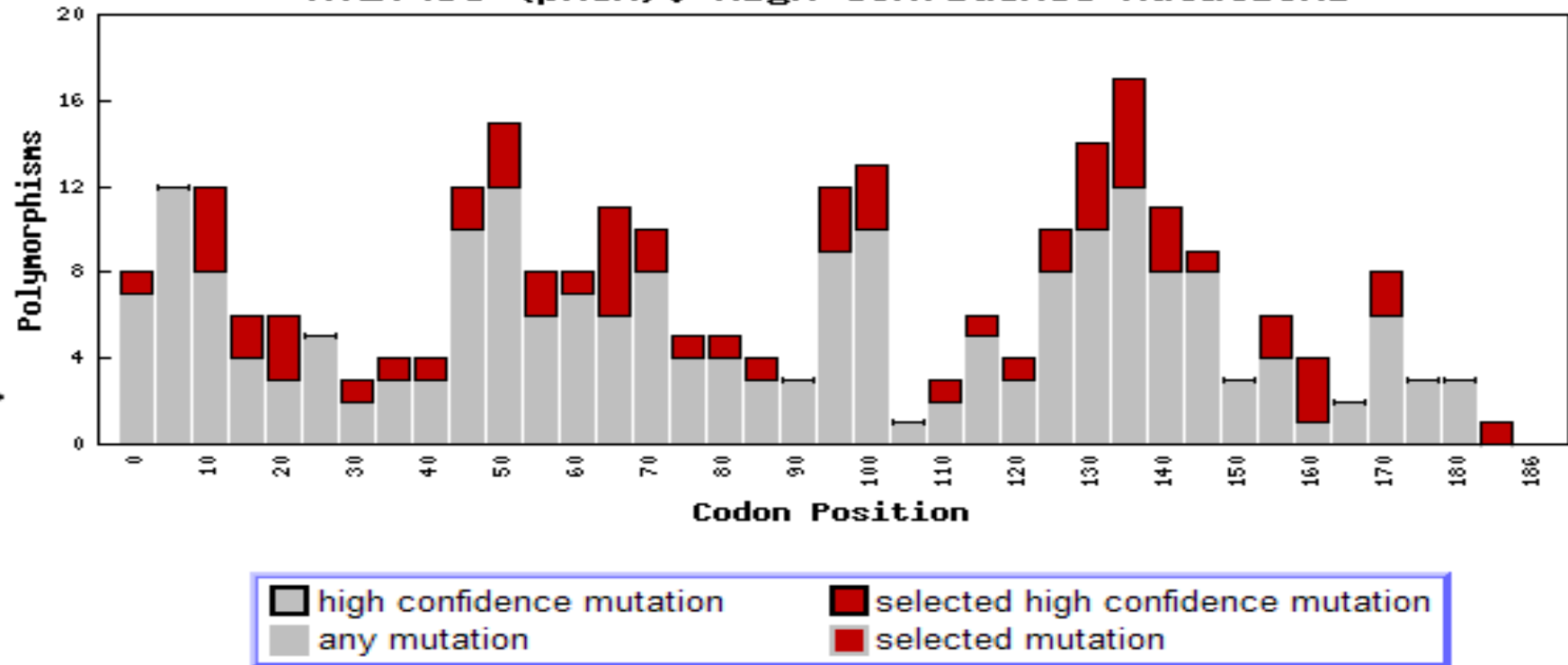


Figura 24. Imagen de mutaciones de mutaciones de *pncA* reportadas con alta confiabilidad en la base de datos *TB-DRMDB*

7.4. Asociaciones fenotípicas y genotípicas en TB-DR

7.4.1. Asociaciones entre variables epidemiológicas y resistencias farmacológicas (Fenotípicas)

Uno de los aspectos importantes en este estudio fue determinar las relaciones existentes entre las variables epidemiológicas del portador y la resistencia fenotípica del bacilo, para lo cual se realizaron análisis bivariados a partir de la información obtenida del resumen clínico.

Se identificó asociación estadística entre el sexo femenino y la resistencia a Isoniacida, Rifampicina, MDR y 3 o más fármacos, siendo el riesgo más alto (OR 7.2) el relacionado con la I+. A pesar de no identificar asociaciones con S, E o P; se observó un incremento en la fuerza de asociación conforme se presentó un mayor número de resistencias (MDR OR= 2.6 p=0.02 y 3 o más resistencias OR=3.4 p=<0.01) indicando la posibilidad que la asociación entre el sexo femenino y la presencia de I+ incrementa el riesgo para desarrollar resistencia a múltiples fármacos (Tabla XVII, Anexo 1).

Otra variable que mostró asociación con la resistencia a Isoniacida fue la Diabetes Mellitus (DM), ya que 95% de los pacientes diabéticos fueron I+, contra 78% de los pacientes sin diabetes y también resistentes, con lo cual el riesgo de un paciente con TB y DM para presentar I+ fue cinco veces mayor. Con estos resultados, se podría suponer que la asociación entre I+ y el sexo femenino es consecuencia de la asociación entre dicha resistencia y la DM; no obstante, no se identificó asociación entre esta enfermedad y MDR o resistencia a 3 o más fármacos como ocurrió con el sexo femenino, por lo cual, es probable que exista otra relación no cuantificada en este trabajo que explique dichos resultados (Tabla XVII, Anexo 1).

Otras comorbilidades como anemia y drogadicción se asociaron con la resistencia a Etambutol, pese al bajo número de pacientes que refirieron estas condiciones (5 y 6 respectivamente), en ambos casos el 100% de los pacientes fueron E+, independientemente de las resistencias acumuladas a otros fármacos, en contraparte la frecuencia de dicha resistencia en pacientes que no refirieron dichas comorbilidades fue cercana a la mitad (51.9% y 51.5 % respectivamente) (Tabla XVII, Anexo 1).

Por otro lado es importante mencionar que variables como: edad, jurisdicción de residencia, desnutrición, alcoholismo, tipo de tratamiento, meses de evolución; no

mostraron diferencias respecto al tipo o número de resistencias farmacológicas (Tabla XVII, Anexo 1).

Variables epidemiológicas	Resistencia a un Fármaco					Resistencia a Múltiples Fármacos	
	S	I	R	E	P	MDR	≥ 3 Resistencias
Edad *	44.8	45.0	44.7	46.5	46.3	44.9	46.0
Sexo Femenino	1.8	7.2	2.5	1.3	1.3	2.6	3.4
DM	0.8	5.3	1.4	0.7	1.0	1.8	1.4
Anemia	2.0	100% +	100% +	100% +	2.6	100% +	100% +
Desnutrición	1.0	1.6	0.8	1.8	0.8	1.0	1.2
Alcoholismo	0.6	1.7	1.1	1.8	0.8	1.4	0.9
Drogadicción	2.5	0.4	0.8	100% +	0.8	1.0	1.2
Retratamiento	1.7	0.9	0.8	0.8	0.9	1.1	0.7
Evolución de TB *	44.0	44.0	50.3	48.0	55.4	47.2	47.3

Valor de OR, las celdas de color indican los resultados con valores de $p \leq 0.05$, *) Promedio de los valores positivos. %) Porcentaje de pacientes con (+) o sin (-) la condición de la fila, que tienen la resistencia de la columna. En los casos que se presentó un 0 en la tabla tetracórica no fue posible cuantificar OR. Para información completa revisar Anexo 1, pp115

Tabla XVII: Asociación entre variables epidemiológicas y resistencias fenotípicas (Fármacos).

7.4.2. Asociaciones entre variables epidemiológicas y mutaciones (Genotípicas)

Una vez identificada, la asociación de las variables epidemiológicas con la resistencia fenotípica se realizó análisis bivariados para buscar asociaciones genotípicas, es decir entre las variables epidemiológicas y las mutaciones encontradas con mayor frecuencia en los genes analizados.

El codón que explicó el mayor porcentaje de resistencia a un fármaco fue el 531 del gen *rpoB*, en donde el cambio de base del nucleótido C163 ya sea por T o por G, explica el 67.6% de la resistencia a Rifampicina; seguido por el codón 315 del gen *katG*, en donde el cambio de base del nucleótido G276 ya sea por A o por C, explica el 40% de la resistencia a Isoniacida. Por el contrario, la frecuencia más baja de un cambio asociada a la resistencia ante un fármaco fue la encontrada en el gen *rrS* ubicado en el nucleótido 513, el cual cambio de A por C, y se encontró tan sólo en 9% de los aislados resistentes a Estreptomina, por lo cual este gen presentó el mayor número de secuencias sin mutaciones, las cuales muy probablemente se encuentren fuera de la región analizada o en otro gen como podría ser *rpsL* (Tabla XVIII).

Fármaco	Gen	Mutación	Mutación más frecuente		Sin mutación		Total de secuencias
			N	%	n	%	
S	<i>rrS</i>	513 A-C ⁺	5	8.9%	40	71.4%	56
I	<i>katG</i>	S315N,T	32	40.0%	43	53.8%	80
	<i>inhA</i>	-15 C-T ⁺	6	7.8%	64	83.1%	77
R	<i>rpoB</i>	S531 L,W	48	67.6%	12	16.9%	71
E	<i>embB</i>	M306 V.I	20	32.8%	38	62.3%	61
P	<i>pncA</i>	L120P	7	16.7%	8	19.0%	42

+) Ubicación de nucleótido

Tabla XVIII: Mutaciones más frecuentes en genes asociados con la resistencia a fármacos en tuberculosis

En este sentido se encontró que las mutaciones en los nucleótidos 513C→T del gen *rrS*, y el codón S531L,W del gen *rpoB*, no mostraron asociación con ninguna de las variables estudiadas, siendo las mutaciones observadas con menor y mayor frecuencia respectivamente (Tabla XIX, Anexo 2).

En contra parte, la mutación S315N,T del gen *katG*, se asoció con la presencia de drogadicción en el paciente portador. Se recuperaron 6 aislados de pacientes con esta toxicomanía, 4 fueron I+ y en 3 se obtuvo la secuencia de *katG*, encontrándose en el 100% de los casos la mutación S513N,T; cabe recordar que la drogadicción se asoció con E+ en estos 6 casos (Tabla XVII, Anexo 1).

Por otro lado la mutación en la región promotora del gen *inhA* (-15C→T) presentó diferencias significativas respecto al lugar de residencia, lo cual probablemente se debe al bajo número de aislados con dicha mutación; sin embargo, es interesante notar que sólo se encontró en las jurisdicciones III, V, IX, X, XI, siendo las tres últimas las que menos aislados aportaron al estudio y no se observó en la jurisdicción de Veracruz (VIII) la cual aportó el mayor número de aislados (Tabla XIX, Anexo 2, Tabla VI).

Así mismo se identificó una relación entre la mutación M306V del gen *embB* con la ausencia de DM. En este sentido es importante retomar las asociaciones previamente descritas entre la I+ con DM, la E+ con drogadicción (Tabla 17, Anexo 1) y finalmente la mutación S513N,T de *katG* y la drogadicción (Tabla XIX, Anexo 2). Un análisis integrado de todas estas mutaciones y condiciones de los individuos portadores de estas cepas indican que cuando se observó resistencia simultánea a E+ e I+, el paciente refirió drogadicción y ausencia de DM; el 100% de los casos presentaron las mutaciones S513N,T en *katG* y M306V en *embB*. Por el contrario, cuando se observó resistencia a I+ y E+ en pacientes con diabetes sin reporte de drogadicción, la mayoría de las cepas no presentaron mutaciones en *embB* (75%) ni en *katG* (57.1%).

Con relación a la variable de edad, sólo se identificó asociación significativa entre los pacientes con mutación en *pncA* L120P con un promedio de edad menor (36 años) que aquellos que no presentaron la mutación (50 años). Esta mutación también se ubicó como la más frecuente en los pacientes que refirieron alcoholismo, con lo cual esta adicción se asoció a un riesgo 12 veces mayor respecto a dicha mutación (Tabla XIX, Anexo 2).

	<i>rrS</i> 513 C-T	<i>katG</i> S315N,T	<i>inhA</i> C-15T	<i>rpoB</i> S531L,W	<i>embB</i> M306V,I	<i>pncA</i> L120P
Edad *	50.0	47.0	42.8	45.2	50.2	36.1 & 50.2
Sexo F	5.7	0.7	1.3	0.6	1	0.2
Jurisdicción			III,V,IX,X,XI			
DM	3.2	0.9	1.7	0.5	0.2	0.4
Anemia	0% +	0.5	0% +	0.2	1.4	2.7
Desnutrición	2.9	1.5	0% +	100% +	3.4	2.7
Alcoholismo	0% +	1.6	1.4	2.4	0.7	12.3
Drogadicción	4.0	100% +	0% +	100% +	3.4	5.6
Retratamiento	1.1	0.8	0.3	1.5	1.1	0.4
Evolución de TB *	41.7	51.8	13	57	51	15

Valor de OR, las celdas de color indican los resultados con valores de $p \leq 0.05$,

*) Promedio de los valores positivos. %) Porcentaje de pacientes con (+) o sin (-) la condición de la fila, que tienen la mutación de la columna. En los casos que se presentó un 0 en la tabla tetracórica no fue posible cuantificar OR. Para información completa revisar Anexo 2, pp116.

Tabla XIX: Asociación entre variables epidemiológicas y mutaciones identificadas

7.4.3. Asociaciones entre resistencias farmacológicas (Fenotípicas)

Sobre la farmacoresistencia existen numerosos reportes que manifiestan una clara asociación entre la resistencia a Isoniacida y Rifampicina, considerándose DR cuando el bacilo presenta simultáneamente dichas condiciones. En este contexto se realizó un análisis bivariado con la finalidad de identificar posibles asociaciones entre las resistencias fenotípicas a fármacos de primera línea.

Pese a que el diseño de nuestro estudio no permite cumplir con el principio de temporalidad, es decir, se desconoce que farmacoresistencia se presentó primero y por tanto no se sabe cuál es causa o consecuencia de otra, es muy clara la asociación observada entre ellas, demostrando que existen más relaciones que la ampliamente conocida entre I y R (Figura 25, Anexo 3).

Los aislados S+ mostraron asociación con la resistencia a Isoniacida (OR 2.6) y Pirazinamida (OR 2.4). El 75.6% de los aislados S+ fueron resistentes a 3 o más

antibióticos, lo cual implica que se encontró un riesgo de asociación 6 veces mayor; en dichas asociaciones se desconoce la dirección del riesgo; sin embargo, es posible cuantificarlo (Figura 25, Anexo 3). Por el contrario no se encontraron asociaciones entre este antibiótico, con Rifampicina, Etambutol o MDR.

Además de la asociación I+ con S+ (OR 2.6), como era esperado, los aislados I+ se asociaron con la resistencia a Rifampicina (MDR) con un riesgo 14 veces mayor y con la resistencia a Pirazinamida con un riesgo de casi 5 veces mayor. No fue posible cuantificar el riesgo para MDR, ya que los aislados sensibles a I no pueden ser MDR, no obstante se pudo observar un alto porcentaje (79.6%) de aislados I+ que fueron simultáneamente R+, y no se encontraron aislados resistentes a 3 o más fármacos que no incluyeran a I, por ejemplo REP, SRE, SEP, etc; ambas situaciones con asociación estadísticamente significativa. Finalmente no se encontró asociación entre Isoniacida y Etambutol.

Los aislados R+ se asociaron como ya se había mencionado con I. Del mismo modo se encontró una fuerte asociación de R+ con Pirazinamida en donde se observó un riesgo 9 veces mayor; casi la mitad (49.5%) de los aislados R+ fueron también P+, mientras que 9.8% de los aislados R- fueron P+. Así mismo se identificó que los aislados R+ se asociaron con la resistencia a Etambutol, mostrando un riesgo casi 4 veces mayor (OR 3.6). Finalmente no se encontraron asociaciones significativas entre la resistencia a Rifampicina y Estreptomina. No obstante, los aislados R+ mostraron asociación con la resistencia a 3 o más fármacos con un riesgo 65 veces mayor, siendo este fármaco el que presentó mayor riesgo asociado a la resistencia a múltiples fármacos (Figura 25, Anexo 3).

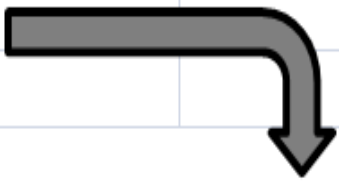
Los aislados E+ se asociaron de manera importante con la resistencia a Rifampicina (OR 3.6) y Pirazinamida (OR 6.7). Pese a no encontrar diferencias significativas con los aislados resistentes a Isoniacida, el porcentaje de aislados con resistencia simultánea a ambas drogas fue muy alto (87.7%), por lo cual no es extraño que se haya encontrado asociación entre los aislados E+, MDR (OR 5) y la resistencia a 3 o más drogas (OR 11).

Por último, los aislados P+ se asociaron con la resistencia a los cuatro fármacos, siendo el riesgo más grande el asociado a Rifampicina (OR 9), seguido por Etambutol (OR

6.7). Así mismo los asilados P+ tuvieron 11.5 veces más riesgo asociado a MDR y 22 veces más riesgo asociado a la resistencia a 3 o más fármacos.

Aunque no fue posible conocer la dirección del riesgo, se encontraron diversas asociaciones entre los fármacos con distintas cuantificaciones del mismo y con significancia estadística. (Figura 25, Anexo 3).

S	S	Dirección de Lectura			
I	2.6	I			
R	1.4	14	R		
E	1.1	2	3.6	E	
P	2.4	4.9	9	6.7	P
MDR	2	0% I-	0% R-	5	11.5
<u>≥</u> 3 Resistencias	6.1	0% I-	65.7	11	22.4
	2 (IP)	3 (SRP)	3 (IEP)	2 (RP)	4 (SIRE)



Valor de OR, celdas sombreadas indican resultados con valores de $p \leq 0.05$. %) Porcentaje de pacientes con (+) o sin (-) la resistencia de la fila, que también presentan la resistencia de la columna. En los casos que se presentó un 0 en la tabla tetracórica no fue posible cuantificar OR Para mayor información Anexo 3, pp117

Figura 25: Asociación entre la resistencia a fármacos de primera línea SIREP

7.4.4. Asociaciones entre resistencias farmacológicas y mutaciones más frecuentes (Fenotipo & Genotipo)

Una vez identificada la relación fenotípica existente entre fármacos, se realizaron análisis bivariados para buscar asociaciones genotípicas entre las mutaciones encontradas con mayor frecuencia en los genes analizados.

Los resultados del análisis bivariado arrojaron que las mutaciones en: *katG* S315N,T y *embB* M306V,I; presentaron una asociación estadísticamente significativa con la resistencia a 3 o más fármacos, lo mismo que la ausencia de la mutación *rpoB* S531L,W. (Tabla XX, Anexo 4). En ese sentido encontramos que la ausencia de las mutaciones en *rpoB* S531L,W y *pncA* L120P se asociaron a cepas resistentes a Estreptomicina; las mutaciones en *embB* M306V,I se relacionan con resistencia a Isoniacida. Así mismo se confirma la ya conocida asociación entre la mutación *katG* S315N,T con las cepas resistentes a Rifampicina y por tanto la MDR; finalmente esta misma mutación se asoció también con resistencia a Pirazinamida (Tabla XX, Anexo 4)

Mutaciones	Resistencia a un Fármaco					Resistencia a Múltiples Fármacos	
	S	I	R	E	P	<u>MDR</u>	≥ 3
<i>rrS 513C-T</i>		100%+	1.3	0.2	0.3	1.5	100% +
<i>katG S315N,T</i>	0.6		3.6	1.5	2.9	3.6	4.8
<i>inhA -15 C-T</i>	2.7		0.2	0.3	1	0.2	0.7
<i>rpoB S531L,W</i>	0.05	100% -		0.8	0.9	100% -	100% -
<i>embB M306V,I</i>	1.3	100% +	2.9		0.5	2.9	100% +
<i>pncA L120P</i>	0.05	100% +	100% +	100% +		100% +	100% +

Valor de OR, las celdas de color indican los resultados con valores de $p \leq 0.05$. %) Porcentaje de pacientes con (+) o sin (-) la mutación de la fila, que tienen la resistencia de la columna. En los casos que se presentó un 0 en la tabla tetracórica no fue posible cuantificar OR Para información completa revisar Anexo 4, pp. 118

Tabla XX: Asociación entre resistencias farmacológicas y mutaciones

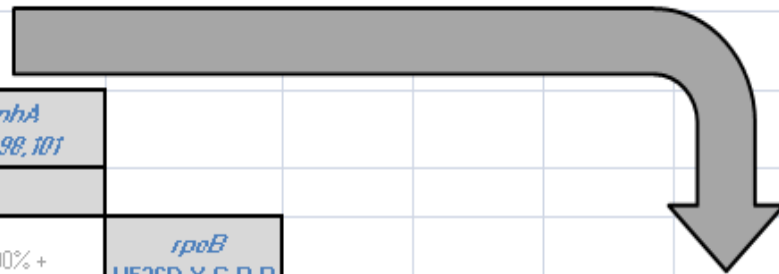
7.4.5. Asociaciones genotípicas entre mutaciones

Por último, se realizó análisis bivariado para buscar asociaciones genotípicas entre las mutaciones encontradas con mayor frecuencia en los genes secuenciados. La mutación asociada con mayor número de mutaciones, y en consecuencia con un mayor número de resistencias fenotípicas, fue S315N,T de *katG*. Dicha mutación se asoció con el cambio de base 513 C-T de *rrS*, con un riesgo casi 15 veces mayor; con la mutación en la región promotora (-15C-T) de *inhA*, con un riesgo mayor a 7, así como con la ausencia de mutaciones en el gen *inhA*, sin ser posible cuantificar su riesgo ya que ninguno de los aislados con mutaciones dentro de la región analizada del gen *inhA* presentaron la mutación en *katG315*. De igual forma se asociaron con *katG315* las mutaciones S531L,W del gen *rpoB* (riesgo mayor a 6); la mutación M306V de *embB* (riesgo 2.5), y L120P de *pncA*, siendo incuantificable el riesgo de esta última, ya que todas las cepas con esta mutación presentaron mutación en *katG315*.

Por otro lado se encontraron asociaciones entre la mutación H526D,Y,C,R,P de *rpoB* y las mutaciones, D328G de *embB* y K96R de *pncA*. Finalmente no se presentaron cepas que presentaran dicha mutación en *rpoB* y mutaciones en *rrS* o la región promotora de *inhA* (Figura 26, Anexo 5)

Fármaco	Mutación										
<i>rrS</i>	513 C-T	<i>rrS</i> 513C-T									
<i>katG</i>	S315N,T	14.7	<i>katG</i> S315N,T								
<i>inhA</i>	C-15T	6.3	7.2	<i>inhA</i> - 15 C-T	<i>inhA</i> 21,98,101						
	21,80,98,101	0% +	0% +								
<i>rpoB</i>	H526D,Y,C,R,P	0% +	1.4	0% +	100% +	<i>rpoB</i> H526D,Y,C,R,P					
	S531L,W	0.4	6.6	0.9	0.1	0% +	<i>rpoB</i> S531L,W				
<i>embB</i>	M306V,I	1.4	2.5	0% +		1.5	2.6	<i>embB</i> M306V,I			
	D328G	0% +	0% +	0% +	100% +	100% +	0% +	0% +	<i>embB</i> D318G		
<i>pncA</i>	K96R	0% +	0% +	0% +	100% +	100% +	0% +	0% +	100% +	<i>pncA</i> K96R	
	L120P	0% +	100% +	0% +		0% +	100% +	0.9	0% +	0% -	<i>pncA</i> L120P
		1	6	1	1	2	4	2	2	1	2

Dirección de Lectura



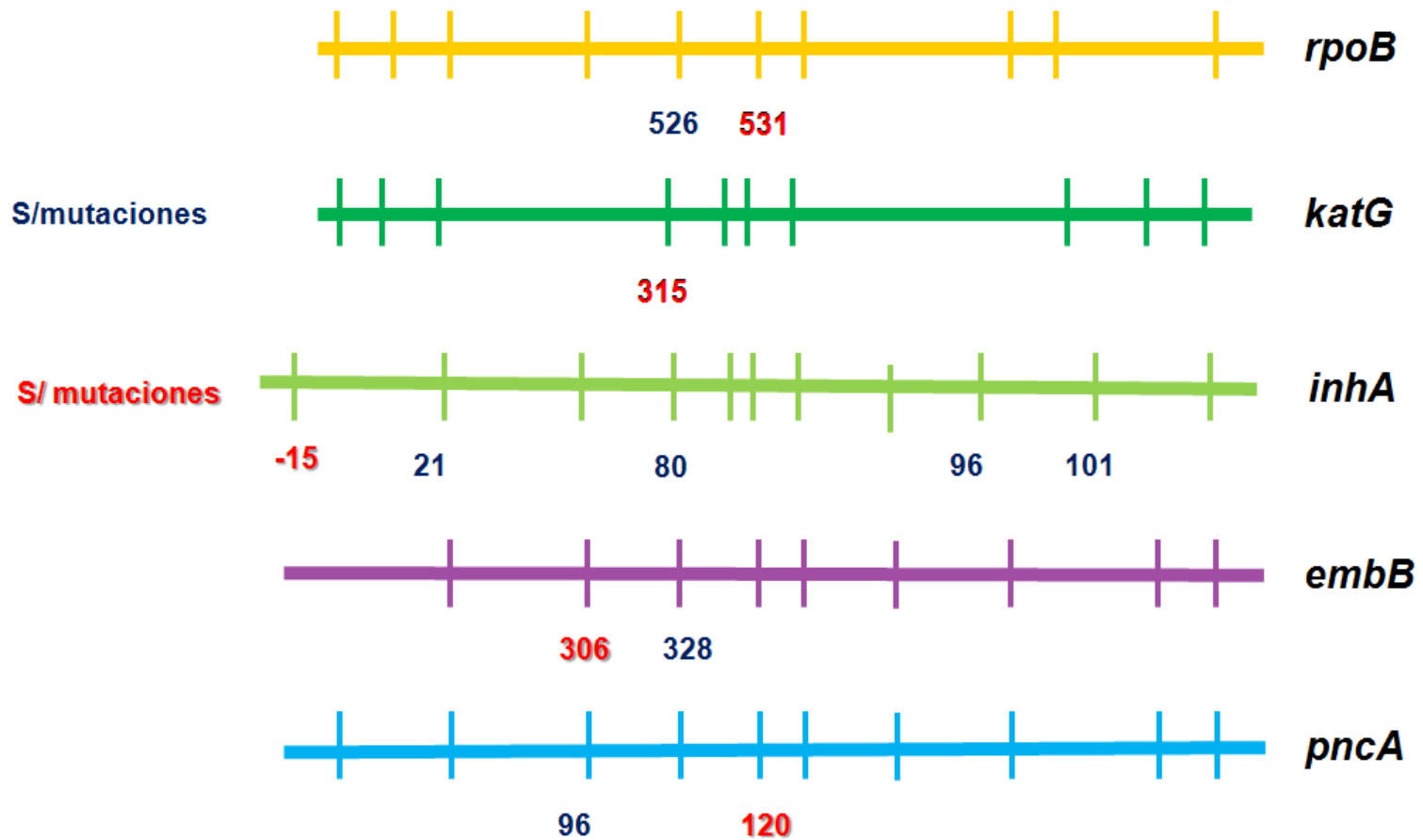
Valor de OR, las celdas de color indican los resultados con valores de $p \leq 0.05$, * Promedio de los valores positivos. %) Porcentaje de pacientes con (+) o sin (-) la condición de la fila, que tienen la mutación de la columna. En los casos que se presentó un 0 en la tabla tetracórica no fue posible cuantificar OR Para información completa revisar Anexo 5, pp. 119

Figura 26: Asociación estadística entre mutaciones

Derivado de todos los análisis anteriores se puede distinguir la conformación de dos patrones o grupos de mutaciones presentes en los aislados analizados (Figura 27).

Los aislados del grupo 1 se caracterizan por presentar la mutación 531 de *rpoB* con cambios en 315 de *katG*, -15 *inhA*, 306 de *embB* y 120 de *pncA*. Mientras que el grupo 2 se compondría por aislados con mutaciones en 526 en *rpoB*, la cual se encuentran acompañada de la ausencia de mutaciones en *katG*, y cambios en los codones 21, 80, 96 o 101, de *inhA*, 328 en *embB* y 96 de *pncA*

Esto abre la posibilidad de que las mutaciones aparezcan como respuesta a una cascada de señalización específica en la cual la posición y tipo de mutación tiene una conotación específica, posiblemente dada en parte por las características del hospedero y no como una aparición aleatoria que se observa como respuesta a la selección simple del asilado dada por el antibiótico empleado.



Patrones de mutaciones: Rojo (Set I): 531 *rpoB*, 315 *katG*, ausencia de mutaciones en *inhA*, mutación en la región promotora de *inhA*, 306 *embB* y 120 *pncA*. Azul (Set II): 526 *rpoB*, ausencia de mutaciones en *katG*, mutaciones en el gen *inhA*, 328 *embB* y 96 *pncA*.

Figura 27: Patrones o juegos de mutaciones

8. *Discusión*

Hasta donde tenemos conocimiento este estudio contempla una de las colecciones de aislados de tuberculosis resistentes más grandes de México. De los 136 aislados clínicos de *Mycobacterium* que se analizaron, las resistencias farmacológicas presentes de mayor a menor frecuencia fueron: Isoniacida (83.1%), Rifampicina (69.9%), Estreptomina (66.9%), Etambutol (53.7%) y Pirazinamida (37.5%). El 66.2% de los aislados presentaron MDR y el 23.5% resistencia a los cinco fármacos de primera línea (SIREP). Lo cual evidenció las características drogorresistentes de las cepas que se encuentran diseminadas en el estado y así como el considerable riesgo de transmisión de estas cepas.

La resistencia a Isoniacida fue la DR identificada con mayor frecuencia en casi todas las jurisdicciones del estado, distribuyéndose en porcentajes del 66% al 100%; a excepción de Tuxpan en donde la resistencia más frecuente fue a E. Por el contrario E fue la resistencia de menor frecuencia en jurisdicciones como Martínez de la Torre, San Andrés Tuxtla, junto con P en Cosamaloapan. La distribución de la resistencia a R se presentó de manera similar a I, encontrándola del 62.5% al 100% de los aislados DR a excepción de Cosamaloapan. Por otro lado, la resistencia a P fue la menos frecuente en jurisdicciones como Pánuco, Xalapa, Córdoba, Orizaba, Veracruz y Coahuila. Finalmente la resistencia a S presentó variaciones de 25% (Coahuila) a 100% (San Andrés y Pánuco) entre jurisdicciones. Pese a que en algunas jurisdicciones el número de muestra fue muy pequeño y se requiere realizar estudios más profundos para conocer la dinámica de DR dentro del estado, lo anterior hace valorar la necesidad de establecer tratamientos individualizados en función del tipo de DR que se presenta en regiones específicas, así como las condiciones del paciente (DM, VIH, retratamiento, etc); considerando que determinados fármacos proporcionan mayor o menor eficacia frente a ciertos casos, con lo cual se favorecería la disminución de DR y a su vez el control de la enfermedad.

Respecto al contexto epidemiológico, un dato que llamó nuestra atención fue la asociación entre los pacientes del sexo femenino y la TB-MDR, observando en las mujeres un riesgo 3 veces mayor. Pese a que la Diabetes y el tratamiento primario, fueron variables de mayor frecuencia en mujeres, no se encontró asociación entre

dichas condiciones y la MDR, lo cual sugiere la presencia de algún otro mecanismo no identificado en este trabajo, posiblemente de tipo fisiológico, hormonal, genético o social (Caminero,2003; Hudelson,1996) que pudiera estar participando en esta relación. Así mismo, se encontró asociación entre Anemia y Drogadicción en los pacientes con resistencia a Etambutol; sin embargo, pese a tener alta significancia estadística, consideramos se debe incrementar el número de individuos con dichas condiciones para ofrecer resultados concluyentes, por lo cual sugerimos incrementar el tiempo de colección y el tamaño de individuos a analizar con la intención de corroborar si los datos presentan validez externa, para el caso particular de Etambutol.

En lo que respecta al análisis genético, los aislados indicaron una gran heterogeneidad en cuanto a la variación de las mutaciones que explican el fenómeno de drogoresistencia, identificándose muchas de ellas por primera vez. En este aspecto son escasos los reportes del país que describen mutaciones identificadas por secuenciación en aislados DR. No obstante son cada vez más frecuentes de encontrar estudios en los que se utilizan otras técnicas como spoligotipo o RFLP y que muestran la diversidad y heterogeneidad de los aislados presentes tanto en el país como en otras partes del mundo. Por ejemplo, la heterogeneidad observada parece no ser una característica exclusiva del estado de Veracruz, ya que en Monterrey se reportó una gran variabilidad genética en los aislados de TB analizados mediante spoligotipo (Molina-Torres et al.,2010), al igual que en Bogotá en donde 74% de los aislados analizados por RFLP-IS6110 mostraron diferentes patrones mientras el 26% restante se incorporaron en 17 clusters conformados por 2 a 4 aislados (Hernández et al.,2008). En Brasil se reportó una gran diversidad genética con casi una cuarta parte de aislados analizados con patrones de spoligotipo huérfanos (Mendes et al., 2011). Lo anterior da idea de la diversidad de cepas que infectan a las poblaciones, la capacidad adaptativa de las mismas y los importantes cambios evolutivos que dichos bacilos llevan a cabo como respuesta a las presiones del medio; encontrando cambios tanto en genes constitutivos como en genes relacionados con farmacoresistencia.

Respecto a este último punto, el análisis del gen el *rrS*, mostró que 28.6% de los aislados presentaron mutaciones, lo cual es ligeramente mayor al rango de 8-21% reportado para explicar la resistencia a Estreptomicina en otras revisiones y estudios (Arráiz et al.,2005; Sekiguchi et al.,2007); inclusive duplicando al 13% reportado en

Barcelona (Tudó et al.,2010) y 3.2% encontrado en Marruecos al norte de África (Chaoui et al.,2009). De las ocho mutaciones encontradas solo los cambios de base de las posiciones 516 y 513 tuvieron reportes previos (Arráiz et al.,2005; Sekiguchi et al.,2007). Por otro lado, seis cambios no se identificaron en la Base de datos TB-DRMDB, dentro de las mutaciones reportadas con alta confiabilidad. El 71.4% de los aislados no presentaron cambios de base en la región analizada de *rrS*, lo cual señala que posiblemente presenten mutaciones asociadas con resistencia a estreptomicina fuera de dicha región o en otro gen como *rpsL* (Arráiz et al.,2005; Quirós-Roldán et al.,2001; Said et al.,2005).

Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer reporte que describe los mecanismos generadores de resistencia a estreptomicina en aislados mexicanos de tuberculosis. Sin embargo, es necesario realizar estudios con un mayor número de aislados a fin de comprender la dinámica de resistencia a este fármaco.

De los aislados resistentes a Isoniacida, el 46.2% de las secuencias de *katG* presentaron mutaciones no sinónimas, porcentaje ligeramente inferior al 50-68% indicado en otros reportes (Arráiz et al.,2005; Caws y Drobniewski,2001; Kim et al.,2003; Said et al.,2005; Sekiguchi et al.,2007; Uniprotkb/Swiss-Prot R,2011c) y por debajo del 47.1% encontrado en Egipto (Abadi et al.,2009) o al 88.5% reportado en Chile (Araya et al.,2011). La mutación en el codón 315 fue la de mayor frecuencia, lo cual concuerda con reportes previos; sin embargo, el porcentaje con que se identificó, 40.1%, fue mayor que el 22% observado en Japón (Ando et al.,2010) pero inferior al 67.7% reportado en Monterrey, México (Ramaswamy et al.,2004), 52% de Sudáfrica (Víctor et al.,1996) o 91% de Rusia (Marttila et al.,1998). Entre las mutaciones encontradas, cuatro cambios no se identificaron en la Base de datos TB-DRMDB, como de alta confiabilidad, ni en reportes previos (Arráiz et al.,2005; Caws y Drobniewski,2001; Kim et al.,2003; Said et al.,2005; Sekiguchi et al.,2007; Uniprotkb/Swiss-Prot R,2011c; Ando et al.,2010).

Finalmente, 53.8% de los aislados no presentaron cambios de base en la región analizada, mientras 18.6% presentaron cambios en el gen *inhA* o su región promotora; y 35% restante posiblemente presente mutaciones asociadas a resistencia con Isoniacida fuera de dicha región o en otro gen (Arráiz et al.,2005; García et al.,2003; Mo et al.,2004).

El 16.9% de las secuencias de *inhA* presentaron mutaciones no sinónimas, tanto en la región promotora como codificante del gen, este valor está en el intervalo de 12-34% indicado en otros estudios (Arráiz et al.,2005;García et al.,2003; Mo et al.,2004; Hazbón et al.,2006) pero por arriba del 3.9% encontrado en Singapur (Ho et al.,2009) y 3% de Marruecos (Chaoui et al.,2009). La mutación encontrada con mayor frecuencia fue en el nucleótido -15 de la región promotora del gen con un 7.8%, muy similar a lo reportado en Tamaulipas (7.7%) pese a que en ese estudio sólo se analizaron 13 aislados resistentes (Garza-González et al.,2010). Ninguna de las cinco mutaciones encontradas, se reportó con alta confiabilidad en la base de datos TB-DRMDB; no obstante en otros estudios se encontraron las mutaciones de la región promotora y el codón I21V, pero no la observada en el codón M98V, ni las bases mixtas encontradas en los codones 238 y 303 (Arráiz et al.,2003; Mo et al.,2004).

Por otro lado, 83.1% de los aislados no presentaron mutaciones en este gen; en contraparte, 48.4% presentaron cambios de base en el gen *katG*, lo que pudiera explicar la resistencia a Isoniacida. Además, el restante 34.7% posiblemente presenten mutaciones fuera de las regiones secuenciadas de los mismos o en otros genes, tal como *mabA* (Arráiz et al.,2005; Caws y Drobniewski,2001; Kim et al.,2003; Said et al.,2005; Sekiguchi et al.,2007; Uniprotkb/Swiss-Prot R,2011c).

Dentro de los mecanismos que describieron el fenómeno de resistencia a rifampicina encontramos que 83.1% de las secuencias de *rpoB* presentaron mutaciones no sinónimas en el fragmento analizado, todas pertenecientes a la RDRR (del codón 507 al 533). Este porcentaje es inferior al 92-97% reportado en revisiones y estudios previos (Kocagoz et al.,2004) pero mayor que el 76% encontrado en Egipto (Abadi et al.,2009). La mutación de mayor frecuencia se presentó en el codón 531 en 67.6% de los aislados R+, por arriba del 24% identificado por pyrosecuenciación en Nuevo León (Garza-González et al.,2010). Entre las mutaciones encontradas, tres cambios no se ubicaron en la Base de datos TB-DRMDB , dentro de las mutaciones reportadas con alta confiabilidad, ni en reportes previos (Arráiz et al.,2005; Caws y Drobniewski,2001; Kim et al.,2003; Kocagoz et al.,2005; Marín et al.,2004; Quirós-Roldán et al.,2001; Said et al.,2005; Wada et al.,2004; WHO,2007; WHO,2010a; Zhang et al.,2005). Un 17% de los aislados no presentaron cambios en la región analizada, este es uno de los porcentajes más altos descritos hasta ahora, y de inmediato plantea interrogantes sobre

cuáles serían los mecanismos que podrían estar involucrados en el desarrollo de resistencia para este antibiótico en el estado de Veracruz.

Encontramos que sólo 37.7% de los aislados con resistencia a etambutol, presentaron mutaciones no sinónimas en el fragmento secuenciado de *embB*, este es uno de los porcentajes más bajos al compararse con el intervalo de 47-65% (Uniprotkb/Trembl U,2011b) reportado de manera general, así como con el 42.3% observado en Marruecos (Chaoui et al.,2009), el 56.7% en China (Wu et al.,2005) y el 66% de Estados Unidos (Starks et al.,2009); sin embargo, es mayor que el 36.4% observado en Egipto (Abadi et al.,2009). La mutación en el codón 306 se presentó en 32.8% de los aislados E+, dicha frecuencia fue menor que el 66.7% reportado en Monterrey (Ramaswamy et al.,2004) con una muestra de casi la mitad de aislados respecto al presente estudio. Entre las mutaciones encontradas, el cambio en la posición 200 T → C (codón F300L) no se encontró en la base de datos TB-DRMDB, dentro de las mutaciones con alta confiabilidad. Además en esta categoría tampoco se identificó el cambio característico y ampliamente descrito en la literatura en el codón 306. Finalmente, 62.3% de los aislados no presentaron cambios de base en el codón 264 al 349, lo cual señala que posiblemente presenten mutaciones fuera de dicha región, o en los otros genes del operón como *embA* o *embC* (Arráiz et al.,2005; Sreevatsan et al.,1997; WHO,2007; Zhang y Mitchison,2003).

Lo anterior deja ver la amplia zona del operón en la que probablemente se distribuyen las mutaciones que generan resistencia a Etambutol, remarcando la heterogeneidad de las cepas que circulan en el estado, lo cual complicaría el control de la Tuberculosis. Por otro lado, los resultados observados de cepas con resistencia a etambutol en portadores con otras comorbilidades y adicciones, claramente manifiestan la importancia de establecer tratamientos individualizados en especial en pacientes con diabetes, VIH y antecedentes de abandono o recaída, en quienes esta recomendado el uso de este antimicobacteriano.

El 81% de las secuencias de *pncA* analizadas presentaron cambios distribuidos en el gen y la región reguladora, lo cual coincide con los porcentajes mencionados en revisiones previas que van de 72 al 99% (Arráiz et al.,2005; Quirós-Roldán et al.,2001; Somoskovi et al.,2007; Zhang y Mitchison,2003). Por ejemplo, en Sudáfrica 66% presentaron mutaciones en dicho gen (Bishop et al.,2001), en Brasil 72.5% (Rodrigues

et al.,2005), en Estados Unidos de 86.8% a 99% (Scorpio et al.,1997; Somoskovi et al.,2007), en China 93% (Zhang et al.,2009), en Portugal 94%, (Portugal et al.,2004) y en Corea 96.8% (Lee et al.,2001). Además, catorce de las mutaciones encontradas, no se identificaron en al base de datos TB-DRMDB, ni en otros reportes (Arráiz et al.,2005; Quirós-Roldán et al.,2001; Uniprotkb/Swiss-Prot R,2011b), por lo que se convierten en cambios específicos del estado de Veracruz.

Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer reporte que describe los mecanismos generadores de resistencia a Pirazinamida en México. Uno de los puntos que llamaron fuertemente nuestra atención fue la gran diversidad de mutaciones encontradas, lo cual sin duda repercutirá en el desarrollo y aplicación de métodos de diagnóstico molecular de bajo costo y por otro lado muestra la diversidad de cepas que circulan en el estado. En este mismo sentido, las inserciones y deleciones encontradas generaron cambios de marco de lectura o codones de paro que posiblemente dejen proteínas truncas cuya funcionalidad esté comprometida. La recientemente determinación de la estructura tridimensional de la proteína pirazinamidasa codificada por el gen *pncA*, muestra que las mutaciones afectan en específico el sitio catalítico de la esta enzima, así como los aminoácidos que conforman una red de puentes de hidrógeno que le confieren estabilidad al sitio (Petrella et al.,2011). Además los codones de paro generarían productos inactivos, lo cual de inmediato hace pensar en alguna otra enzima que compense la pérdida de la función de la pirazinamidasa.

Por otro lado, no se detectaron mutaciones en la región promotora ni codificante del gen *pncA* en 19% de los aislados resistentes a Pirazinamida, lo cual aunado a los productos inactivos previamente descritos plantea la necesidad de un gen adicional que pudiera compensar la pérdida de la función de *pncA* y al mismo tiempo generar un mecanismo de resistencia a este medicamento hasta ahora desconocido. Reciente se estableció la participación de los productos derivados de la acción de *pncA*, POA y como interfieren en al acción de movimiento ribosomal (Shi,2011)

Otra posible explicación podría deberse a la existencia de falsos positivos, generados por errores en la asignación de resistencia/sensibilidad mediante el método Bactec-MGIT; lo anterior como consecuencia de las diferencias en la actividad pirazinamidasa *in vivo* respecto a *in vitro* y que son fuertemente influenciadas por el pH (Mccammon et al.,2005), así como la presencia y concentración de la albúmina sérica bovina en los

medios de cultivo y también la fase de crecimiento, o el estado metabólico del bacilo. Todo lo anterior ubica al diagnóstico de resistencia contra pirazinamida como una técnica complicada y poco confiable por sus inconsistencias (Zhang y Mitchison,2003).

La no identificación de las mutaciones asociadas a *Mycobacterium bovis*, en los aislados con resistencia a pirazinamida, nos hace pensar que las infecciones de TB, se dan predominantemente entre humanos, sin la participación de ganado bovino, a pesar de que en varias regiones, de donde provenían las muestras, se observa una fuerte actividad ganadera, lo que pudiera hablar bien del programa de control de tuberculosis bovina en el estado.

En total se identificaron 35 mutaciones no reportadas en la TB-DRMDB dentro de los registros de alta confiabilidad, de las cuales seis se ubicaron en el gen *rrS*, cinco en *katG*, cinco en *inhA*, cuatro en *rpoB*, uno en *embB* y catorce en *pncA*. Esto resalta de nueva cuenta, la heterogeneidad de cambios existentes en dichos genes, la variabilidad de los aislados que se presentan en la región y evidencia la existencia de otras mutaciones o cambios presentes en otros genes que expliquen el por que son resistentes a los fármacos. Lo anterior sin duda obliga a profundizar en el estudio, identificación y caracterización de estos genes y de esta manera explicar el comportamiento de aislados resistentes que circulan en el estado de Veracruz.

Un punto importante de mencionar es el impacto negativo que esta heterogeneidad de cambios y mutaciones tendrá para el empleo de pruebas moleculares comerciales para el diagnóstico de resistencia a fármacos en los aislados provenientes de Veracruz. Por ejemplo la pruebas comerciales disponibles para el diagnóstico de resistencia a Rifampicina e Isoniacida, aprobadas por la FDA, como Inno-LiPA (Miller et al.,2000; Morgan et al.,2005), o GenoType MTBDR (Hillemann et al.,2007), las cuales poseen niveles de sensibilidad superiores al 90% (de acuerdo a los fabricantes), presentarían discordancia en su efectividad con respecto a los aislados que circulan en Veracruz. Su aplicación en los aislados aquí analizados arrojaría sensibilidades del 70.4% y 40.1%, para el diagnóstico de resistencia a Rifampicina e Isoniacida. Adaptaciones de estas técnicas, mediante la incorporación de nuevas sondas que consideren las mutaciones presentes en los aislados del estado, tendría un impacto directo en el costo de las mismas.

Por ejemplo, de acuerdo a nuestros resultados, si se pretende diagnosticar la resistencia a Isoniacida, se requeriría la incorporación de 7 nuevas sondas para identificar el 46.2% de los aislados resistentes, además se necesitarían 5 sondas para identificar los cambios en el gene *inhA*; sin embargo, la sensibilidad final sería el 76%, en virtud de que el 24% de los aislados resistentes a Isoniacida no presentaron cambios en ninguno de los genes estudiados. Para el diagnóstico de resistencia a Rifampicina se observaron 11 cambios en el gene *rpoB*; sin embargo, sólo se identificaría al 83.1% de las micobacterias resistentes.

Debido a la diversidad de mutaciones encontradas en los aislados del estado, es posible pensar en el nuevo procedimiento diagnóstico, Xpert® MTB/RIF, el cual realiza de manera simultánea el diagnóstico de TB, resistencia a Rifampicina y marcador subrogado de MDR, mediante la identificación de las mutaciones presentes en la región RDDR, y es altamente recomendado por la OMS para ser incorporado en países de escasos recursos, como una herramienta bastante útil. De acuerdo a los autores el procedimiento posee un 95% de sensibilidad y especificidad (Helb et al.,2010); sin embargo, su aplicación en los aislados recuperados en este estudio arrojaría una sensibilidad del 83%, ya que el 17% de los aislados resistentes a rifampicina no mostraron mutaciones en la región RDRR de *rpoB*. Por lo cual nuestros resultados remarcan lo descrito por otros autores (Van Deun et al.,2010; Van Rie et al.,2010), quienes mencionan sobre la necesidad de analizar el comportamiento y características de los cambios asociados a la resistencia a fármacos en los aislados de cada región antes de implementar métodos diagnósticos. De esta manera se reducirían las posibilidades de realizar diagnósticos falsos negativos, permitiendo la diseminación de cepas resistentes entre la población.

Respecto a fármacos como Estreptomicina, Etambutol y Pirazinamida no existen en el mercado pruebas genotípicas comerciales que permitan identificar su resistencia. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, para Estreptomicina se requerirían 8 ensayos diferentes de *rrS* para identificar 28.6% de los aislados resistentes, en el caso de Etambutol se necesitarían 6 sondas de *embB* para identificar solo 37.7% de las muestras resistentes; y finalmente 18 cambios de base en *pncA* más la identificación de 4 inserciones y 4 deleciones explicarían el 81% de los aislados resistentes a Pirazinamida.

Si bien la utilización de algunas técnicas moleculares rápidas y de bajo costo pareciera desalentadora; también es cierto que nuestros resultados revelan asociaciones intrínsecas entre las mutaciones de los distintos genes y los diferentes fármacos, abriendo la posibilidad de que algunas de ellas sean suficientes para identificar la resistencia a varios fármacos.

Sobre este aspecto se encontró que la ampliamente conocida relación entre I y R para multidrogorresistencia es una de varias asociaciones existentes entre las resistencias a los fármacos de primera línea; lo anterior probablemente sea reflejo de las condiciones del medio en el cual crece el bacilo, recordando que el paciente lleva un tratamiento farmacológico con dichas drogas de manera simultánea. Los resultados obtenidos mostraron por ejemplo asociación de Pirazinamida con I, R, E, MDR y resistencia a tres o más fármacos, en contra parte no se encontraron aislados resistentes a 3 o más fármacos que no incluyeran I, lo cual sugiere un posible mecanismo que requiera la presencia de una mutación para desencadenar una cascada posterior de resistencias. No obstante es necesario realizar diversos estudios para confirmar esta hipótesis.

El análisis conjunto de las mutaciones presentes en los diversos genes de los aislados farmacorresistentes aquí recuperados, permitió identificar, a nivel genotípico, que la asociación fenotípica de MDR clásicamente descrita, posiblemente se deba a la mutación S315N,T de *katG*, la cual se asoció con resistencia a R y por tanto a MDR, además de P y resistencia a tres o más fármacos. Estos datos ubican a esta mutación como un buen marcador molecular de diagnóstico para multidrogorresistencia o polirresistencia.

Ayudando esta idea encontramos que la mutación S315N,T se asoció con mutaciones en codones específicos de cinco genes relacionados con resistencias farmacológicas distintas, generando un patrón o set de mutaciones. Este cambio de base no se asoció con mutaciones en codones como 526 de *rpoB*, ó 96 de *pncA* los cuales conformaron un patrón o set distinto. Sin embargo, se requerirán más estudios con un mayor número de aislamientos tanto resistentes como sensibles, a fin de confirmar esta posibilidad de existencia de patrones, así como estudios de seguimiento que permitan determinar si alguna mutación específica precede o dirige otras.

No se identificó en la literatura, estudios donde se describa el comportamiento simultáneo de las mutaciones presentes en seis genes relacionados con la resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea en los mismos aislados. Por lo que consideramos que este pudiera ser el primer reporte con una aproximación de este tipo, los resultados sin duda proporcionan un mejor entendimiento de las estrechas relaciones que se presentan en el bacilo expuesto a diversas condiciones y permite además plantear interrogantes sobre los mecanismos bajo los cuales se llevan a cabo las mutaciones en dichos genes y sus repercusiones; así como hacia el área clínico-epidemiológica, ya que permite reconocer la eficacia que tendría la implementación de pruebas comerciales existentes para el diagnóstico de resistencia, y al mismo tiempo puede sugerir aquellas que podrían ser las alternativas diagnósticas que ofrezcan los mejores resultados a un menor costo.

Desde el punto de vista biológico, las relaciones identificadas a partir de nuestros datos sugieren la posibilidad de que exista un mecanismo específico que determina o restringe los tipos de las mutaciones posibles, es decir que la micobacteria desarrolla una cascada de señalización que conlleva a proceso de mutación dirigida y que este proceso no se desarrolla por un proceso aleatorio simple. Esta idea se apoya en parte por el hecho que la drogorresistencia en *Mycobacterium* no se debe a procesos de intercambio genético como conjugación de plásmidos o transposones (Nguyen et al.,2006).

En este sentido, se ha sugerido que las mutaciones en bacterias no surgen totalmente al azar, y que algo similar a la mutación dirigida se puede observar bajo determinadas condiciones, en especial cuando existen condiciones selectivas que previenen el crecimiento. Existen evidencias de que las células en estado latente son más susceptibles a mutaciones ya que la ausencia de crecimiento no necesariamente significa ausencia de actividad metabólica, y puede incluir alguna forma de replicación del ADN (Park et al.,2004). En este aspecto se sabe que el bacilo tuberculoso puede permanecer periodos prolongados en fase estacionaria de crecimiento o etapa latente, en la cual incrementa su tolerancia a los ambientes de estrés y es capaz de sobrevivir después de varios meses de tratamiento con terapéutica antimicrobiana combinada (Alvarez et al.,2009).

Autores como Nguyen y colaboradores sugieren la existencia de un modelo intrínseco de multidrogorresistencia en *Mycobacterium*, y mencionan que la exposición gradual a antibióticos que penetran lentamente en la bacteria podría provocar el lento crecimiento, el cambio metabólico y la expresión de sistemas de drogorresistencia que funcionan juntos para prevenir efectos bactericidas (Nguyen et al.,2006). En este sentido, el gen *whiB7* es un regulador maestro que confiere resistencia a drogas que han penetrado en el citoplasma; su transcripción es auto regulada y aparentemente se activa por componentes antimicrobiales con diferentes estructuras y marcadores, lo cual sugiere que muchos antibióticos generan una señal común de estrés o disfunción fisiológica. La expresión del gen *whiB7* puede ser inducida por la exposición a concentraciones subinhibitorias de fármacos en dosis y tiempo dependientes, cuando *M. tuberculosis* entra en los macrófagos u otra célula, órgano o tejido rico en lípidos, esto le permite resistir a la quimioterapia de manera más efectiva, mientras se protege en áreas específicas del cuerpo. Haciendo evidente que los antibióticos inducen inesperados cambios en los patrones de expresión de ciertos genes que podrían delinear su sistema intrínseco de generación de drogorresistencia (Nguyen et al.,2006)

Todo lo anterior remarca la necesidad de analizar los mecanismos mediante los cuales *Mycobacterium* lleva a cabo sus procesos de resistencia a fármacos, con la finalidad de bloquear esta característica o identificar de manera precoz la resistencia a múltiples fármacos. En este sentido el set de mutaciones asociadas con la mutación *katG* 315 ubican a este marcador como un posible blanco para el desarrollo de pruebas de tamizaje, que al ser detectado conlleve a una aproximación clínico-epidemiológica particularizada del paciente, con medidas de seguimiento y tratamiento distintas, considerando que la mutación identificada en el aislamiento se encuentra fuertemente relacionada con mutaciones en otros genes que confieren multidrogorresistencia a más de la mitad de los fármacos de primera línea.

Finalmente, un punto importante a considerar fueron las limitaciones del estudio, quizá la más importante fue la restricción para contar con la suficientes bacterias que nos permitiera obtener la cantidad de ADN necesaria para realizar los análisis de secuenciación de todos los genes participantes en la DR; así tenemos que de los 536 fragmentos, solo fue posible analizar 387 (72%). De aquí se deduce la importancia de acceder al aislado en cultivo para realizar los análisis que se requieran y de esa forma

conjuntar datos obtenidos a partir de diferentes técnicas. De igual forma se identificaron y ajustaron diversos aspectos técnicos, relacionados con la extracción, mantenimiento y rendimiento de los procedimientos de PCR y secuenciación. Esto nos facilitó establecer e implementar metodologías propias que nos permitirán entender y profundizar en el conocimiento de los mecanismos generadores de resistencia fármacos en tuberculosis, con alta certidumbre y confiabilidad.

Por último podemos decir que en este estudio se desarrollaron y/o adaptaron diversos procedimientos para la secuenciación de los cinco genes asociados al fenómeno de DR, estandarizando la técnica con altos valores de calidad en los espectroferogramas, lo cual se traduce en alta confiabilidad de las mutaciones identificadas. Gracias al proceso de automatización del equipo de análisis genético, fue posible determinar la secuencia de ADN de 387 fragmentos, y por medio del empleo de los programas Sequencing Analysis y SeqScape se realizó el análisis de más de 120 mil bases. Además por primera vez se realizó un análisis conjunto de dichas secuencia en aislados TB-DR mexicanos, tomando en cuenta no sólo las farmacoresistencia conjuntas sino el estado de salud general y las variables epidemiológicas del paciente.

Consideramos que las condiciones empleadas en nuestro análisis, como fueron analizar secuencias cuyos valores de calidad en la fluorescencia presentaran probabilidad de error menor al 1%; así como obtener la secuenciación de los genes en ambas orientaciones, 5'-3' y 3'-5'; confirieron un alto grado de confiabilidad a las mutaciones identificadas, ya que dichas condiciones no son empleadas en este tipo de estudios y deberían ser consideradas como un estándar, sobre todo si se pretende que una sola mutación explique o no una característica fenotípica.

9. Conclusiones

El análisis de los aislados recuperados mostró una gran diversidad de cambios, y mutaciones que explican parcialmente los mecanismos de resistencia a fármacos por la tuberculosis, así como una gran diversidad de aislados clínicos que se encuentran dispersos en el estado de Veracruz.

Sin embargo, ciertas mutaciones en los genes *katG* (S315N,T), *embB* (M306V,I) y *pncA* (L120P) prometen ser buenos candidatos para marcadores moleculares de resistencia a múltiples fármacos. Así mismo se identificó la presencia de ciertas asociaciones no conocidas o referidas en la literatura, además de la tradicional 315 de *katG* y 531 de *rpoB*; dichas asociaciones no sólo abren la pauta en el campo clínico ofreciendo prometedoras pruebas diagnósticas de multidrogorresistencia, si no también en el campo de la biología en donde resulta importante identificar si los mecanismos moleculares mediante los cuales el bacilo, con un sólo cambio de base, evade la acción de un fármaco sin comprometer su supervivencia, se deben a un proceso aleatorio determinado por las sucesivas divisiones del bacilo y seleccionado por el medio o se deben a un mecanismo molecular de respuesta bacteriana como el estrés, relacionado con la activación de una cascada de señales como respuesta a los fármacos que logra censar en su interior.

Todo lo anterior remarca la necesidad de profundizar en el entendimiento de los cambios y mutaciones que expliquen el fenómeno de la farmacorresistencia, ya que a partir de este conocimiento será posible proponer su empleo en pruebas diagnósticas rápidas sensibles y específicas que coadyuven a limitar la diseminación y en consecuencia a un mejor control de la TB.

10. Referencias bibliográficas:

1. Abbadi SH, Sameaa. G, Morlock G, Cooksey RC. (2009) Molecular identification of mutations associated with anti-tuberculosis drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Infect Dis*, 13: 673-678.
2. Acosta S, León. C, Leal A. (2004) Determinación de la concentración inhibitoria mínima en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la técnica colorimétrica de alamar azul. *Infect*, 8:194-202.
3. Affolabi D, Odoun M, Martin A, Palomino JC, Anagonou S, Portaels F. (2007) Evaluation of direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance by a nitrate reductase assay applied to sputum samples in Cotonou, Benin. *J Clin Microbiol*, 45:2123-2125.
4. Affolabi D, Sanoussi N, Odoun M, Martin A, Koukpededji L, Palomino JC, et al. (2008) Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Cotonou (Benin) using two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *J Med Microbiol*, 57:1024-1027.
5. Alvarez N, Borrero R, Reyes F, Camacho F, Mohd N, Sarmiento M, et. al. (2009) Mecanismos de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente. *Vaccimonitor [online]*,18:18-25.
6. Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, et al. (2010) Identification of *katG* mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 1793-1799.
7. Araya P, Velasco. M., Tognarelli J, Arias F, Leiva T, Sccapatticio A, et al. (2011) Detection of genes associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Chile. *Rev Med Chil*, 139: 467-473.
8. Arráiz N, Bermúdez V, Urdaneta B (2005) Resistencia a drogas en *M. tuberculosis*: Bases moleculares. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 24:23-31.

9. Augustynowicz-Kopeć E, Jaworski A, Zwolska Z. (2002) Evaluation of Bactec MGIT 960 fluorescent method in diagnosis of tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol*, 70:450-457.
10. Bardarov S, Dou H, Eisenach K, Banaiee N, Ya S, Chan J, et al. (2003) Detection and drug-susceptibility testing of *M. tuberculosis* from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) system. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 45:53-61.
11. Basso LA, Zheng R, Musser JM, Jacobs WR, Blanchard JS. (1998) Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *J Infect Dis.*, 178: 769-775.
12. Betts, J. (2002) Transcriptomics and proteomics: tools for the identification of novel drug targets and vaccine candidates for tuberculosis. *IUBMB Life*, 53:239-242.
13. Bishop KS, Blumberg L, Trollip AP, Smith AN, Roux L, York DF, et al. (2001) Characterisation of the *pncA* gene in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Gauteng, South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*, 5: 952-957.
14. Bobadilla-del-Valle M, Ponce-de-León A, Arenas-Huertero C, Vargas-Alarcon G, Kato-Maeda M, Small PM, et al. (2001) *rpoB* Gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism. *Emerg Infect Dis*, 7:1010-1013.
15. Caminero, Luna JA. (2003). Guía de la tuberculosis para médicos especialistas. París: Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER). Disponible en http://www.tbrieder.org/publications/books_spanish/specialists_sp.pdf
16. Carmona O, Gómez M, Montes T, Marcano C, Mariño F. (1997). *Microbiología médica de Divo*, Género *Mycobacterium*: *M tuberculosis* y otras especies. *McGraw-Hill Interamericana*, Venezuela:203-211.
17. Castellanos J M, García A M. (2011). Situación actual de la Tuberculosis en el mundo, México y Veracruz, Avances y desafíos. Centro Nacional de Programas

Preventivos y Control de enfermedades. Secretaria de Salud. Disponible en <http://web.ssaver.gob.mx/saludpublica/files/2012/03/01-SIMPOSIO-VERACRUZ.pdf>. [Consulta: 12 mayo 2012].

18. Caviades L, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, et al. (2000) Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol.*, 38:1203-1208.
19. Caws M, Drobniewski FA. (2001) Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. *Ann N Y Acad Sci*, 953:138-145.
20. Chaoui I, Sabouni R, Kourout M, Jordaan AM, Lahlou O, Elouad R, et al. (2009) Analysis of isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Morocco. *J Infect Dev Ctries.* 3, 278-284.
21. Cheng X, Zhang J, Yang L, Xu X, Liu J, Yu W, et al. (2007). A new Multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*, 70:301-305.
22. Estrada-Cuzcano A, Sandoval J, Guevara-Fujita M y Fujita R (2005) Use of the SSCP technique to detect point mutations on human mtDNA. *Rev. Peru. Biol*, 12:349- 358.
23. Farga, V. (2004) La conquista de la tuberculosis. *Rev. chil. enferm. Respir*, 20:101-108.
24. Fuentes, J. (2008). Reunión Responsables Programa de Tuberculosis México: Secretaría de Salud de México.
25. García RR, Lado FL, Túnez BV, Pérez DML, Cabarcos OA, (2003) Tratamiento actual de la tuberculosis. *Ann Med Inter*, 20:43-52.
26. Garza-González E, González GM, Rentería A, Cruz-Pulido W, Rivera G, Bocanegra-García V. (2010) A pyrosequencing method for molecular monitoring of regions in the *inhA*, *ahpC* and *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect*, 16: 607-612.

27. Guevara A, Juárez A, Zenteno R. (2003) Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas. *MedUNAB*, 6:46-51.
28. Harris, E. (1998). *A low- cost approach to PCR*. Appropriate transfer of biomolecular techniques. ed. N. Kadir, *Oxford University Press*, USA:118-132.
29. Hazbón MH (2004) Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. *Biomedica* , 24:149-162.
30. Hazbón MH, Brimacombe M., Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. (2006) Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 2640-2649.
31. Hazbón MH, Guarín N, Ferro BE, Rodríguez AL, Labrada LA, Tovar R, et al. (2003) Photographic and luminometric detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*, 41:4865-4869.
32. Helb D, Jones M, Story C, Boehme E, Wallace E, Ho K., et al (2010) Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol*, 48: 229-237.
33. Hernández JE, Murcia M, de la Hoz F. (2008) Molecular epidemiology of tuberculosis in Bogotá in clinical isolates obtained over an 11-year period. *Rev Salud Publica (Bogota)*, 10: 126-136.
34. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. (2007) Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 45:2635-2640.
35. Ho YM, Sun. YJ, Wong SY, Lee AS. (2009) Contribution of *dfrA* and *inhA* mutations to the detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 4010-4012
36. Hudelson, P (1996) Gender differentials in tuberculosis: the role of socio-economic and cultural factors. *Tuber Lung Dis*, 77: 391-400.

37. Instituto Nacional de Salud Pública. (2006) Tuberculosis pulmonar: Diagnóstico y tratamiento. *PME Boletín de práctica médica efectiva*:1-6.
38. Kim SY, Park YJ, Kim WI, Lee SH, Ludgerus CC, Kang SJ, et al. (2003) Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from South Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 47:497-502.
39. Kocagoz T, Saribas. Z, Alp A. (2005) Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 43:6015-6919.
40. Lee H, Cho S, Bang HE, Lee JH, Bai GH, Kim SJ, et al. (2000) Exclusive mutations related to isoniazid and ethionamide resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 4: 441-447.
41. Lee KW, Lee JM, Jung KS. (2001) Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J Korean Med Sci*, 16: 537-543.
42. Marín M, Garcia de Viedma D, Ruíz-Serrano MJ, Bouza E. (2004) Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:4293-4300.
43. Martin A, Panaiotov S, Portaels F, Hoffner S, Palomino JC, Angeby K. (2008) The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, 62:56-64.
44. Marttila HJ, Soini. H, Eerola E, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, et al. (1998) A Ser315Thr substitution in *KatG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrob Agents Chemother*, 42: 2443-2445.
45. McCammon MT, Gillette J, Thomas DP, Ramaswamy SV, Rosas II, Graviss EA, et al. (2005) Detection by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of *pncA*

- Mutations Associated with Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from the United States-Mexico Border Region. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 2210-2217.
46. Mendes NH, Melo F, Santos AC, Pandolfi JR, Almeida EA, Cardoso RF, et al. (2011) Characterization of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in São Paulo city, Brazil. *BMC Res Notes*, 4:1-8.
 47. Miller N, Infante S, Cleary T (2000) Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol*, 38:1915-1919.
 48. Mo L, Zhang W, Wang J, Weng XH, Chen S, Shao LY, et al. (2004) Three-dimensional model and molecular mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and isoniazid-resistant *KatG* mutants. *Microb Drug Resist*, 10:269-279.
 49. Molina-Torres CA, Moreno TE, Ocampo-Candiani J, Rendon A, Blackwood K, Kremer K, et al. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes in Monterrey, Mexico. *J Clin Microbiol*, 48: 448-455.
 50. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, et al. (2006) Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med*, 355:1539-1550.
 51. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. (2005) A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 5:1-9.
 52. Morlock GP, Metchock B, Sikes D, Crawford JT, Cooksey RC (2003) *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:3799-3805.
 53. Nava O, Prieto L. (2001) Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis pulmonar: revisión. *Kasmera*, 29:51-63.
 54. Nguyen L, Thompson CJ. (2006) Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. *Trends Microbiol*, 14:304-312.

55. OPS/ OMS. Organización Panamericana de Salud /Organización Mundial de Salud. (2009). Tuberculosis in the Region of the Americas 2009. Regional Report: Epidemiology, Control and Financing. Pan American Health Organization, Washington DC, 2011. Disponible en http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16315&Itemid= [Consulta: 12 mayo 2012].
56. Otu J, Antonio M, Cheung YB, Donkor S, De Jong BC, Corrah T, et al. (2008) Comparative evaluation of BACTEC MGIT 960 with BACTEC 9000 MB and LJ for isolation of mycobacteria in The Gambia. *J Infect Dev Ctries*, 2:200-205.
57. Palma-Nicolás JP, Bocanegra-García V. (2007) Innovative strategies to diagnose and monitor tuberculosis patients. *Arch Bronconeumol*, 43:225-232.
58. Palomino JC, Martín A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. (2002) Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46:2720-2722.
59. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. (2009) Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 56:103-111.
60. Parashar D, Chauhan D, Sharma VD, Katoch VM. (2006) Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res*, 124:385-398.
61. Park, W J, Simon D. (2004). Molecular Genetics of Bacteria. Mutation and Variation. *UK John Wiley & Sons Ltd, USA*:37-41.
62. Portugal I, Barreiro L., Moniz-Pereira J, Brum L. (2004) *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 2736-2738
63. Quirós-Roldán E, Airoidi M, Moretti F, Carosi G (2001) Bases moleculares de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Diagn Biol*, 50:200-203.

64. Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, Yang Z, Cave MD, Graviss EA. (2004) Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J Med Microbiol*, 53: 107-113.
65. Ristow M, Möhlig M, Rifai M, Schatz H, Feldmann K, Pfeiffer A. (1995) New isoniazid/ethionamide resistance gene mutation and screening for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Lancet*, 346: 502-503.
66. Rivoire N, Ravololonandriana P, Rasolonavalona T, Martin A, Portaels F, Ramarokoto H, et al. (2007) Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis*. 11:683-688.
67. Rodrigues Vde F, Telles. MA., Ribeiro MO, Cafrune PI, Rossetti ML, Zaha A. (2005) Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 49: 444-446.
68. Said S, Becerril P, Molina G, Barrios H (2005) Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes. *Enf Emerg*, 7:13-19.
69. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, et al. (2009) Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. *PLoS Med*, 6:132-136.
70. Secretaria de Salud (1999-2010) a. Dirección General de Epidemiología (DGE). Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). Anuarios de morbilidad Incidencia de Tuberculosis Respiratoria (A15, A16) en la República Mexicana. 1999-2010. Disponible en <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html> [Consulta: 01 abril 2009]
71. Secretaría de Salud (1999-2010) b. Dirección General de Información en Salud (DGIS). Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). Base de datos de defunciones 1979-2010. Defunciones por Tuberculosis Respiratoria (A15, A16) en la República Mexicana. 1999-2010. [México]. Disponible en <http://www.sinais.salud.gob.mx> [Consulta: 01 abril 2009].

72. Secretaría de Salud. (2010). Guía para la Atención de Personas con Tuberculosis Resistente a Fármacos. México. Disponible en <http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/Farmacorresistencia/guia_tb_mfr_ops_2.pdf > [Consulta: 11 febrero 2011].
73. Secretaría de Salud. (1993) NOM-006-SSA2-1993. Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.
74. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, et al. (1997) Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 540-543.
75. Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, et al (2007) Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 45:179-192.
76. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, et al. (2011). Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 33: 1630-1632.
77. Sierra C, Sánchez E, Henao S, Saavedra A. (2008) Determining the susceptibility to first-line drugs in *M. tuberculosis* isolates using the mycobacteria growth indicator tube method. *Rev.fac.med.unal*. 56:11-20.
78. Somoskovi A, Dormandy J, Parsons LM, Kaswa M, Goh KS, Rastogi N, et al.. (2007) Sequencing of the *pncA* gene in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has important diagnostic applications: Identification of a species-specific *pncA* mutation in "*Mycobacterium canetti*" and the reliable and rapid predictor of pyrazinamide resistance. *J Clin Microbiol*, 45:595-599.
79. Somoskovi A, Parsons L, Salfinger M. (2001) The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*, 2:164-168.
80. Sreevatsan S, Stockbauer KE, Pan X, Kreiswirth BN, Moghazeh SL, Jacobs WR, et al. (1997) Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 41:1677-1681.

81. Starks AM, Gumusboga. A, Plikaytis BB, Shinnick TM, Posey JE. (2009) Mutations at *embB* codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 53: 1061-1066.
82. Tapia-Conyer, R. (2006).El Manual de Salud Pública, Unidad II. Tuberculosis ed. E. Intersistemas. México:469-505.
83. Tudó G, Rey E, Borrell S, Alcaide F, Codina G, Coll P, et al. (2010) Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *J Antimicrob Chemother*, 65: 2341-2346.
84. Ugarte-Gil C, Ponce M, Moore D (2008) Artículo de revisión: Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Med Per*, 25:171-175.
85. UniProtKB/Swiss-Prot, Reviewed. (2011a). Q08129 (CATA_MYCTU) Disponible en <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q08129>>[Consulta: 16 enero 2010].
86. UniProtKB/Swiss-Prot, Reviewed. (2011b). P0A5Y6 (INHA_MYCTU). Disponible en <<http://www.uniprot.org/uniprot/P0A5Y6>> [Consulta: 16 enero 2010].
87. UniProtKB/Swiss-Prot, Reviewed. (2011c). P0A680 (RPOB_MYCTU).Disponible en <<http://www.uniprot.org/uniprot/P0A680>>_[Consulta: 16 enero 2010].
88. UniProtKB/TrEMBL, Unreviewed. (2011a) Q745M3 (Q745M3_MYCPA). Disponible en <http://www.uniprot.org/uniprot/Q745M3> [Consulta: 16 enero 2010].
89. UniProtKB/TrEMBL, Unreviewed. (2011b) Q93SP7 (Q93SP7_MYCBO). Disponible en <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q93SP7>> [Consulta: 16 enero 2010].
90. Van Deun A, Martin A, and Palomino J.C. (2010) Diagnosis of drug-resistant tuberculosis: reliability and rapidity of detection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 14: 131-140.
91. Van Rie A, Page-Shipp L, Scott L, Sanne I, and Stevens W (2010) Xpert® MTB/RIF for point-of care diagnosis of TB in high- HIV burden, resource-limited countries: hype or hope?. *Expert Rev. Mol. Diagn*, 10: 937-946.

92. Van Soolingen D, de Haas PEW, Soll DR, van Embden JD. (1991) Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 29:2578-2586.
93. Victor TC, Pretorius GS, Felix JV, Jordaan AM, Van Helden PD, Eisenach KD. (1996) *katG* mutations in isoniazid-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* are not infrequent. *Antimicrob Agents Chemother*, 40: 1572.
94. Wada T, Maeda S, Tamaru A, Imai S, Hase A, Kobayashi K. (2004) Dual-probe assay for rapid detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 42:5277-5285.
95. WHO (2006) World Health Organization. International standards for tuberculosis care (ISTC) World Health Organization. Disponible en <http://www.who.int/tb/publications/2006/istc_report_shortversion.pdf> [Consultado: 16 enero 2010].
96. WHO (2007) World Health Organization. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the world. Fourth Global Report. WHO 2008 ed. WHO Disponible en <http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_HTM_TB_2008.394_eng.pdf>. [consultado 28 de Mayo 2008]
97. WHO (2010) a. World Health Organization. Tuberculosis. Fact sheet No104. World Health Organization. Disponible en <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>> [consultado 9 de Diciembre 2010]
98. WHO (2010) b. World Health Organization. Treatment of Tuberculosis: guidelines for national programmes. Switzerland. Disponible en <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547833_eng.pdf> [consultado 9 de Diciembre 2010]
99. WHO (2010) c WHO: Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response; in WHO (ed), 2010. Available in: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf.

100. WHO (2011). World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO Report 2011; in WHO (ed), 2011. Available in: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf
101. Wu XQ, Liang JQ, Zhang JX, Lu Y, Li HM, Zhang GY, et al. (2005) Detection and evaluation of the mutations of *embB* gene in ethambutol-susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Chin Med J*, 118:1739-1741.
102. Yajko DM, Madejj J, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Gee B, et al. (1995) Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 33:2324-2327.
103. Zenteno-Cuevas R, Zenteno. JC, Cuellar A, Cuevas B, Sampieri CL, Riviera JE, et al. (2009) Mutations in *rpoB* and *katG* genes in *Mycobacterium* isolates from the Southeast of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104:468-472.
104. Zenteno, R. (2006). Tópicos Selectos de la Salud Pública. Tuberculosis: realidades y perspectivas. ed. I. d. S. Pública. *Universidad Veracruzana*. Xalapa, Veracruz, 9-28.
105. Zhang H, Bi LJ, Li CY, Sun ZG, Deng JY, Zhang XE. (2009) Mutations found in the *pncA* gene of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical pyrazinamide-resistant isolates from a local region of China. *J Int Med Res.*, 37: 1430-1435.
106. Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL, et al. (2005) Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol*, 43:5477-5482.
107. Zhang Y, Mitchison D. (2003) The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*, 7:6-21.

11. ANEXOS

		S	I	R	E	P	MDR	≥ 3 Resistencias
Edad	Positivos	44.8 (±15.0)	45.0 (±14.5)	44.7 (±15.4)	46.5 (±15.4)	46.3 (±17.2)	44.9 (±14.7)	46.0 (±14.6)
	Negativos	44.2 (±16.9)	42.8 (±20.3)	44.4 (±16.1)	42.5 (±15.7)	43.6 (±14.6)	44.1 (±17.3)	42.8 (±16.9)
	Valor de p	0.85 T	0.37 KW	0.89 T	0.14 T	0.34 T	0.76 T	0.25 T
Sexo F	Total (136)	66.9%	83.1%	69.9%	53.7%	37.5%	66.2%	61.5%
	Positivos (48)	75.0%	95.8%	81.3%	58.3%	41.7%	79.2%	78.7%
	Negativos (88)	62.5%	76.1%	63.3%	51.1%	35.2%	59.1%	52.3%
	OR	1.8	7.2	2.5	1.3	1.3	2.6	3.4
	Valor de p	0.19 Y	<0.01 F	0.05 Y	0.53 Y	0.57 Y	0.02 Y	<0.01 Y
Jurisdicción	Valor de p	0.21	0.88	0.67	0.71	0.4	0.71	0.94
DM	Total (136)	66.9%	83.1%	69.9%	53.7	37.5%	66.2%	61.5%
	Positivos (40)	65.0%	95.0%	75.0%	47.5	37.5%	75.0%	67.5%
	Negativos (96)	67.7%	78.1%	67.7%	56.3	37.5%	62.5%	67.5%
	OR	0.8	5.3	1.43	0.7	1	1.8	1.4
	Valor de p	0.91 Y	0.01 F	0.52 Y	0.45 Y	0.84 Y	0.22 Y	0.46 Y
Anemia	Total (136)	66.9%	83.1%	69.9%	53.7%	37.5%	66.2%	61.5%
	Positivos (5)	80.0%	100.0%	100.0%	100.0%	60.0%	100.0%	100.0%
	Negativos (131)	66.4%	82.4%	68.7%	51.9%	36.6%	64.9%	60.0%
	OR	2.0	No definible	No definible	No definible	2,6	No definible	No definible
	Valor de p	0.46 F	0.38 F	0.16 F	0.04 F	0.27 F	0.12 F	0.08 F
Desnutrición	Total (136)	66.9%	83.1%	69.9%	53.7%	37.5%	66.2%	61.5%
	Positivos (9)	66.7%	88.9%	66.7%	66.7%	33.3%	66.7%	66.7%
	Negativos (127)	66.9%	82.7%	70.1%	52.8%	37.8%	66.1%	61.7%
	OR	1.0	1.6	0.85	1.8	0.82	1	1.2
	Valor de p	0.62 F	0.53 F	0.54 F	0.32 F	0.54 F	0.64 F	0.52 F
Alcoholismo	Total (136)	66.9%	83.1%	69.9%	53.7%	37.5%	66.2%	61.5%
	Positivos (18)	55.6%	88.9%	72.2%	66.7%	33.3%	72.2%	61.1%
	Negativos (118)	68.6%	82.2%	69.5%	51.7%	38.1%	65.3%	61.5%
	OR	0.6	1,7	1.14	1.8	0.8	1.4	0.98
	Valor de p	0.40 Y	0.37 F	0.52 F	0.35 Y	0.89 Y	0.75 Y	0.82 Y
Drogadicción	Total (136)	66.9%	83.1%	69.9%	53.7%	37.5%	66.2%	61.5%
	Positivos (6)	83.3%	66.7%	66.7%	100.00%	33.3%	66.7%	66.7%
	Negativos (130)	66.2%	83.8%	70.0%	51.50%	37.7%	66.2%	61.2%
	OR	2.5	0.38	0.85	No definible	0.82	1	1.2
	Valor de p	0.35 F	0.26 F	0.58 Y	0.02 F	0.59 F	0.66 F	0.57 F
Retratamiento	Total (131)	67.2%	82.4%	71.0%	54.20%	37.4%	67.2%	62.3%
	Positivos (100)	70.0%	82.0%	70.0%	53.00%	37.0%	68.0%	60-6%
	Negativos (31)	58.1%	83.9%	74.2%	58.10%	38.7%	64.5%	67.7%
	OR	1.7	0.9	0.81	0.81	0.93	1.17	0.73
	Valor de p	0.30 Y	0.97 F	0.82 Y	0.77 Y	0.96 Y	0.88 Y	0.61 F
Meses de evolución	Positivos (91)	44.0 (±61.0)	44.0 (±58.7)	50.3 (±76.1)	48.0 (±66.8)	55.4 (±75.0)	47.2 (±62.3)	47.3 (±64.1)
	Negativos (45)	43.4 (±78.9)	42.8 (±98.96)	28.3 (±34.2)	38.9 (±67.9)	36.8 (±61.3)	37.2 (±76.4)	39.0 (±72.8)
	Valor de p	0.37 KW	0.29 KW	0.35 KW	0.44 T	0.12 T	0.42 T	0.50 T

Y) Chi cuadrado con corrección de Yates, F) Test exacto de Fisher, T) Estadístico T, KW) Test de Kruskal-Wallis

1: Asociación estadística entre variables epidemiológicas y resistencias farmacológicas

		<i>rrS</i> 513C-T	<i>katG</i> S531N,T	<i>inhA</i> -15 C-T	<i>rpoB</i> S531L,W	<i>embB</i> M306V,I	<i>pncA</i> L120P
Edad	Con mutación	50.0 (±7.9)	47.0 (±13.5)	42.8 (±16.7)	45.2 (±15.9)	50.2 (±11.9)	36.1 (±17.6)
	Sin mutación	44.5 (±16)	43.4 (±16.1)	46.2 (±14.3)	44.9 (±15.4)	45.2 (±15.6)	50.2 (±14.9)
	Valor de p	0.45 T	0.29 T	0.60 T	0.93 T	0.21 T	0.03 T
Sexo F	Total	8.9%	40.0%	7.8%	67.6%	32.8%	16.7%
	Con mutación	16.0%	35.3%	9.1%	62.5%	33.3%	6.3%
	Sin mutación	3.2%	37.5%	6.8%	71.8%	32.4%	23.1%
	OR	5.7	0.7	1.3	0.6	1	0.22
	Valor de p	0.11 F	0.61 Y	0.51 F	0.56 Y	0.83 Y	0.16 F
Jurisdicción	Valor de p	0.89	0.49	<0.01	0.67	0.66	0.29
DM	Total	8.9%	40.0%	7.8%	67.6%	32.8%	16.7%
	Con mutación	15.8%	37.9%	10.3%	58.3%	11.8%	8.3%
	Sin mutación	5.4%	41.2%	6.3%	72.3%	40.9%	20.0%
	OR	3.2	0.9	1.7	0.5	0.2	0.4
	Valor de p	0.20 F	0.96 Y	0.40 F	0.35 Y	0.02 F	0.33 F
Anemia	Total	8.9%	40.0%	7.8%	67.6%	32.8%	16.7%
	Con mutación	0.0%	25.0%	0.0%	33.1%	40.0%	33.3%
	Sin mutación	9.3%	40.8%	8.1%	69.1%	32.1%	15.4%
	OR	No definible	0.5	No definible	0.2	1.4	2.7
	Valor de p	0.82 F	0.47 F	0.78 F	0.24 F	0.53 F	0.43 F
Desnutrición	Total	8.9%	40.0%	7.8%	67.6%	32.8%	16.7%
	Con mutación	20.0%	50.0%	0.0%	100.0%	60.0%	33.3%
	Sin mutación	7.8%	39.2%	8.2%	65.7%	30.4%	15.4%
	OR	2.9	1.5	No definible	No definible	3.4	2.7
	Valor de p	0.38 F	0.45 F	0.71 F	0.20 F	0.19 F	0.43 F
Alcoholismo	Total	8.9%	40.0%	7.8%	67.6%	32.8%	16.7%
	Con mutación	0.0%	50.0%	10.0%	81.8%	27.3%	60.0%
	Sin mutación	10.0%	38.6%	7.5%	65.0%	34.0%	10.8%
	OR	No definible	1.6	1.4	2.4	0.7	12.3
	Valor de p	0.55 F	0.35 F	0.60 F	0.23 F	0.48 F	0.02 F
Drogadicción	Total	8.9%	40.0%	7.8%	67.6%	32.8%	16.7%
	Con mutación	25.0%	100.0%	0.0%	100.0%	60.0%	50.0%
	Sin mutación	7.7%	37.7%	8.0%	66.2%	30.4%	15.0%
	OR	4.0	No definible	No definible	No definible	3.4	5.6
	Valor de p	0.32 F	0.06 F	0.85 F	0.30 F	0.19 F	0.30 F
Retratamiento	Total	8.9%	39.5%	8.1%	68.1%	33.3%	17.5%
	Con mutación	8.3%	38.2%	5.5%	70.6%	34.1%	13.3%
	Sin mutación	9.1%	42.9%	15.8%	61.1%	31.3%	30.0%
	OR	1.1	0.8	0.3	1.5	1.1	0.4
	Valor de p	0.71 F	0.91 F	0.17 F	0.65 Y	0.91 Y1	0.33 F
Meses de evolución	Con mutación	41.7 (±26.4)	51.8 (±75.4)	13.0 (±12.0)	57.0 (±91.9)	51.0 (±45.3)	15.0 (±11.8)
	Sin mutación	46.5 (±65.9)	34.6 (±44.0)	48.0 (±61.8)	37.9 (±45.3)	85.0 (±78.2)	72.0 (±85.7)
	Valor de p	0.88 T	0.39 KW	0.08KW	0.48KW	0.43KW	0.10KW

Y) Chi cuadrado con corrección de Yates, F) Test exacto de Fisher, T) Estadístico T, KW) Test de Kruskal-Wallis

2: Asociación estadística entre variables epidemiológicas y mutaciones

		S	I	R	E	P	MDR	≥ 3 Resistencias
S	Total (136)		83.1%	69.9%	53.7%	37.5%	66.2%	61.5%
	Positivos (91)		87.9%	72.5%	54.9%	44.0%	71.4%	75.6%
	Negativos (45)		73.3%	64.4%	51.1%	24.4%	55.6%	33.3%
	OR		2.6	1.4	1.1	2.4	2	6.1
	Valor de p		0.05 Y	0.44 Y	0.81 Y	0.04 Y	0.09 Y	<0.01 Y
I	Total (136)	66.9%		69.9%	53.7%	37.5%	66.2%	61.5%
	Positivos (113)	70.8%		79.6%	56.6%	42.5%	79.6%	73.5%
	Negativos (23)	47.8%		21.7%	39.1%	13.0%	0.0%	0.0%
	OR	2.6		14	2	4.9	No definible	No definible
	Valor de p	0.05 Y		<0.01 F	0.19 Y	<0.01 F	<0.01 F	<0.01 F
R	Total (136)	66.9%	83.1%		53.7%	37.5%	66.2%	61.5%
	Positivos (95)	69.5%	94.7%		63.2%	49.5%	94.7%	84.2%
	Negativos (41)	61.0%	56.1%		31.7%	9.8%	0.0%	7.5%
	OR	1.4	14		3.6	9	No definible	65.7
	Valor de p	0.44	<0.01 F		<0.01 Y	<0.01 F	<0.01 F	<0.01 F
E	Total (136)	66.9%	83.1%	69.9%		37.50%	66.20%	61.50%
	Positivos 73	68.5%	87.7%	82.2%		56.20%	82.20%	84.90%
	Negativos 63	65.1%	77.8%	55.6%		15.90%	47.60%	33.90%
	OR	1.1	2	3.6		6.7	5	11
	Valor de p	0.81 Y	0.19 Y	<0.01 Y		<0.01 Y	<0.01 Y	<0.01 Y
P	Total (136)	66.9%	83.1%	69.9%	53.7%		66.2%	61.5%
	Positivos (51)	78.4%	94.1%	92.2%	80.4%		92.2%	94.1%
	Negativos (85)	60.0%	76.5%	56.6%	37.6%		50.6%	41.7%
	OR	2.4	4.9	9	6.7		11.5	22.4
	Valor de p	0.04 Y	<0.01 F	<0.01 F	<0.01 Y		<0.01 F	<0.01 F

Y) Chi cuadrado con corrección de Yates, F) Test exacto de Fisher, T) Estadístico T, KW) Test de Kruskal-Wallis

3: Asociación estadística entre la resistencia a fármacos de primera línea SIREP

		S	I	R	E	P	MDR	≥ 3 Resistencias
rrS 513C-T	Total (56)		87.50%	75.0%	55.4%	46.4%	73.2%	76.8%
	S+ (5)		100.0%	80.0%	20.0%	20.0%	80.0%	100.0%
	S- (51)		86.3%	74.5%	58.8%	49.0%	72.5%	74.5%
	OR		No definible	1.3	0.2	0.3	1.5	No definible
	Valor de p		0.49 F	0.63 F	0.11 F	0.22 F	0.59 F	0.25 F
katG S531N,T	Total (80)	71.3%		80.0%	60.0%	50.0%	80.0%	76.3%
	I+ (32)	65.6%		90.6%	65.6%	65.6%	90.6%	90.6%
	I- (48)	75.0%		72.9%	56.3%	39.6%	72.9%	66.7%
	OR	0.6		3.6	1.5	2.9	3.6	4.8
	Valor de p	0.51 Y		0.04 F	0.54 Y	0.04 Y	0.04 F	0.01 F
inhA -15 C-T	Total (77)	66.2%		77.9%	58.4%	48.1%	77.9%	74.0%
	I+ (6)	83.3%		50.0%	33.3%	50.0%	50.0%	66.7%
	I- (71)	64.8%		80.3%	60.6%	47.9%	80.3%	74.6%
	OR	2.7		0.2	0.32	1	0.24	0.67
	Valor de p	0.33 F		0.11 F	0.19 F	0.6 F	0.11 F	0.49 F
rpoB S531L,W	Total (71)	67.6%	94.4%		66.2%	54.9%	94.4%	84.5%
	R+ (48)	54.2%	91.7%		64.6%	54.2%	91.7%	77.1%
	R- (23)	95.7%	100.0%		69.6%	56.5%	100.0%	100.0%
	OR	0.05	No definible		0.79	0.9	No definible	No definible
	Valor de p	<0.01 F	0.20 F		0.44 F	0.94 Y	0.20 F	<0.01 F
embB M306V,I	Total (61)	65.6%	86.9%	80.3%		55.7%	80.3%	83.6%
	E+ (20)	70.0%	100.0%	90.0%		45.0%	90.0%	100.0%
	E- (41)	63.4%	80.5%	75.6%		61.0%	75.6%	75.6%
	OR	1.3	No definible	2.9		0.5	2.9	No definible
	Valor de p	0.41 F	0.03 F	0.16 F		0.36 Y	0.16 F	0.01 F
pncA L120P	Total (42)	78.6%	97.6%	97.6%	85.7%		97.6%	97.6%
	P+ (7)	28.6%	100.0%	100.0%	100.0%		100.0%	100.0%
	P- (35)	88.6%	97.1%	97.1%	82.9%		97.1%	97.1%
	OR	0.05	No definible	No definible	No definible		No definible	No definible
	Valor de p	<0.01 F	0.83 F	0.83 F	0.30 F		0.83 F	0.83 F

Y) Chi cuadrado con corrección de Yates, F) Test exacto de Fisher, T) Estadístico T, KW) Test de Kruskal-Wallis

4: Asociación estadística entre mutaciones y resistencias farmacológicas.

		<i>rrS</i> 513C-T	<i>katG</i> S315N,T	<i>InhA</i> -15 C-T	<i>inhA</i> - 21,98,101	<i>rpoB</i> S526L,W	<i>rpoB</i> S531L,W	<i>embB</i> M306V,I	<i>embB</i> D328G	<i>pncA</i> K96R	<i>pncA</i> L120P
<i>rrS</i> 513C-T	Total (136)		23.5%	4.4%	66.7%	7.4%	35.3%	14.7%	1.5%	2.9%	5.1%
	Positivos (5)		80.0%	20.0%	0.0%	0.0%	20.0%	20.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Negativos (131)		21.4%	3.8%	72.7%	7.6%	35.9%	14.5%	1.5%	3.1%	5.3%
	OR		14.7	6.3	No def	No def	0.4	1.4	No def	No def	No def
	Valor de p		0.01 F	0.20 F	0.33 F	0.67 F	0.41 F	0.55 F	0.92 F	0.85 F	0.76 F
<i>katG</i> S3151N,T	Total (136)	3.7%		4.4	66.7%	7.4%	35.3%	14.7%	1.5%	2.9%	5.1%
	Positivos (32)	12.5%		12.5	0.0%	9.4%	68.8%	25.0%	0.0%	0.0%	21.9%
	Negativos (104)	1.0%		1.9	88.9%	6.7%	25.0%	11.5%	1.9%	3.8%	0.0%
	OR	14.7		7.2	No def	1.4	6.6	2.5	No def	No def	No def
	Valor de p	0.01 F		0.02 F	0.01 F	0.43 F	<0.01 F	0.05 F	0.58 F	0.33 F	<0.01 F
<i>inhA</i> -15 C-T	Total (136)	3.7%	23.5%			74.0%	35.3%	14.7%	1.5%	2.9%	5.1%
	Positivos (6)	16.7%	66.7%			0.0%	33.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Negativos (130)	3.1%	21.5%			77.0%	35.4%	15.4%	1.5%	3.1%	5.4%
	OR	6.3	7.2			No def	0.91	No def	No def	No def	No def
	Valor de p	0.20 F	0.02 F			0.62 F	0.64 F	0.37 F	0.91 F	0.83 F	0.73 F
<i>inhA</i> -121,98,101	Total (136)	8.3%	25.0%			33.3%	25.0%		16.7%	33.3%	
	Positivos (8)	0.0%	0.0%			50.0%	12.5%		25.0%	50.0%	
	Negativos (128)	1.0%	3.0%			0.0%	50.0%		0.0%	0.0%	
	OR	No def	No def			No def	0.14		No def	No def	
	Valor de p	0.33 F	0.01 F			0.14 F	0.23 F		0.42 F	0.14 F	
<i>rpoB</i> 526	Total (136)	3.7%	23.5%	4.4%	66.7%		35.3%	14.70%	1.50%	2.90%	5.10%
	Positivos (10)	0.0%	30.0%	0.0%	100.0%		0.0%	20.00%	20.00%	40.00%	0.00%
	Negativos (126)	4.0%	23.0%	4.8%	50.0%		38.1%	14.30%	0.00%	0.00%	5.60%
	OR	No def	1.4	No def	No def		No def	1.5	No def	No def	No def
	Valor de p	0.67 F	0.43 F	0.62 F	0.14F		0.01 F	0.44 F	< 0.01 F	< 0.01 F	0.57 F
<i>rpoB</i> S531L,W	Total (136)	3.7%	23.5%	4.4%	66.7%	7.4%		14.70%	1.50%	2.90%	5.10%
	Positivos (48)	2.1%	45.8%	4.2%	33.3%	0.0%		22.90%	0.00%	0.00%	14.60%
	Negativos (88)	4.5%	11.4%	4.5%	77.8%	11.4%		10.20%	2.30%	4.50%	0.00%
	OR	0.44	6.6	0.9	0.14	No def		2.6	No def	No def	No def
	Valor de p	0.41 F	<0.01 Y	0.64 F	0.23 F	0.01 F		0.04 X2	0.41 F	0.17 F	<0.01 F
<i>embB</i> M306V,I	Total (136)	3.7%	23.5%	4.4%		7.4%	35.3%		1.50%	2.90%	5.10%
	Positivos (20)	5.0%	40.0%	0.0%		10.0%	55.0%		0.00%	0.00%	5.00%
	Negativos (116)	3.4%	20.7%	5.2%		6.9%	31.9%		1.70%	3.40%	5.20%
	OR	1.4	2.5	No def		1.5	26.0%		No def	No def	0.96
	Valor de p	0.55 F	0.06 X2	0.37 F		0.44 F	0.04 X2		0.72 F	0.52 F	0.68 F
<i>embB</i> D328G	Total (136)	3.7%	23.5%	4.4%	66.7%	7.4%	35.3%	14.70%		2.90%	5.10%
	Positivos (2)	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	100.0%	0.0%	0.00%		100.0%	0.00%
	Negativos (134)	3.7%	23.9%	4.5%	60.0%	6.0%	35.8%	14.90%		1.50%	5.20%
	OR	No def	No def	No def	No def	No def	No def	No def		No def	No def
	Valor de p	0.92 F	0.58 F	0.91 F	0.42 F	>0.01 F	0.41 F	0.72 F		<0.001 F	0.89 F
<i>pncA</i> K96R	Total (136)	3.7%	23.5%	4.4%	66.7%	7.4%	35.3%	14.70%	1.50%		5.1%
	Positivos (4)	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	100.0%	0.0%	0.00%	50.00%		0.0%
	Negativos (132)	3.8%	24.2%	4.5%	50.0%	4.5%	36.4%	15.20%	0.00%		5.3%
	OR	No def	No def	No def	No def	No def	No def	No def	No def		No def
	Valor de p	0.85 F	0.33 F	0.83 F	0.14 F	<0.01 F	0.17 F	0.52 F	< 0.001 F		0.80 F
<i>pncA</i> L120P	Total (136)	3.7%	23.5%	4.4%		7.4%	35.3%	14.70%	1.50%	2.9%	
	Positivos (7)	0.0%	100.0%	0.0%		0.0%	100.0%	14.30%	0.00%	3.1%	
	Negativos (129)	3.9%	19.4%	4.7%		7.8%	31.8%	14.70%	1.60%	0.0%	
	OR	No def	No def	No def		No def	No def	0.96	No def	No def	
	Valor de p	0.76 F	<0.01 F	0.72 F		0.57 F	<0.01 F	0.68 F	0.89 F	0.80 F	

5: Asociación estadística entre mutaciones

6: Artículo de Revisión



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Tuberculosis drogoresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos

Betzaida Cuevas-Córdoba^{a,b,*} y Roberto Zenteno-Cuevas^a

^aLaboratorio de Ecología y Salud, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

^bInstituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de marzo de 2009

Aceptado el 14 de diciembre de 2009

On-line el 9 de abril de 2010

Palabras clave:

Tuberculosis

Drogoresistencia

Diagnóstico

RESUMEN

Pese a que la tuberculosis (TB) viene acompañando a la humanidad desde el neolítico, ésta se mantiene como un serio problema de salud pública, agravado en los últimos años por el fenómeno de la resistencia a los antibióticos.

La OMS establece que el diagnóstico de la tuberculosis drogoresistente (TB-DR) es fundamental para su control y al mismo tiempo considera que los procedimientos diagnósticos tradicionales han llegado a un límite resolutivo. Ante este crítico escenario, el entendimiento de los mecanismos moleculares que explican el fenómeno de la TB-DR, combinado con novedosas técnicas moleculares, están permitiendo desarrollar de toda una nueva generación de procedimientos diagnósticos de TB-DR.

Sin embargo, ¿cuáles son estos mecanismos genéticos generadores de TB-DR? y ¿cuáles son las características, ventajas y limitaciones de estas nuevas metodologías diagnósticas? son las preguntas que se pretenden responder con el presente trabajo.

© 2009 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Drug resistant tuberculosis: molecular mechanisms and diagnostic methods

ABSTRACT

Drug resistant tuberculosis: Molecular mechanisms and diagnostic methods.

Despite the fact that Tuberculosis (TB) has been found in humans since the Neolithic Age, it still remains serious public health problem, increased in the last few years due to the phenomenon of drug resistance (DR).

The World Health Organization (WHO) established that the diagnosis of tuberculosis drug resistance (DR) is essential for its control, and at the same time considers that the traditional diagnostic procedures have reached their limit. In view of this critical scenario, the understanding of the molecular mechanisms that explain the phenomenon of the TB-DR, in combination with novel techniques in molecular biology, are allowing a new generation of diagnostic procedures to be developed for TB-DR.

However, this work sets out to answer the questions of what these molecular mechanisms TB-DR are, as well as their characteristics, advantages and limitations of these new diagnostic methodologies.

© 2009 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La TB es una enfermedad emergente causada por bacterias del género *Mycobacterium*. De acuerdo a la OMS en 2007, se reportaron 9,27 millones de casos nuevos y 1,78 millones de defunciones. Se estiman 13,7 millones de casos prevalentes^{1,2}.

Uno de los factores que dificultan el manejo y control clínico de la TB a nivel mundial es la drogoresistencia, la OMS estima que el 20% de los casos de TB son resistentes a un antibiótico (TB-DR) y el 5,3% son resistentes a isoniacida y rifampicina (TB-MDR)³.

De manera general, los bacilos de *Mycobacterium* desarrollan mutaciones espontáneas en genes específicos. Estos mutantes son seleccionados tras la exposición a un tratamiento farmacológico mal aplicado, pasan a constituir la población microbiana predominante y son causa de fracaso clínico^{4,5}. Por sus implicaciones terapéuticas y pronósticas, resultan especialmente relevantes las cepas TB multidrogoresistente y las denominadas TB extensamente resistentes, es decir, con resistencia a isoniacida, rifampicina, alguna fluoroquinolona y un antibiótico inyectable de segunda línea^{1,3}.

Tradicionalmente, el diagnóstico de la TB-DR requiere de 4–9 semanas para ser confirmatorio, lo cual permite el contagio de los contactos del paciente con TB-DR y favorece su dispersión^{6–7}.

En función de lo anterior, los últimos años han evidenciado la aparición nuevos métodos diagnósticos fundamentados en el

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: betcuevas@uv.mx, betsaida_200@hotmail.com

(B. Cuevas-Córdoba)

cultivo de *Mycobacterium* en medio líquido, con una marcada reducción de los tiempos diagnósticos, alta especificidad y economía. Por otra parte, la identificación de los mecanismos moleculares y las mutaciones en genes asociados al fenómeno de resistencia, así como el empleo de nuevas técnicas en biología molecular, han permitido desarrollar novedosos métodos diagnósticos de TB-DR, específicos y rápidos. Sin embargo, poseen limitaciones que requieren de un adecuado análisis, si es que se desean incorporar en los programas de lucha contra TB.

El objetivo de este trabajo es hacer una descripción de los mecanismos moleculares responsables de resistencia a fármacos de primera línea en *Mycobacterium tuberculosis* y de los métodos diagnósticos desarrollados para su detección.

Mecanismos moleculares generadores de drogaresistencia a fármacos de primera línea

La «isoniacida» es un potente fármaco antituberculoso y bactericida que se utiliza contra la TB desde 1952⁵, actúa específicamente contra bacterias que se encuentran en fase de replicación activa⁸. Su mecanismo de acción aún no está del todo aclarado, pero se sugiere que la isoniacida se transforma en su principio activo gracias a la enzima catalasaperoxidasa, inhibiendo la síntesis de ácido micólico de la pared bacteriana, lo cual permite que el microorganismo sea susceptible a la acción de radicales de oxígeno reactivo y a otros elementos externos de respuesta del huésped^{5,8} (tabla 1).

El gen *katG* codifica para la enzima catalasa-peroxidasa. La presencia de mutaciones o deleciones en este gen se ha relacionado con el 60% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a isoniacida^{5,9}. El *katG* tiene un tamaño de 1.771 pares de bases (pb); no obstante, del 30-65% de las mutaciones se localizan en el

codón 315 Ser⁸, el cual cambia a Thr, Asn o Arg¹⁰; otras mutaciones de menor frecuencia se han reportado en los codones 300, 321, 418, 463, 501, 525, 587 y 700^{11,12} (tabla 1).

La 2.ª causa de resistencia a isoniacida se explica por mutaciones que afectan al gen *inhA* y con mayor frecuencia a su regulador^{13,14}, el cual codifica para la proteína *inhA*, responsable de la producción de ácidos grasos^{5,9}; recientemente, se ha propuesto a este gen como el responsable de la coresistencia a isoniacida y etionamida⁸. Las mutaciones en los genes *katG* e *inhA* están asociadas al 70-80% de los aislados resistentes a isoniacida⁸; pero alrededor del 15-25% de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a este fármaco poseen el genotipo silvestre tanto en el gen *katG* como *inhA*⁵, por lo cual se piensa debe existir otro mecanismo de resistencia.

En este sentido, se ha observado que un 15% de cepas resistentes a isoniacida presentan mutaciones en el locus *kasA*¹⁵, lo cual implica que otro posible objetivo de isoniacida es la proteína *kasA*, involucrada en el mecanismo de elongación de los ácidos grasos⁵. También se han reportado con menor frecuencia mutaciones involucradas en la adquisición de resistencia a isoniacida en el gen *oxyR-ahpC*^{4,8,9}.

La «rifampicina» es otro fármaco importante, que debido a su fuerte actividad bactericida ha sido empleado desde 1970^{5,8}; desafortunadamente, su mala administración ha generado un incremento considerable en cepas resistentes⁸.

Respecto a su mecanismo de acción, la rifampicina se une a la ARN polimerasa de la micobacteria e interfiere durante el proceso de replicación y síntesis de ácido nucleico^{5,8,16}. La ARN polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por cuatro subunidades: α , β , β' y σ ; codificadas por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, respectivamente. Se ha demostrado que mutaciones en *rpoB* producen cambios conformacionales en la subunidad β de la ARN polimerasa, disminuyendo la afinidad por rifampicina y otorgando resistencia al fármaco⁸, (tabla 1).

Tabla 1
Genes asociados a TB DR

Fármaco	Gen	Mecanismo de resistencia	Frecuencia de mutaciones	Mutaciones reportadas	Cita
Isoniacida	<i>katG</i>	Codifica para la enzima catalasa-peroxidasa, encargada de transformar la isoniacida en el principio activo, inhibiendo la síntesis del ácido micólico	50-68%	315 (Ser→Thr, Asn, Arg), 300 (Trp→Gly), 321 (Trp→Gly), 418 (Arg→Gln), 463 (Arg→Leu), 501 (Pro→Arg), 525 (Glu→Pro), 587 (Leu→Pro) y 700 (Ser→Pro)	8-11,60,61
	<i>inhA</i>	Codifica la síntesis de la proteína enoil ACP reductasa, implicada en la producción de ácidos grasos de la micobacteria	21-34%	94 (Ser→Ala), 21 (Ile→Thr,V), 258 (Ile→Thr)	12-15,60
Rifampicina	<i>rpoB</i>	Codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa, a la cual se une la rifampicina, interfiriendo en la síntesis del ácido nucleico en el proceso de replicación bacteriana	96-98%	región de 81 pb (507-533) 531 (Ser→Leu, Thr), 488 (Val→Ala), 511 (Leu→Pro), 512 (Ser→Thr), 513-516 (Gln,Phe,Mer,Asp→His), 513 (Gln→Leu), 514 (Phe→Val), 515-518 (Deletado), 516 (Asp→Val), 524-527 (Leu,Thr,His,Lis→Trp,Pro,Gln), 526 (His→Asp,Leu,Asn,Pro,Gln,Arg), 456 (Ser→Leu), 531 (Ser→Gln,Trp), 533 (Leu→Pro)	3-5,8,9, 15-20,60
		57(His→Asp)	5,20,21,60		
Pirazinamida	<i>pncA</i>	Codifica para la enzima pirazinaminidasa, la cual transforma la pirazinamida en ácido piracínico, resultando un pH ácido que parece ser el causante del efecto contra <i>M. Tuberculosis</i>	72-97%		
Estreptomina	<i>rpsL</i>	Codifica para la unidad ribosomal 512, al cual se une la estreptomina para inhibir la síntesis proteica	64-67%	43 (Lys→Arg, Thr), 88 (Lys→Gln, Arg, Thr)	5,8,24,60
	<i>rpsS</i>	Codifica para el ARNr 16S, al cual se une la estreptomina para inhibir la síntesis proteica	8-21%	516 (C→T), 1.400 (A→G), 1.539 (A→G)	60,61
Etambutol	<i>embB</i>	Codifica la síntesis de la enzima arabinosiltransferasa, relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular, lo cual incrementa la permeabilidad y la entrada en mayor cantidad de los otros medicamentos	47-65%	297 (Ser→Arg), 306 (Met→Ile, Leu, Val), 328 (Asp→Gly, Tyr), 330 (Phe→Val), 334 (Tyr→His), 406 (Gly→Ala, Asp), 497 (Gln→Lys, Arg), 745 (Gly→Asp), 959 (Asp→Ala), 1.000 (Mer→Arg), 1.024 (Asp→Asn)	3,8,23,47,60

ACP: proteína transportadora del acilo.

Pese a que el gen *rpoB* tiene un tamaño de 3,534 pb, el 96 o 97% de las mutaciones que causan resistencia a rifampicina están localizadas en una región de 81 pb^{8,10,13,16} entre los codones 507-533^{9,16} y consisten por lo general en mutaciones puntuales no sinónimas¹⁷. De acuerdo con los resultados de diversos estudios, en el 40-70% de los aislados, se observaron mutaciones puntuales en el codón 531 Ser^{5,8,16} por Leu (TCG → TTG) o por Thr (AGC → ACA)¹⁷. Del 32-36% de las cepas estudiadas mostraron cambios en el codón 526 His; y del 7-9% en el codón 516 Asp^{16,17}. También se han reportado mutaciones o deleciones de menor frecuencia en otros codones como: 498, 511-518, 524-527, 456, 531, 533¹⁸ (tabla 1). En los últimos años se han observado algunos aislados resistentes cuya mutación no se localiza en la región de 81 pb¹⁹, por lo cual se propone la existencia de mecanismos adicionales generadores de resistencia^{5,8}.

Las cepas resistentes a rifampicina presentan resistencia cruzada a drogas químicamente relacionadas o con sitios de acción similares dentro de la célula, como rifapentina y parcialmente a rifabutina y rifalacina²⁰.

Finalmente, el diagnóstico de resistencia a rifampicina es especialmente importante debido a su fuerte asociación con la resistencia a isoniácida, considerándose como un marcador importante de TB-MDR⁵.

El empleo de la «pirazinamida» se inició en el año de 1952, funciona específicamente contra bacilos semilantes que no son afectados por ningún otro medicamento antituberculoso. Una de sus principales ventajas es que disminuye el tiempo de tratamiento, debido a su sinergia con isoniácida y rifampicina; sin embargo, su principal desventaja radica en su alta especificidad en contra de *M. tuberculosis*, de manera que si la cepa infectante es diferente, como pudiera ser *Mycobacterium bovis*, el tratamiento no es efectivo^{5,8}.

Respecto a su mecanismo de acción, la pirazinamida es transformada por la enzima pirazinamidasa a su principio activo, ácido pirazinoico, el cual genera un pH ácido intrabacteriano, al parecer causante del efecto contra *M. tuberculosis*^{5,21} (tabla 1). La pirazinamidasa es codificada por el gen *pncA*, mutaciones en este gen explican el 80% de las cepas resistentes a este fármaco⁵. Para el caso particular de *M. bovis* en el codón 57 del gen *pncA* se ha identificado una mutación puntual (C → G), que resulta en la sustitución de His por Asp, suficiente para inactivar la enzima pirazinamidasa^{8,21} (tabla 1).

La «estreptomina» se descubrió en 1943, fue el primer fármaco con actividad antituberculosa probada, actúa específicamente en la forma extracelular de la micobacteria⁵. El mecanismo de acción de este fármaco se basa en su unión al ARN ribosomal (ARNr) con lo cual inhibe la síntesis proteica de la bacteria. La resistencia a este fármaco se asocia con mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs* (o *rns*), los cuales codifican respectivamente la síntesis de la subunidad proteica 12S y el ARNr 16S^{8,9}. El gen *rpsL* presenta mutaciones con mayor frecuencia, encontradas en los codones 43 (Lys → Arg y/o Thr) y 88 (Lys → Gln, Arg y/o Thr)⁹ (tabla 1). Al igual que ocurre con otros fármacos, en estreptomina, se cree que existen mecanismos adicionales de resistencia, en este caso probablemente relacionados con la permeabilidad de la pared y membrana bacteriana, ya que el 30% de las cepas resistentes no muestran mutaciones en los genes *rrs* o *rpsL*⁵.

El «etambutol» es otro fármaco empleado en contra de TB, se utilizó por 1.^a vez en 1961, tiene actividad bacteriostática, es un buen antimicobacteriano y solo actúa contra bacterias en fase de multiplicación activa⁵. Se recomienda para tratar infecciones diseminadas con bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium*, especialmente en personas infectadas con VIH, que cursan con DM, o con antecedentes de abandono o recaída^{8,22}. La probabilidad de resistencia es más baja que con otras drogas, por lo cual se incluye en la pauta básica de tratamiento primario en

los países con una tasa elevada de resistencia primaria a otro fármaco de primera línea²².

El mecanismo de acción de este medicamento no ha sido claramente definido, se cree que está relacionado con la interferencia en el metabolismo del ARNr, la síntesis de fosfolípidos, la síntesis de ácido micólico y la síntesis de polisacáridos de la pared celular bacteriana⁵. Evidencias experimentales y clínicas indican que el etambutol ejerce un efecto sinérgico con otros fármacos antituberculosos como consecuencia del incremento en la permeabilidad bacteriana, permitiendo el ingreso en mayor cantidad de otros medicamentos⁸ (tabla 1).

La resistencia a etambutol se encuentra asociada a mutaciones en tres genes: *embA*, *embB*, y *embC* localizados en un locus de 10,000 pb (*embABC*), que codifican para la enzima arabinosil-transferasa, relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular^{5,8,23}. Cerca del 70% de las cepas resistentes a etambutol presentan una mutación puntual en el codón 306 Met del gen *embB*, causando la sustitución por Val, Leu o Ile^{4,23}. Otras mutaciones reportadas se encuentran en los codones 297, 306, 328, 330, 334, 406, 497, 745, 959, 1,000 y 1,024²⁴ (tabla 1).

Métodos diagnósticos de TB-DR

Dada la importancia de actuar de forma rápida y efectiva ante la sospecha de estar frente a una cepa de TB-DR y gracias al conocimiento de los mecanismos genéticos generadores de resistencias, así como al desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular, ha sido posible desarrollar en los últimos años una nueva serie de técnicas enfocadas al diagnóstico de drogoresistencia a fármacos antituberculosos, buscando aquellas con alta sensibilidad y especificidad, que al mismo tiempo sean rápidas y de bajo costo (tablas 2A,B). En términos generales, se ha establecido una clasificación de estos métodos, en fenotípicos, considerando el cultivo microbiológico de la muestra a diagnosticar, y genotípicos, basados en el empleo de ADN de micobacterias provenientes de la muestra.

Métodos fenotípicos o asociados a cultivo bacteriano

Método de las proporciones BACTEC

Este método descrito por Canneti y Grosset, mide la proporción de colonias que han crecido en medios con concentraciones críticas de antibióticos, en relación con el crecimiento observado en un medio sin antibiótico. Dicho método es la base del sistema automatizado BACTEC, el cual consiste en el sembrado de los bacilos previamente cultivados en un medio líquido Middlebrook, rico en ácido palmítico con carbono 14 (¹⁴C). El ¹⁴C es un isótopo radioactivo natural que emite radiaciones beta, de manera que cuando las micobacterias metabolizan el ácido palmítico liberan al medio ambiente dicho isótopo en forma de CO₂, marcado con ¹⁴C. Este CO₂ es aspirado y llevado a una cámara de ionización, en donde se transforma en una corriente eléctrica que se cuantifica y es proporcional a la cantidad de bacilos que se encuentran en crecimiento, es decir la señal eléctrica se expresa como «índice de crecimiento»²⁵. En cuanto al diagnóstico de resistencia, se emplean frascos con medio de cultivo, en los cuales se inocula la cepa a estudiar y se agrega el fármaco antituberculoso a evaluar, de modo que la emisión de radioactividad en un medio de cultivo con determinada droga, significa que el bacilo se está multiplicando y por tanto es resistente²⁵. Este es un sistema completamente automatizado y presenta sensibilidad y especificidad superiores al 90%. Entre sus inconvenientes se encuentran el generar desperdicios radioactivos, la importante inversión inicial en la compra de equipo, reactivos y materiales, y la necesidad de

Tabla 2A
Métodos de diagnóstico de TB-DR

Método	Descripción	Principa(l)es desventajas	Cita
Fenotípicos			
Bactec	Método radiométrico basado en la identificación del crecimiento de micobacterias en medios de cultivo con determinada droga, mediante el marcaje con C14	Disponibilidad de desperdicios radioactivos, altos costos, personal capacitado, 3 semanas para obtener resultados	25
Bactec MGIT	Método fluorométrico basado en la identificación de crecimiento de micobacterias en medios con antibiótico, mediante un sensor de fluorescencia sensible al consumo de O ₂	Altos costos, personal capacitado, tiempo para crecimiento de los bacilos	25-29
MODS	Método basado en el rápido crecimiento de bacilos en placas de cultivo líquido, inoculadas con muestras de esputo y antibiótico; detectando la forma de cordón de las microcolonias de TB con microscopio de luz invertida	Necesidad de microscopio invertido y personal capacitado	28,30
Alamar azul	Método colorimétrico que identifica la presencia de micobacterias en medios con antibiótico, con base en reacciones de óxido-reducción evidentes por el colorante alamar azul	No hay resultados contundentes para drogas bacteriostáticas como estreptomina y etambutol	31-33
Resazurina	Método similar al Alamar azul, que emplea el indicador resazurina, detecta cambio de coloración de azul a rosa	Genera aerosoles biocontaminantes, falsos positivos por contaminación de placas	28,34-36
Nitroreductasa	Cuantifica la actividad de la enzima oxirreductasa, que reduce el nitrato en nitrato en medio líquido, detecta bacilos resistentes por un cambio en la coloración de rosa a rojo o violeta	Genera aerosoles biocontaminantes	28,36-38
LPR	Método basado en la identificación de micobacterias mediante la emisión de luz por luciferina, como respuesta a la infección de bacilos con fagos que tienen inserto el gen <i>fluc</i>	Requiere de personal capacitado	39-41
Genotípicos			
Secuenciación	Método que identifica y analiza la secuencia nucleotídica de un fragmento de gen específico mediante un paquete de computo, con la finalidad de identificar mutaciones que se sabe causan drogoresistencia	Alto costo, personal altamente capacitado	6,9,17,39
Q-PCR	Método que permite la detección de mutaciones en fragmentos de genes causantes de drogoresistencia mediante el uso de sondas de ADN marcadas con fluorescencia	Alto costo, personal altamente capacitado, conocimiento de posibles lugares de mutación, baja sensibilidad para la identificación de resistencia fenotípica	15-18,43
SSCP	Método que identifica cepas mutadas con base en que las diferencias en la secuencia de hebras individuales de ADN en condiciones no desnaturalizantes, ocasionan diferencias en autoplegamiento y por tanto distinto patrón de migración en geles de poliacrilamida en comparación con cepas sensibles	Baja sensibilidad en especial para mutaciones en isoniacida, rifampicina y etambutol	44-48
LIPA	Sistema colorimétrico que identifica mutaciones basado en la hibridación reversa de fragmentos de PCR de <i>Mycobacterium</i> bioninilados, con sondas de nucleótidos colocados en línea en una tira de membrana	Comercialmente solo hay disponibilidad para detección de mutaciones de resistencia a rifampicina	28,49,50
GenoType	Técnica similar a LIPA, detecta resistencia a rifampicina e isoniacida	Solo está disponible para diagnóstico de resistencia a isoniacida y rifampicina	28,53
MTBDRplus	Fundamentado en el diagnóstico de drogoresistencia en la hibridación de ADN de <i>Mycobacterium</i> con múltiples sondas específicas con fluorocromos adheridas a una membrana, permitiendo el análisis de miles de genes en un solo ensayo	Conocimiento previo de todas las mutaciones causantes de drogoresistencia, alto costo, personal altamente capacitado	52,53
Microarreglos			

personal altamente capacitado. Quizá su principal desventaja es el tiempo requerido para confirmar una negatividad, pues incluye por lo menos de 3-4 semanas para el cultivo y una semana más para obtener resultados de famacorresistencia, contribuyendo a la transmisión de la TB-MDR y poniendo en entredicho su pertinencia futura en programas de salud específicos contra TB-DR y MDR^{5-6,25}.

Bactec MGIT 960

El método del tubo indicador de crecimiento micobacteriano o Bactec MGIT 960[®] (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Inc). Es un sistema para crecimiento y detección de *Mycobacterium* completamente automatizado; funciona mediante un sensor especial de fluorescencia sensible al consumo de O₂, que permite monitorear el crecimiento microbiano, presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 89,8%, para estreptomina. Al compararlo con el sistema BACTEC tiene la ventaja de detectar el crecimiento micobacteriano en forma más rápida²⁶⁻²⁸ y evita la producción de desechos radioactivos; no

obstante, mantiene varias de sus desventajas como requerir personal capacitado y altos costos de inversión en equipo, materiales y reactivos^{26,29}.

Microscopic Observation Drug Susceptibility assay (MODS)

Este método detecta la resistencia de *M. tuberculosis* a isoniacida y rifampicina, directamente de las muestras de esputo. Tomando como base que el crecimiento del bacilo es más rápido en medio líquido que en medio sólido, esta técnica consiste en examinar mediante un microscopio de luz invertida, placas de cultivo con medio Middlebrook 7H9 y el antibiótico a evaluar, inoculadas con muestras de esputo; detectando en un promedio de 7 días la forma de cordón de las microcolonias características de TB^{28,30}.

Estos últimos 2 factores, además de su bajo costo, son sus principales ventajas, ya que reduce considerablemente el tiempo de diagnóstico y posee una mayor sensibilidad y especificidad que el medio sólido, al evidenciar el crecimiento característico de *M. tuberculosis*^{28,30} (tablas 2A,B).

Tabla 2B
Métodos de diagnóstico de TB-DR

Métodos	Tipo de muestra	Tiempo de resultados	Sensibilidad	Especificidad	Costos *	Cita
Bacter	Cultivo	28-42 días 60-90 días	> 90%	> 90%	20-50	25, 26, 30
Bacter MGIT	Cultivo	7-14 días	(S)REP 100%	(S)89,8%-(R)9100%	60	25-29
MODS	Espuito	7 días	(LR) 86,6-97,8%	(LR) 99,6-100%	2-3	28, 30
Alamar azul	Cultivo, espuito	3-5 semanas	(LR) 89%	(LR) 100%	3-10	31-33
Resazurina	Cultivo, espuito	4-5 semanas	(LR) 89,4-94%	(LR) 100%	3-10	28, 34-36
Nitrato reductasa	Cultivo	21-28	(LR) 100%	(LR) 100%	3-10	28, 36-38
	Espuito	7-18 días	(R) 87,5%	(R) 100%		
LPR	Cultivo	1-2 semanas	(LR) 68-100%	(LR) 73-99%	8-10	39-41
	espuito	12 días	97%			
Genotípicos						
Secuenciación	ADN de cultivo, espuito y extrapulmonar	8 h	100%	100%	15	69, 17, 39
Q-PCR	ADN de cultivo, espuito, y extrapulmonar	8 h	70-90%	> 85%	5-10	15-18, 43
SSCP	ADN de cultivo	8-12 h	R 88%	R 98%	3-6	44-48
			I 80%	I 100%		
LIPA	ADN de cultivo y espuito	12 h	(R) > 95%	(R) 100%	45-50	29, 49-50
			(R) 80-100%	(R) 100%		
GenoType MTBDRplus	ADN de cultivo y espuito	6 h	(R) 98,7% (I) 92%	(IR) 99,1%	30-50	28, 53
			(R) 96,8% (I) 90,2%			
			(IR) 98,4%			
Microdiospositivos, «Microarray»	ADN de cultivo y espuito	6-8 h	ND	ND	ND	52, 53

E: etambutol; I: isoniacida; LIPA: ensayo de prueba en línea; LPR: Fagos reporteros de luciferasa; MODS: microscopic observation drug susceptibility assay; P: plizaminida; Q-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; R: rifampicina; S: estreptomina; SSCP: polimorfismos conformacionales de hebra sencilla.

* Por muestra en US dólares, no se consideran costos derivados de manejo, transportación, gastos de pago de personal y equipamiento.

Métodos de óxido reducción: alamar azul, resazurina y actividad nitroreductasa

El alamar azul es un método colorimétrico utilizado desde 1995 para medir cuantitativamente la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a agentes antimicrobianos. Se basa en la utilización del colorante alamar azul como indicador de óxido reducción; cuando hay presencia de células viables, dicha reacción se lleva a cabo y el medio de cultivo cambia de una coloración azul a rosa^{31,32}.

Estudios realizados con este método concluyen que, mediante el empleo de determinados puntos de corte, es posible generar una buena detección de cepas sensibles y resistentes a isoniacida y rifampicina (con una sensibilidad de 89% y especificidad del 100%) (tabla 2B); sin embargo, aún no hay resultados concluyentes para los casos particulares de estreptomina y etambutol, ya que estas drogas son bacteriostáticas y no bactericidas. Quizá la principal ventaja de esta técnica es su bajo costo y la fácil disponibilidad de los reactivos, por lo que bien podría apoyar programas de control de TB-DR en países con escasos recursos económicos^{32,33} (tabla 2A).

El ensayo de micro valoración con resazurina (o REMA por sus siglas en inglés), es un método colorimétrico que permite, a partir de bacilos aislados de espuito, determinar drogoresistencia en un periodo de una semana. Consiste en la incorporación del indicador resazurina a medio de cultivo líquido con diferentes concentraciones de antibiótico, si el bacilo se mantiene vivo, se detecta un cambio de color azul a rosa, como resultado de la reducción del indicador. Es una técnica barata, sencilla y con buenos resultados de sensibilidad y especificidad; entre sus inconvenientes está la producción de aerosoles y la posibilidad de transferir bacilos de un pozo a otro de la microplaca³⁴⁻³⁶ (tablas 2A,B).

Otra técnica similar es nitroreductasa o «prueba de Griess». Se fundamenta en la actividad de la enzima nitroreductasa, que le confiere a *Mycobacterium* la capacidad para reducir el nitrato en nitrato al emplear NaNO_3 en el medio de cultivo, detectando la resistencia mediante un cambio de color, que puede ir del rosa al violeta en función de la cantidad de bacilos. Ofrece resultados de 10-14 días a partir de un cultivo positivo o de muestras de espuito con baciloscopia positiva. Entre sus ventajas se encuentran que es

de bajo costo, requiere equipamiento microbiológico básico y posee buenos niveles de sensibilidad y especificidad^{28,37,38}, (tablas 2A,B).

Micobacteriófagos

El uso de micobacteriófagos para el diagnóstico de TB-DR ofrece resultados fenotípicos en poco tiempo y a bajo costo. Las 2 técnicas de mayor aceptación basadas en micobacteriófagos son la *phage-amplified biological assay* (phaB, 'amplificación biológica de fagos') y la *luciferase reporter phages* (LRP, 'identificación de fagos reporteros de luciferasa')³⁹.

Amplificación biológica de fagos. Esta técnica se basa en la amplificación de fagos en micobacterias sospechosas previamente tratadas con antibiótico, de manera que después del proceso fago infeccioso, los fagos extracelulares son retirados del medio, mientras los fagos que lograron ingresar a las bacterias que sobrevivieron aún con los fármacos, se replican; así nuevas partículas de fago serán liberadas dentro del medio y se podrá observar y cuantificar las placas de lisis en las células infectadas³⁹. De esta manera las placas aparecerán sólo en las células de micobacterias resistentes.

Con esta base, los laboratorios Biotec (Biotec Laboratories, Ltd, Reino Unido) desarrollaron recientemente un sistema comercial para la detección de *M. tuberculosis* con resistencia a rifampicina llamado prueba rápida de placa de TB-Rif (FASTplaqueTB-Rif assay), con la ventaja de requerir 48 h para proporcionar resultados confirmatorios, pero con el inconveniente de necesitar de un cultivo previo de la bacteria³⁹.

Fagos reporteros de luciferasa. Esta técnica permite determinar la susceptibilidad a fármacos antituberculosos mediante fagos reporteros de luciferasa. Se fundamenta en la infección de micobacterias con fagos que contienen inserto en su genoma el gen reportero *fflux*, el cual codifica para la luciferasa de luciémaga. Estos fagos son capaces de replicar y expresar el gen *fflux* solo en células viables de *Mycobacterium*, de forma que la proteína

luciferasa, en presencia de ATP, cataliza una reacción que libera O₂ y luciferina, emitiendo fluorescencia³⁹⁻⁴¹.

En lo que se refiere a muestras clínicas con sospecha de contener TB-DR, estas se cocultivan con el panel de antibióticos y finalmente se infectan con LRP, de modo que solo aquellas cepas resistentes al fármaco sobrevivirán y serán detectadas fácil y rápidamente por su emisión de fluorescencia mediante un luminómetro o una película radiográfica. La primera opción ofrece una alta sensibilidad y resultados cuantitativos en aproximadamente 54 h (con una sensibilidad de 86-100% y especificidad del 73-99%, para rifampicina); mientras que la película radiográfica tiene similares valores de eficacia, pero su principal atributo es la disminución en costos; no obstante, requiere mayor tiempo (94 h) para proporcionar resultados confirmatorios³⁹⁻⁴¹.

Esta técnica también se ha aplicado sobre muestras de esputo, donde aporta resultados en aproximadamente 12 días, y su utilización resulta atractiva en los países en vías de desarrollo con alta prevalencia de TB-DR⁴¹.

Métodos diagnósticos genotípicos o moleculares

La aplicación de métodos de diagnóstico genotípicos ha sido posible, entre otras cosas, gracias a la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*, y a la identificación y caracterización de genes asociados a drogoresistencia. Estos métodos ofrecen la posibilidad de identificar mutaciones asociadas a TB-DR de forma precisa y generar resultados a partir de 100 bacilos o menos por muestra. Quizá lo más importante es que permiten realizar el diagnóstico en cuestión de horas⁴², ya que al utilizar la muestra clínica directamente como material biológico, se elimina el tiempo relacionado con el crecimiento del bacilo.

En todas las técnicas moleculares el primer paso es la extracción del material genético y la amplificación, mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR (de acuerdo a sus siglas en inglés), de la región que contiene la(s) mutación(es) responsable(s) de la resistencia, para posteriormente identificarse mediante el empleo de alguno de los siguientes métodos:

Secuenciación genómica

Esta técnica es la más exacta y está considerada como el estándar molecular para definir genotípicamente a una cepa drogoresistente^{6,9,39}. Permite la ubicación concreta de la(s) mutación(es) y consiste en identificar y analizar la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN específico^{6,9,39}. Solo se requiere obtener el ADN de la cepa a estudiar, amplificar por PCR la región del gen de interés y este producto es analizado por un secuenciador automático, el cual finalmente presenta la sucesión de ácidos nucleicos^{6,39}.

Para el caso del diagnóstico de resistencia a fármacos en micobacterias, es posible secuenciar el gen involucrado en dicho mecanismo, e identificar la mutación o mutaciones específicas mediante comparación con el gen de una cepa sensible^{6,39}. Sin embargo, las limitaciones de esta técnica son los altos costos del equipo, los materiales y reactivos que se requieren, y la necesidad de contar con personal altamente capacitado. Pese a estas desventajas, varios estudios demuestran que la secuenciación es considerada la técnica de elección para la detección genotípica de resistencias en cepas de *M. tuberculosis*¹⁷.

Sistemas de detección por fluorescencia mediante PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real permite la detección de mutaciones con ayuda de sondas de ADN marcadas con diferentes tipos de fluorescencia. Para ello, se amplifica la región en donde se ubica la mutación causante de resistencia al fármaco y se analiza la fluorescencia del producto generado^{15-18,43}. De esta forma se

han identificado mutaciones en los genes *rpoB*, *katG*, *inhA* y *embB* (tabla 2A-2B).

Este sistema detecta el ADN de micobacterias provenientes de esputo, lavado bronco alveolar, fluido cerebro espinal, fluido pleural o muestras de tejido, lo que amplía su utilidad como técnica diagnóstica. Además, pueden emplearse en un mismo ensayo diversas sondas marcadas con diferentes fluorógenos, evidenciando, distintas mutaciones en varias muestras clínicas, inclusive si difieren por un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism* [SNP, 'polimorfismo mononucleótido']), proporcionándole una versatilidad y rapidez importante^{15-18,43,44}.

Para este procedimiento se han desarrollado diversos tipos de sondas, con diferentes características y niveles de eficiencia. Destacan las sondas «Molecular Beacons» y las sondas «FRET», ambas permiten detectar SNP de manera eficiente; sin embargo, comparten el inconveniente de ser costosas, requerir equipo sofisticado y personal altamente especializado. Las ventajas de esta técnica radican en el corto tiempo para obtener resultados y los valores de especificidad superior al 85%, con sensibilidad entre 70-90% en su aplicación al diagnóstico de resistencia a rifampicina e isoniacida^{15-8,39,43,44} (tablas 2A y B).

Polimorfismo conformacional de hebra sencilla por PCR (SSCP, Polymerase Chain reaction single stranded conformational polymorphism)

Este método ha sido utilizado en investigaciones con la finalidad de identificar de mutaciones relacionadas a enfermedades genéticas y recientemente se ha extendido su empleo al estudio de mutaciones asociadas con la resistencia a antibióticos en tuberculosis⁴⁵. Se fundamenta en que bajo condiciones no desnaturizantes, un fragmento de una hebra de ADN adopta una conformación espacial, en función de su secuencia de nucleótidos; sin embargo, ante la existencia de una mutación, la secuencia nucleotídica y el plegamiento serán distintos, generando un patrón de migración electroforético diferente, detectable en una matriz de poliacrilamida³⁹.

Esta técnica se ha aplicado al estudio de TB-DR⁴⁴⁻⁴⁷. Si bien es de bajo costo y sencilla de realizar, existen estudios que cuestionan su sensibilidad y especificidad para la detección de mutaciones en los genes responsables de generar resistencia a isoniacida, rifampicina y etambutol^{44,46-48} (tabla 1).

Ensayo de prueba en línea (LIPA, Line probe assay)

Este método se utiliza para identificar aislados de micobacteria con diagnóstico previo por cultivo en BACTEC. Se basa en la hibridación de fragmentos biotinilados de ADN de una muestra sospechosa de ser TB-DR, sobre una tira de membrana en la cual se encuentran adheridos sondas de oligonucleótidos en línea, detectando dicho acoplamiento mediante un sistema colorimétrico vía biotina-streptavidina⁴⁹. El kit comercial para identificar resistencia a rifampicina contiene diez sondas con las cuales se puede determinar tanto la pertenencia al complejo *M. tuberculosis*, como la detección de cuatro mutaciones específicas en el gen *rpoB*⁵⁰. Estudios realizados mediante el empleo de esta técnica concluyen que es altamente sensible (95% o más) y específica (100%) para detectar tuberculosis resistente a rifampicina tanto de medios de cultivo como aislados y ligeramente menor para especímenes clínicos⁵⁰.

GenoType MTBDRplus

Es una técnica disponible comercialmente que permite la detección rápida de cepas del complejo *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina e isoniacida, detectando mediante hibridación con sondas específicas, una variedad de mutaciones en el fragmento

de 81 pb del gen *rpoB*, así como la mutación del codón 315 del gen *katG* y mutaciones en la región promotora del gen *inhA*^{28,51}.

Entre las ventajas que presenta se encuentra el poder aplicarse tanto en cultivo como directamente en esputo; además en cuanto a validez de la prueba ofrece una sensibilidad para detectar resistencia a rifampicina de 98,1% y para isoniazida de 90,2%, con una especificidad de 97,8% y 100% para cada droga respectivamente^{28,51}.

Microdispositivos de ADN (DNA Microarray)

Esta es una de las técnicas genotípicas más recientes que emplea la hibridación de sondas específicas marcadas con fluorocromos, con el ADN derivado de las muestras clínicas con sospecha de drogoresistencia. El sistema requiere el empleo de un microdispositivo, el cual consta de un cristal recubierto con una película de oro, sílice o algún otro material al que se adhieren genes o grupos de genes, silvestres y mutados, de modo que al colocar el material genético proveniente de una muestra, esta hibrida con la sonda complementaria y emite una señal fluorescente, cuyo análisis posterior permite identificar los genes portadores o carentes de las mutaciones, identificando así la resistencia o susceptibilidad por el antibiótico^{52,53}.

Quizá el mejor atributo de esta técnica es su capacidad de analizar de manera global, automatizada y simultánea cientos de mutaciones de un mismo o diferentes genes, en un sólo ensayo y por lo tanto generan un ahorro de tiempo considerable. Esta técnica actualmente está abriendo un nuevo panorama en el diagnóstico de la drogoresistencia de TB^{52,53}; sin embargo, no se cuentan con estudios que evalúen su sensibilidad y especificidad. Por otro lado, los altos costos del equipo para el análisis, así como los relacionados con el diseño y construcción de los microdispositivos y la necesidad de contar con personal altamente calificado, limitan su utilidad en países con escasos recursos.

Discusión y conclusiones

Es importante resaltar las ventajas de las técnicas de diagnóstico fenotípico de drogoresistencia en tuberculosis, tales como su alta sensibilidad, especificidad y bajo costo, motivos por los que se ubican como las técnicas de referencia global. Sin embargo, su gran desventaja es que requieren de una gran cantidad de tiempo para generar resultados confirmatorios, factor considerado como el más importante a atender dentro de la dinámica de atención oportuna en contra de la TB-DR. El desarrollo de nuevas técnicas fenotípicas para diagnóstico de drogoresistencia, fundamentadas en el crecimiento de *M. tuberculosis* en medio líquido reducen los tiempos considerablemente respecto al medio sólido, además son más sensibles, específicas y económicas.

Por otro lado, las nuevas técnicas genotípicas poseen una alta especificidad y mayor disminución en los tiempos para obtención del diagnóstico; pero poseen importantes limitaciones que impiden su aplicación generalizada en el campo clínico, tales como elevado costo y necesidad de un laboratorio y personal altamente especializado.

Aunado a lo anterior, 2 temas están replanteando el futuro papel de los métodos genotípicos. En primer lugar, la resistencia a un fármaco está mediada por la participación de una o más mutaciones en uno o varios genes (tabla 1), inclusive varios de ellos aún no identificados. Esto hace que la especificidad de la técnica para la búsqueda de una mutación en un gen sea alta, pero la sensibilidad para la identificación fenotípica de resistencia sea baja. Es decir, el hecho de no encontrar ciertas mutaciones en un gen o genes no necesariamente se traduce en un diagnóstico confiable de sensibilidad. Se estarían diagnosticando falsos

negativos; por lo menos hasta que se logre la descripción de todas las mutaciones causantes de resistencia en todos los genes participantes.

Como segundo punto, en los últimos años el número de publicaciones relacionadas con la identificación de mutaciones en genes asociados con resistencia a TB se ha incrementado considerablemente^{39,54-59}. En ellas se aprecia que las frecuencias en las mutaciones poseen un amplio rango de variación dependiendo de la procedencia, por ejemplo la mutación 315 para *katG*, explica la resistencia para isoniazida en el 52% de las cepas provenientes de México¹⁹, en el 62% de cepas procedentes de España⁵⁴ y en el 100% de cepas originarias de Kazajistán⁵⁷.

Lo anterior obliga a desarrollar mayor número de estudios que identifiquen las mutaciones más frecuentes en cada país o región geográfica, con la finalidad de desarrollar o adaptar procedimientos diagnósticos moleculares específicos, incrementando los niveles de eficiencia y logrando un mayor impacto en los programas de estas regiones o países.

En este sentido, quizá la técnica de microdispositivos de ADN sea la única que permitirá analizar todas las mutaciones de un sólo gen o de combinaciones de genes, por lo que se coloca como una de las más viables de subsistir, siempre y cuando se disminuyan sus costos y se evalúe adecuadamente su sensibilidad y especificidad.

En conclusión, podríamos decir que las condiciones económicas y el escaso conocimiento sobre la frecuencia de las mutaciones en los genes asociados a la DR de varios de los países afectados por la nueva dinámica de la TB-DR, son tan solo 2 de los factores que proyectan un futuro incierto para las técnicas genotípicas y más aún si se comparan con las nuevas técnicas fenotípicas (MOD, alamar azul, reazuína, nitrato reductasa y LPR), cuyos atributos las situarían como aquellas con las mejores perspectivas.

Es por esto que resulta urgente desarrollar estudios clínicos amplios que confirmen la utilidad de dichas técnicas fenotípicas para finalmente establecer marcos normativos o reglas generales de operación que permitan su inclusión en los programas contra TB-DR, con énfasis en países con escasos recursos económicos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado parcialmente por un financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fondos CONACYT-SALUD, 2005-02-14380) y Universidad Veracruzana POA-UV 2007-2008. B. Cuevas-Córdoba es becaria de doctorado, CONACYT N.º 171183.

Bibliografía

1. World Health Organization. REPORT 2009. Global Tuberculosis Control. Epidemiology Strategy Financing. 1.8 Summary pp.32. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html.
2. Zenteno R. Tópicos Selectos de la Salud Pública. Tuberculosis: realidades y perspectivas. Universidad Veracruzana. Instituto de Salud Pública; 2006 pp 9-28.
3. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the world. Fourth Global Report WHO 2008. Executive Summary. Result Survey coverage and population-weighted means. pp 15. Disponible en: http://www.who.int/entity/tb/publications/2008/jdr_report4_26feb08.pdf.
4. Wada T, Maeda S, Tamaru A, Imai S, Hase A, Kobayashi K. Dual-Probe Assay for Rapid Detection of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis by Real-Time PCR. *Journal Clinical Microbiology*. 2004;42:5277-85.
5. Quirós-Roldán E, Airolidi M, Moretti F, Camisi G. Bases moleculares de resistencia de *M. tuberculosis*. *Rev Diagn Biol*. 2001;50:200-3.

6. Tapia R. El Manual de Salud Pública. Unidad II. Capítulo 6 Tuberculosis, 2^{ed}. México: Editorial Interstemas; 2006 pp. 469-505.
7. Palma-Nicolás José P, Bocanegra-García V. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Arch Bronconeumol*. 2007;43:225-32.
8. Said S, Becerril P, Molina G, Barrios H. Tuberculosis causada por cepas de *M. tuberculosis* drogoresistentes. *Enf Emerg*. 2005;7:13-9.
9. Caws M, Drobniewski FA. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. *Ann NY Acad Sci*. 2001;953:138-45.
10. Soo-Young K, Yeon-Joon P, Won-Il K, Sun-Hwa L, Chul-hun Ludgerus C, Seok-Jin K. Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from south Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47:487-502.
11. Reviewed UniProtKB/Swiss-Prot Q08129 (KATG_MYCTU) July 22, 2008. Version 75. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q08129>.
12. Mo L. Three-dimensional model and molecular mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and isoniazid-resistant KatG mutants. *Microb Drug Resist*. 2004;10:2:69-79.
13. García R, Lado I, Túnez V, Pérez Del Molinón ML, Cabarcos A. Tratamiento actual de la tuberculosis. *An Med Intema Madrid*. 2003;20:43-52.
14. Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot P0A5Y6 (INH_A_MYCTU) November 2008. Version 37. Disponible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P0A5Y6>.
15. Zhang M, Yue J, Yang Y, Zhang H, Lei J, Jin R, et al. Detection of Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China. *Clin Microbiol*. 2005;43:5477-82.
16. Kocagoz T, Saribas Z, Alpaslan A. Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2005;43:6015-9.
17. Marin M, García de Viedma D, Ruiz-Serrano M, Bouza E. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. *Antimicrob Agents CH*. 2004;48:4293-300.
18. Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot P0A680 (RPOB_MYCTU) July 2008. Version 22. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0A680>.
19. Zenteno-Cuevas R, Zenteno JC, Cuellar A, Cuevas B, Sampieri CI, Riviera JE, et al. Mutations in *rpoB* and *katG* genes in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Southeast of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:468-72.
20. Somoskovi A, Parsons IM, Salinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*. 2001;2:164-8.
21. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003;7:1-16.
22. WHO. Treatment of tuberculosis: Guidelines for National Programmes. 3rd Ed. Geneva, Switzerland, 2003.
23. Sreevatsan S, Stockbauer K, Pan X, Kreiswirth B, Moghazeh S, Jacobs W, et al. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents CH*. 1997;41:1677-81.
24. Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot P41196 (RS12_MYCTU) Last modified July 2008. Version 69. Disponible en <http://www.uniprot.org/uniprot/P41196>.
25. Nava O, Prieto I. Diagnóstico bacteriológico de tuberculosis pulmonar: revisión. *Kasmera*. 2001;29:51-63.
26. Sierra C, Sánchez E, Henao S, Saavedra A. Determinación de la susceptibilidad a drogas de primera línea en aislamientos de *M. tuberculosis* por la técnica del tubo indicador de crecimiento micobacteriano. *Rev Fac Med*. 2008;56:11-20.
27. Otu J, Antonio M, Cheung Y, Donkor S, De Jong B, Corrah T, et al. Comparative evaluation of BACTEC MGIT 960 with BACTEC 9000 MB and LJ for isolation of mycobacteria in The Gambia. *J Infect Developing Countries*. 2008;2:200-5.
28. Ugarte-Gil C, Ponce M, Moore D. Artículo de revisión: Pruebas de sensibilidad para *M. tuberculosis*. *Acta Med Per*. 2008;25:171-5.
29. Augustynowicz-Kopeć E, Jaworski A, Zwolska Z. Evaluation of Bactec MGIT 960 fluorescent method in diagnosis of tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol*. 2002;70:450-7.
30. Moore D, Evans C, Gilman R, Caviedes L, Connell J, Vivar A, et al. Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB. *N Engl J Med*. 2006;355:1539-50.
31. Yajko D, Madej J, Lancaster M, Sanders C, Cawthon V, Gee B, et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol*. 1995;33:2324-7.
32. Acosta S, León C, Leal A. Determinación de la concentración inhibitoria mínima en cepas de *M. tuberculosis* mediante la técnica colorimétrica de alamar azul. *Asociación Colombiana de infectología*. 2004;8:194-202.
33. Caviedes I, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, et al. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1203-8.
34. Palomino J, Martín A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:2720-2.
35. Rivoire N, Ravololonandriana P, Rasolonavalona T, Martín A, Portaels F, Ramarokoto H, et al. Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11:683-8.
36. Afollabi D, Sanoussi N, Odoun M, Martin A, Koukpedji L, Palomino J, et al. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Cotonou (Benin) using two low-cost colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. *J Med Microbiol*. 2008;57:1024-7.
37. Afollabi D, Odoun M, Martin A, Palomino J, Anagonou S, Portaels F. Evaluation of Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Rifampin Resistance by a Nitrate Reductase Assay Applied to Sputum Samples in Cotonou, Benin. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2123-5.
38. Martin A, Panalov S, Portaels F, Hoffner S, Palomino JC, Angeby K. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:56-64.
39. Hazbón M. Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. *Biomédica*. 2004;24:149-62.
40. Hazbón M, Guarán N, Ferro B, Rodríguez A, Labrada I, Tovar R, et al. Photographic and luminometric Detection of Luciferase Reporter Phages for Drug Susceptibility Testing of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4865-9.
41. Bardarov S, Dou H, Eisenach K, Banaike N, Ya S, Chan J, et al. Detection and drug-susceptibility testing of *M. tuberculosis* from sputum samples using luciferase reporter phage: comparison with the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) system. *Diagn Microb Infect Dis*. 2003;45:53-61.
42. Guzmán A, Juárez A, Zenteno R. Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas. *MedUNAB*. 2003;6:46-51.
43. Parashar D, Chahuan D, Sharma V, Katoch V. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research. *Indian J Med Res*. 2006;124:385-98.
44. Bobadilla M, Ponce de León A, Arenas C, Vargas C, Kato M, Small P, et al. *RpoB* gene mutation in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:1010-3.
45. Estrada-Cuzcano A, Sandoval J, Guevara-Fujita M, Fujita R. Use of the SSCP technique to detect point mutations on human mtDNA. *Rev Peru Biol*. 2005;12:349-58.
46. Cheng X, Zhang J, Yang L, Xu X, Liu J, Yu W, et al. A new Multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*. 2007;70:301-5.
47. Wu X, Jiang J, Zhang J, Lu Y, Li H, Zhang C, et al. Detection and evaluation of the mutations of *embB* gene in ethambutol-susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Chin Med J*. 2005;118:1739-41.
48. Cheng X, Zhang J, Yang L, Xu X, Liu J, Yu W, et al. A new Multi-PCR-SSCP assay for simultaneous detection of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*. 2007;70:301-5.
49. Miller N, Infante S, Clary T. Evaluation of the LPA *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *J Clin Microbiol*. 2000;38:1915-9.
50. Morgan M, Kalantri S, Hores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2005;5:1-9.
51. Hillemann D, Ritsch-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTDRplus Assay for Rifampin and Isoniazid Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2635-40.
52. Bets JC. Transcriptomics and Proteomics: Tools for the identification of novel drug targets and vaccine candidates for tuberculosis. *IUBMB Life*. 2002;53:239-242.
53. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *HMS Immunol Med Microbiol*. 2009;56:103-11.
54. Torres M, Criado A, González N, Palomares JC, Aznar J. Rifampin and isoniazid resistance associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Seville, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002;6:160-3.
55. Nusrath A, Selvakumar N, Narayanan S. Molecular analysis of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:71-5.
56. Silva M, Senna S, Ribeiro M, Valim A. Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4471-4.
57. Hillemann D, Kubica T, Agzamova R. Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9:1161-7.
58. Hoffing CC, Pavan EM, Giampaglia CM. Prevalence of *katG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9:87-93.
59. Bostanabad SZ, Titov LP, Bahramand A. Detection of mutation in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from tuberculosis patients in Belarus. *Indian J Med Microbiol*. 2008;26:143-7.
60. Ardiz N, Bermúdez V, Urdaneta B. Resistencia a drogas en *M. tuberculosis*: Bases moleculares. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2005;24.
61. Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, et al. Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Med Microbiol*. 2008;26:143-7.

7: Artículo Científico Aceptado para publicación

Re: JMII03-12-018 Accepted

De: **Roberto Zenteno** (robzencue@gmail.com)
Enviado: jueves, 31 de mayo de 2012 10:42:17 a.m.
Para: **betsaida cuevas cordoba** (betsaida_20@hotmail.com)

2012/5/31 JMIIeditorialoffice <jmiieditorialoffice@gmail.com>

Manuscript Number: JMII03-12-018
Article Title: rrs and rpsL mutations in streptomycin-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis from Mexico

Dear R. Zenteno-Cuevas

I am pleased to inform you that your work has now been provisionally accepted for publication in the Journal of Microbiology, Immunology and Infection. You will be notified when your manuscript has been sent to the publisher, which will be in the next 2 months and you will receive a PDF proof by e-mail from the Publisher three weeks after that. Please look out for it. We reserve the right to rescind our provisional decision of acceptance if no response is received for the author proof by the date given by the Publisher.

Thank you for submitting your work to the journal.

Kind regards,

Po-Ren Hsueh,
Editor in Chief
Journal of Microbiology, Immunology and Infection

--
Dr. Roberto Zenteno-Cuevas
Instituto de Salud Pública/Public Health Institute
Universidad Veracruzana
Av. Luis Castelazo Ayala s/n. Col. Industrial Ánimas
C.P. 91190 Xalapa, Veracruz, Mexico.
T. (01 228) 8418900 (13321). F. 8418935
alter-email: rzenteno@uv.mx

***rrs* and *rpsL* mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico**

Cuevas-Córdoba Betzaida^{1,2}, Cuellar-Sánchez Aremy³, Parissi-Crivelli Aurora³, Santana-Álvarez Carlos Armando⁴, Hernández-Illezcas Javier⁴, Zenteno-Cuevas Roberto^{1,4*}

1. Laboratorio de Ecología y Salud, Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana.
2. Doctorado en Ciencias Biomédicas. Centro de Ciencias Biomédicas. Universidad Veracruzana.
3. Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz, Servicios de Salud de Veracruz.
4. Centro de investigaciones Biomédicas en Enfermedades Infecciosas, Veracruz, México

* Corresponding author

R. Zenteno-Cuevas
Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana
Av. Luis Castelazo Ayala s/n, A.P. 57. Col. Industrial Animas
Xalapa, Veracruz, 91190, México
T. 51 (228) 841-8933, email: robzencue@gmail.com

Email addresses:

CCB: betcuevas@uv.mx, betsaida_20@hotmail.com

CA: acuellar@ssaver.gob.mx

PCA: aparissi2@ssaver.gob.mx

SACA: csantana44@ssaver.hotmail

HIJ: jhernandez321@ssaver.gob.mx

Keywords: *rrs*, *rpsL*, mutations, *Mycobacterium*, Mexico.

ABSTRACT

Purpose: Mutations in *rpsL* and *rrs* genes are associated with resistance to streptomycin in tuberculosis; however, important geographical variation exists in these mutations. The goal of this study was therefore to characterize these mutations in isolates of streptomycin-resistant mycobacteria originating in the southeast of Mexico.

Methods: Mycobacteria were isolated from patients with suspected drug resistant tuberculosis. Susceptibility tests were carried out utilizing the fluorometric method and *rrs* and *rpsL* DNA sequencing was performed by capillary electrophoresis.

Results: 136 drug resistant isolates were recovered: 91(67%) exhibited resistance to Streptomycin. Mutations in *rpsL* were observed in 18 isolates (19%) at codons 43 A→G (K/R; 12), and 88 A→G (K/R; 4) and A→C (K/Q; 2). Mutations in *rrs* were observed in 26 isolates (28%) at nucleotides 513 A→C (8) and 516 C→T (6). Six novel mutations were identified at nucleotides: 483 A→T (2), 485 A→G (2), 496 G→A (2), 795 C→T (6), 870 C→T (3) and 907 A→C (3). Finally, 47 (52%) of the isolates did not show a mutation.

Conclusion: The variety, and presence/absence, of the mutations found suggest the circulation of an important diversity of strains and the existence of additional mechanisms contributing to streptomycin resistance in the region.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a major cause of illness and death worldwide: in 2009, the World Health Organization (WHO) estimated that a third of the global population was infected, and reported an incidence of 9.4 million cases with the mortality of 1.68 million people¹.

Most of the drugs currently employed for the treatment of TB have been in use for over half a century. This, in combination with poor management, has made it possible for strains to develop resistant to one or all of the anti-tuberculosis drugs. The fourth global report on anti-tuberculosis drug resistance estimates that 20% of the new TB cases were resistant to one antibiotic (TB-DR), 5.3% were multi-drug-resistant (TB-MDR) and 11% were resistant to streptomycin (S+)².

Streptomycin, an aminoglycoside discovered in 1943, was the first antibiotic with proven specificity against TB, and has been used in the treatment of pulmonary tuberculosis for more than 65 years. It functions by inhibiting the protein synthesis of mycobacteria in extracellular form, specifically binding to the 12S subunit protein and the 16S ribosomal RNA (rRNA 16S). Resistance to this drug is mainly associated with two genes: *rpsL*, codifying for the 12S subunit protein, with mutations at codons 43 (A/G, Lys→Arg, Thr) and 88 (A/G/C, Lys→Gln, Arg, Thr) as the predominant; and *rrs*, codifying for the 16S rRNA where the most frequent mutations are at loop 530 and region 912³⁻¹². Despite progress in identification of mutations in *rpsL* and *rrs* in streptomycin-resistant tuberculosis isolates, these genes have been poorly studied and significant geographical diversity have been described in the associated mutations. The objective of this study was therefore to determine the type and frequency of *rpsL* and *rrs* mutations among isolates of streptomycin-resistant mycobacteria from the southeast of Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Collection of clinical samples, isolation and drug susceptibility

Sample collection spanned the period 2007-2010: sputum samples from individuals with suspected cases of DR-TB were recovered by the Public Health Laboratory of the State of Veracruz, Mexico. Decontamination was carried out using N-acetyl-L-Cysteine-NaOH and the primary isolation of mycobacteria was developed with Löwenstein-Jensen medium. Susceptibility testing was performed in duplicate, following the fluorometric method (BACTEC MGIT 960, Becton-Dickinson, MD), for the drugs; Streptomycin (S), Isoniazid (H), Rifampin (R), Ethambutol (E) and Pyrazinamide (Z). Isolation of bacilli and resistance assays were conducted at the bio-security level III facilities of the Public Health laboratory of Veracruz.

DNA purification and amplification of *rpsL* and *rrs* gene

Extraction of DNA from streptomycin-resistant clinical isolates (S+) was conducted with one loop of cultured mycobacteria, according to Van Soolingen¹³. DNA was re-suspended in nuclease-free water, and concentration determined by spectrophotometry in a Nanodrop 100 (ThermoScientific, USA). The DNA solution was then stored at -20 °C until use.

A fragment of 272 bp of the gene *rpsL*, including codons 43 and 88, was obtained by PCR using the primers STR52 R5'GTCAAGACCGCGGCTCTGAA'3 and STR34 F3'TTCTTGACACCC TGC GTATC'5¹⁴. Considering the most common mutations (491, 513, 516 and 905), a 552 bp fragment of the gene *rrs* was amplified using the primers: PR13 F5'AAACCTCTTTCACCATCGAC'3 and PR30 R 3'CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTG'5¹⁵.

The PCR reaction mix consisted of 10mM Tris pH 8, 1.5mM MgCl₂, 0.2 mM each of deoxynucleotide triphosphate, 10µM of PF and PR primers, 1.25U Taq polymerase (Promega, USA), 5% glycerol, 100ng DNA template and topped up with nuclease-free water to a final volume of 25µl. Amplification was performed in a Veriti thermocycler (Applied Biosystems, USA) according to the following conditions: 95 °C for 3min, 35 cycles of 95 °C for 40sec, 57 °C for 30sec and 72 °C for 1min, and a final extension at 72 °C for 3min.

Products were separated electrophoretically in 1.5% agarose gel, and further purified using Amicon Ultra centrifugal filters, (Millipore, Ireland). Final concentration was determined by electrophoresis, using the Mass Ruler low range DNA Ladder (Fermentas, USA).

Sequencing of *rrs* and *rpsL* gene from mycobacteria isolates

Sequencing reactions were performed in both forward and reverse directions using 6µl of Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 (Applied Biosystems, USA), 3.2pM of PF and PR primers and 20ng of purified PCR product in a final volume of 20µl. Amplification conditions comprised 25 cycles of 95 °C for 30sec, 50 °C for 15sec and 60 °C for 4min.

Products were purified using the ZR DNA sequencing clean-up kit (Zymo Research, USA), re-suspended in Hi-Di formamide (Applied Biosystems, USA), heated to 95 °C for 5min, cooled on ice, and finally loaded into a 96-well MicroAmp reaction plate (Applied Biosystems, USA).

Sequencing of DNA products was carried out by capillary electrophoresis in a Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, USA). Fluorescence spectra were analyzed with the software Data Collection V1.01 (Applied Biosystems, USA). Analysis of the sequences and identification of the mutations were performed using the Sequencing Analysis

V5.4 and SeqScape V2.7 programs (Applied Biosystems, USA), respectively. Wild type *rrs* and *rpsL* genes from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Gene Bank accession numbers: 2700429 and 888259) were used as the reference sequences. It is important to highlight that sequences were analyzed only if they presented quality values for individual mutations and a sample score greater than 20, thereby ensuring that base assignment error was below 1%.

RESULTS

From 2007 to 2010, 136 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were collected. Resistance to H was identified in 113 individuals (83%), resistance to R in 95 (70%), to E in 73 (54%) and to Z in 51 (38%). MDR was found in 66% of the isolates and 23% were resistant to all the drugs tested (S, H, R, E and Z). The average age of the individuals was 45 years, 65% were men, and diabetes was the most frequent co-morbidity, found in 29% of the cases.

Resistance to Streptomycin (S+) was found in 91 (67%) individuals, of which 60% (55) were male. Mean age was 45 (±15) years. We observed that 80% (73) of the patients had been previously treated while 20% (18) were new cases. Only 1% (1) was infected with HIV, 6% (6) suffered from malnutrition, 29% (26) had diabetes, and alcoholism was found in 11% (10) individuals.

Regarding the incidence of other resistances, it was found that 88% (80) showed resistance to H, 72% (66) to R, 55% (50) to E and 44% (40) to Z. Multidrug resistance was found in 71% (65), resistance to all the first line drugs was observed in 35% (32) and 6% (6) were individuals with a mono-resistant to S.

Identification of mutations at genes *rpsL* and *rrs* in S+ isolates

From the 91 S+ isolates, the same number of fragments of the genes *rpsL* (272pb) and *rrs* (552pb) were sequenced in both directions.

In *rpsL*, three mutations were observed in a total of 18 (19%) isolates. The most common mutation was at codon 43, A→G (K/R), found in 12 (13%) isolates, followed by mutations at codon 88, A→G (K/R) and A→C (K/Q), in 4 (4%) and 2 (2%) isolates, respectively (Table 1).

In the analyzed *rrs* fragments, eight different mutations were identified in 26 (28%) isolates. The most frequent mutations were at nucleotide 513, A→C, found in eight (9%) isolates, followed by a mutation at nucleotide 516, C→T, in six (7%). Additionally, a set of 6 previously unreported mutations were found: These were at nucleotides 483, A→T, 485, A→G and 496, G→A, in two isolates each, at nucleotide 795, C→T, in six isolates, and at nucleotides 870, C→T and 907, A→C, in three isolates each. (Table 1). Finally, six isolates showed more than one mutation: one had three at nucleotides 483, 485 and 516, two isolates had the same mutations at nucleotides 795 and 870, and three isolates had the same mutations at 795 and 907.

All mutations were mutually exclusive between the genes; isolates with mutations in *rpsL* showed no mutation at *rrs* and vice versa. Of the S+ isolates, 81% had no mutations at *rpsL*, while 72% at *rrs*. Finally, 47 (53%) isolates showed no mutations in the fragments of the genes sequenced.

DISCUSSION

The incidence of TB in Mexico is close to 14 cases per 100,000 habitants with an annual estimate approaching 17,000. According to the Pan-American Health Organization, Mexico is one of the countries with the highest incidences of TB, DR and MDR-TB in Central and North America¹⁶.

The isolates analyzed here were collected in Veracruz: this state is the source of 10% of the TB, and 35% of the DR-TB, cases reported nationally every year, and contains

one of the highest populations of patients with MDR-TB. Veracruz state is therefore considered one of the most important contributors to DR-TB in Mexico¹⁷.

To our knowledge, the study presented here involves one of the largest collections of DR-TB isolates from Mexico. Of the 136 isolates, 66% were MDR, 23% presented resistance to all the drugs analyzed (S, H, R, E, Z), and 67% (91) were S+. This resistance was observed in 20% of the non-treated and 80% of the previously treated patients.

The last published Mexican survey on TB-DR showed that 21% (99) of 461 isolates analyzed had resistance to at least one of the first line drugs, and 7% (34) were TB-MDR. Of the isolates analyzed, 16% (73) were S+, of which 54% (40) were non-treated and 42% (31) previously treated patients¹⁸. Although the population analyzed in our study and the referred in the national survey are not comparable, in both cases resistance to streptomycin was greater than the global incidence of 11% reported by the WHO². The publication of the results from the national survey of TB-DR conducted in 2010 should help to evaluate the actual extent of resistance to streptomycin in Mexico¹⁹.

In *rpsL*, the most common mutations were observed at codons 43 and 88, and are frequently described in several geographical regions^{7, 9-12, 20}, including a previous report from Mexico, where mutation at codon 43 was observed in 6 S+ isolates from the north of the country⁶. However, our results present the first description of mutations at codon 88. At gene *rrs*, 8 different mutations were found; with those at codons 513 and 516 being the most frequently observed in S+ isolates from different geographical regions⁹⁻¹², including Mexico, where the 516 mutation was found in a single isolate⁶ making our report the first to describe the mutation at codon 513, however, mutations described as common at nucleotides 426 and 491^{9,20} were absent in our isolates. Finally, we could find no reports relating to the six novel mutations

found in *rrs*, making this their first description.

Although mutations in *rpsL* and *rrS* are associated with resistance to S.^{12,21} The main limitation of our work lay in the inability to demonstrate the direct relationship of the six new mutations present in *rrS* with the resistance to S. However it is also important of note that mutations in this gene have been associated with resistance to aminoglycosides.²²⁻²⁴ In this sense 50% of isolates that harboring these new set of mutations were also resistant to the all first-line drugs, so these isolates could also be XDR-TB, which has already been described in Mexico.²⁵ Actually we are beginning with the analysis of the real participation of these mutations in the S resistance or the potential XDR behavior of these isolated.

It should be noted that no mutations were found in 47 (52%) of the S+ isolates analyzed. We analyzed the “hot spot regions” of the genes *rrS* and *rpsL*, nevertheless, could be possible that resistant isolates have mutations in other regions of these genes. Beside such lack of mutation is frequently described, with important variations in different geographical regions; for example, in S+ isolates from the north of Mexico and Brazil, absence of mutations was reported in 22%⁶ and 44%⁹. In Portugal, Poland and Spain, the percentages of non-mutation isolates were 33%²⁶, 51%⁵ and 62%¹² respectively. Finally, the values reported in Japan and China were 14%⁴ and 53%⁸ respectively. Recently, it has been suggested that the existence of other mechanisms that could be involved in the generation of resistance to streptomycin; these include mutations at the *gidB* gene^{10,27,28,29}, and alterations in efflux pumps⁹. Additionally this lack of mutations has been related with species of the *Micobaterium Avium* Complex, suggesting that this group have unique mechanisms of resistance³⁰. All these mechanisms must be subjected to detailed evaluation in order to further understand the

processes governing streptomycin-resistance in isolates from the southeast of Mexico.

It has been argued that the variety, and presence/absence, of mutations found at *rrs* and *rpsL* are the result of adopting different treatment schemes by the health authorities, and also by the design and duration of the study and collection period of the isolates⁸. Furthermore, it has recently been demonstrated that the TB-DR genotypes circulating in the region are important contributors to the variation of these mutations¹¹⁻¹². These characteristics were found here, and help to explain the variety observed: The National Guide for TB patient Care in Mexico established in 2003, states that Streptomycin is to be administered (1g/day) for a period of eight months only to patients with a relapse, or with failure or neglect of the primary treatment³¹; additionally in the - isolates here analyzed we have found an important diversity of genotypes in the TB-DR strains circulating³²⁻³³.

The mechanism of Streptomycin administration described above also helps to explain the high levels of isolates with resistance to S+ (67%) that were also MDR (65%) and resistant to all drugs (35%). Additionally, it raises the possibility that the 18 individuals with first time treatment and S+ were infected with tuberculosis isolates that had a prior resistance to drugs. This was confirmed by the fact that 72% of these individuals were MDR and all were also resistant to more than one drug. In consequence, the resistance to streptomycin could be a potential subrogated diagnostic marker for secondary type- and multidrug-resistance in new cases of tuberculosis in Mexico, however additional analysis needs to be done in order to confirm this possibility.

In conclusion, our findings reveal that only 48% of the S+ isolates featured mutations in the *rpsL* and *rrs* genes; this may negatively influence the development of a molecular test for diagnosis of streptomycin resistance and

suggests the occurrence of additional mechanisms associated with streptomycin resistance in the isolates from the region.

ACKNOWLEDGEMENTS

BCC was fellow of CONACYT No. 171183. RZC was funding by FOMIX-CONACyT-COVECyT, No. 95819.

BIBLIOGRAPHY

1. World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. 2010. WHO/HTM/TB/2010.3.
2. World Health Organization/International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World, Fourth Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 2002–2007. 2008. WHO/HTM/TB/2008.394.
3. Meier A, Sander P, Schaper KJ, Scholz M, Böttger EC. Correlation of molecular resistance mechanisms and phenotypic resistance levels in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40, 2452–4.
4. Fukuda M., Koga H., Ohno H., Yang B., Hirakata Y., Maesaki S., et al. Relationship between genetic alterations of the *rpsL* gene and streptomycin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 43:281–4.
5. Brzostek A, Sajduda A, Sliwiński T, Augustynowicz-Kopeć E, Jaworski A, Zwolska Z, Dziadek J. Molecular characterization of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2004; 8:1038–5.
6. Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, Yang Z, Cave MD, Graviss EA. Genotype analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. *J. Med. Microbiol.* 2004 ; 53:107–13.
7. Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM. Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007;13:620–6.
8. Shi R, Zhang J, Li C, Kazumi Y, Sugawara I. Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing. *Microbes Infect.* 2007; 9:1538-44.
9. Spies FS, da Silva PE, Ribeiro MO, Rossetti ML, Zaha A. Identification of mutations related to streptomycin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and possible involvement of efflux mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52:2947-9.
10. Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. *PLoS Med.* 2009; 6:132-136.
11. Sun YJ, Luo JT, Wong SY, Lee AS. Analysis of *rpsL* and *rrs* mutations in Beijing and non-Beijing streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Singapore. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16:287–9.
12. Tudó G, Rey E, Borrell S, Alcaide F, Codina G, Coll P, et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65:2341-2346.
13. Van Soolingen D, de Haas P, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion

- sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991; **29**:2578-2586.
14. Chaoui I, Sabouni R, Kourout M, Jordaan A, Lahlou Q, Elouad R. Analysis of Isoniazid, Streptomycin and Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Morocco. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2009; **3**:278-284.
 15. Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, et al (2007) Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 45:179-192.
 16. Panamerican Health Organizacion /World Health Organization. 2009. Tuberculosis in the Americas. Regional Report 2009. Available at http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2010/TB_Reporte_2009.pdf [Date Accessed: February 12, 2012].
 17. Zenteno-Cuevas R, Rubí A, Fuentes-Domínguez J, Lara-González JL, Escobar-Mesa A. Dynamics of multidrug resistant tuberculosis in Veracruz, México between 2002 and 2008. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2010; **24**:776-778.
 18. Granich RM, Balandrano S, Santaella AJ, Binkin NJ, Castro KG, Marquez-Fiol A. Survey of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican states, 1997. *Arch. Intern. Med.* 2000; **160**:639-44.
 19. National Survey in TB-drug resistant 2010. “Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en TB”. Available at http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/CURSO%20HG/2010/LUNES/Encuesta%20Nacional%20TB%20MDR_20mar10.pdf [Date accessed: February 15, 2012]
 20. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN, Musser JM. Characterization of rpsL and rrs mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; **40**:1024–6.
 21. Gillespie S. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(2):267-274.
 22. Blaschitz M, Hasanacevic D, Hufnagl P, Hasenberger P, Pecavar V, Meidlinger L, Konrad M, Allerberger F, Indra A. Real-time PCR for single-nucleotide polymorphism detection in the 16S rRNA gene as an indicator for extensive drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(6):1243-6
 23. Georghiou S, Magana M, Garfein R, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell T. Evaluation of Genetic Mutations Associated with *Mycobacterium tuberculosis* Resistance to Amikacin, Kanamycin and Capreomycin: A Systematic Review. *Plos One.* 2012;7(3):33275
 24. Jugheli L, Bzekalava N, Rijk P, Fissette K, Portaels F, Rigouts L. High Level of Cross-Resistance between Kanamycin, Amikacin, and Capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Georgia and a Close Relation with Mutations in the rrs Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; **53** (12): 5064–5068
 25. World Health Organization. 2011 Progress Report. MDR-TB & XDR-TB. MDR Fact sheet. Available in http://www.who.int/tb/challenges/mdr/fact_sheet_mdr_progress_march2011.pdf
 26. Perdigao J, Macedo R, Joao I, Fernandes E, Brum L, Portugal I. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. *Microb. Drug. Resist.* 2008; **14**:133–43.
 27. Okamoto S, Tamaru A, Nakajima C, Nishimura K, Tanaka Y, Tokuyama S, et

- al. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol* 2007; **63**:1096-106
28. Spies F, Ribeiro A, Ramos D, Ribeiro M, Martin A, Palomino J, Rossetti M, da Silva P, Zaha A. Streptomycin Resistance and Lineage-Specific Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* gidB Gene. *J Clin Microbiol*. 2011;49 (7): 2625–2630
29. Wong S, Lee J, Kwak H, Via L, Boshoff H, Barry C. Mutations in gidB Confer Low-Level Streptomycin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):2515-2522.
30. Portillo-Gomez L, Nair J, Rouse DA, Morris SL. The absence of genetic markers for streptomycin and rifampicin resistance in *Mycobacterium avium* complex strains. *J Antimicrob Chemother*. 1995;36(6):1049-53.
31. Guía para la Atención de Personas con Tuberculosis resistente a Fármacos. Secretaria de Salud. México. 2010. ISBN 978-607-460-154-1
32. Cuevas-Cordoba B., Xochiua O., Cuellar A., Zenteno-Cuevas R. (2012). *pncA* mutations in pyrazinamide resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *Chemoteraphy*. (In press).
33. Zenteno-Cuevas R, Cuevas-Cordoba B, Enciso A, Enciso L, Cuellar A. Assessing the utility of 3 TaqMan probes for the diagnosis of tuberculosis and resistance to rifampin and isoniazid in Veracruz, Mexico. *Can. J. Microbiol* 2012; Epub ahead 10.1139/w11-127.

Nucleotide (Codon)	Polymorphism	Amino Acid	Isolates	
			N (91)	%
Gene <i>rpsL</i>				
128 (43)	A→G	K/R	12	13%
263 (88)	A→G	K/R	4	4%
262 (88)	A→C	K/Q	2	2%
Total			18	19%
With no mutations in <i>rpsL</i>			73	80%
Gene <i>rrs</i>				
483	A → T [*]	--	2	2.2%
485	A → G [*]	--	2	2.2%
496	G → A [*]	--	2	2.2%
513	A → C	--	8	8.8%
516	C → T	--	6	6.6%
795	C → T [*]	--	6	6.6%
870	C → T [*]	--	3	3.3%
907	A → C [*]	--	3	3.3%
Total			32/26^{**}	35%/28%^{**}
With no mutations in <i>rrs</i>			65	71%
Total number of isolates without mutations			47	52%

(*), novel mutations

(**), 6 isolates showed more than one mutation

Table 1: Mutations in *rpsL* and *rrs* in isolates from southeast Mexico

8: Artículo Científico Enviado para publicación

Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Mexico

Betzaida Cuevas-Córdoba¹, Sheila Oyuki Xochihua-González¹, Aremy Cuellar², Javier Fuentes-Domínguez³, Roberto Zenteno-Cuevas^{2,4*}

¹Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana.

²Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz, Servicios de Salud de Veracruz.

³Programa estatal de Mycobacteriosis, Servicios de Salud de Veracruz.

⁴ Centro de Investigaciones Biomédicas en Enfermedades Infecciosas, Veracruz, Mexico.

* Corresponding author

R. Zenteno-Cuevas

Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana

Av. Luis Castelazo Ayala s/n, A.P. 57

Col. Industrial Animas

Xalapa, Veracruz, 91190, México

Running head: *pncA* mutations in *Mycobacterium* isolates from Mexico.

Key Words: Tuberculosis, drug, resistant, pyrazinamide, *pncA*, mutations.

Word count: 2515 words.

Tables: 3

Author's contact email, contributions and conflicts of interest:

B. C-C: betsaida_20@hotmail.com

Contribution: Sequencing and analysis of the *pncA* sequences and co-writing of this document. The author claims no conflicts of interest. CONACYT Fellow, no.171183

SO. X-G: sheilaoyuki@hotmail.com

Contribution: Laboratory support and sequencing of *pncA*. The author claims no conflicts of interest

A.C: acuellar@ssaver.gob.mx

Contribution: Clinical isolation of mycobacterium and drug susceptibility test. The author claims no conflicts of interest.

J. F-D: fjfuentes@ssaver.gob.mx

Contribution: Analysis of the epidemiological and clinical information of the patients. The author claims no conflicts of interest.

R. Z-C: robzencue@gmail.com

Contribution: Analysis and integration of all data and co-writing of this document. Received financing by CONACyT-COVECyT No. 95819. The author claims no conflicts of interest.

Abstract

Setting: Numerous studies have linked mutations in the *pncA* gene with resistance to pyrazinamide (Z+) in tuberculosis. However variations in these mutations are a function of the country from which the isolates originate.

Objective: To characterize the changes in *pncA* from isolates of tuberculosis with resistance to Z from Mexico patients.

Methods: From individuals suspected of carrying drug resistant tuberculosis, mycobacterium was isolated and susceptibility determined. In isolates with resistance to pyrazinamide, the *pncA* gene

and its promoter were analyzed by capillary sequencing.

Results: From 127 drug-resistant isolates collected, 42 (33%) were Z+. The *pncA* sequences showed 26 changes in 34 (81%) isolates: 18 SNPs (n=26, 62%), 4 insertions (n=4, 9.5%) and 4 deletions (n=4, 9.5%). Absence of modifications was observed in 8 (19%) sequences/isolates. The most frequent changes were mutations L120P (n=7) and

K96R (n=4). Some 12 (46%) of the changes found are by first time reported.

Conclusion: This is the first description of modifications in *pncA* gene in isolates resistant to pyrazinamide originating in Mexico. The diversity of changes suggests an important variety of isolates circulating in the region, and underlines the difficulties for the development or use of genotypic methods for the diagnosis of resistance to pyrazinamide.

Introduction

In spite of collective efforts, tuberculosis (TB) remains one of the most important diseases affecting mankind. In 2010, the World Health Organization (WHO) estimated that a third of the global population was infected, and reported an incidence of 8.8 million cases with the mortality of 1.45 million people¹.

Most of the drugs currently employed for the TB treatment have been used for over half a century, that in combination with poor antibiotics management, has allowed the development of strains resistant to the anti-tuberculosis drugs². The WHO estimates that, depending on the country, 3 to 4.4% of TB cases are multi-drug-resistant (TB-MDR) i.e exhibit simultaneous resistance to isoniazid and rifampicin; and of this, 3.4 to 7.5 are extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB)².

Pyrazinamide (Z) has been used for the treatment of TB since 1952. It is a pro-drug that enters the TB bacillus by passive diffusion, and is hydrolyzed by the enzyme pyrazinamidase (Pzase), converting Z to pyrazinoic acid (POA)³⁻⁴. POA is then pumped to the exterior of the bacteria, where it is protonated to H⁺-POA and reenters the bacteria. Inside the TB bacillus, H⁺ is released and the POA is again pumped to the exterior, the

cyclical repetition of this process increases the acidification inside the bacteria contributing to the lethal effect³⁻⁴.

The enzyme Pzase is codified by the *pncA* gene; numerous studies have linked mutations insertions and deletions scattered throughout the gene and its promoter with the loss of enzymatic function and therefore generation of drug resistance to Z³⁻⁸. The recent determination of the Pzase crystal structure, confirms that most of the changes observed in the gene are mainly associated with the catalytic binding site and surrounding area⁹.

It is important to identify the genetic changes present in *pncA*, in order to understand the molecular mechanisms involved with resistance to pyrazinamide, this is useful because help to guide the implementation of molecular diagnostic tests; however, variations in these mutations are a function of the country⁴⁻⁷. Therefore the goal of this study was to characterize the genotypic changes of *pncA* in isolates resistant to pyrazinamide originating in Mexico.

Materials and methods

Collection of clinical samples, isolation of mycobacterium, drug susceptibility

test and patient epidemiological characteristics

Between 2007 to 2010 sputum samples from patients with a clinical confirmation of TB and suspicious of carrying DR-TB were collected by the Mycobacteriology Department of the Public Health Laboratory of the State of Veracruz, Mexico. Sputum decontamination was performed using N-acetyl-L-Cysteine-NaOH and the primary isolation of mycobacteria was developed with Löwenstein-Jensen medium. Susceptibility testing was performed in duplicate following the fluorometric method (BACTEC; MGIT 960 Becton-Dickinson) for first line drugs; streptomycin (S), isoniazid (H), rifampin (R) and ethambutol (E). Susceptibility against pyrazinamide was done with the PZA kit, at pH of 5.9 and 100 µg/ml of Z (BACTECT; MGIT 960 Becton-Dickinson).

Variables such as age, gender, place of residence, type of treatment, associated diseases such as diabetes, HIV, cancer, malnutrition, anemia; and addiction to smoke, alcohol and drugs, were recovered from the clinical summaries of the patients.

DNA purification and amplification of *pncA* gene

Extraction of DNA from the Z resistant clinical isolates was conducted with one loop of cultured mycobacteria, according to Van Soolingen¹⁰. DNA was re-suspended in nuclease-free water, and the concentration determined by spectrophotometry in a Nanodrop 100 (ThermoScientific, USA). The DNA solution was then stored at -20 °C until use.

The complete *pncA* gene and promoter (nucleotides -80 to 590) were amplified by PCR using the primers: PF 5'GGCGTCATGGACCCTATATC3' and

PR 3'CAACAGTTCATCCCCG GTTC5'¹¹. The PCR reaction mix consisted of: 10mM Tris pH 8, 1.5mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 10µM of PF and PR primers, 1.25U Taq polymerase (Promega, USA), 5% glycerol, 100ng DNA template and topped up with nuclease-free water in a final volume of 25µl. Amplification was performed in a Veriti thermocycler (Applied Biosystems, USA) according to the following conditions: 95 °C for 3m, 35 cycles of 95 °C for 40s; 57 °C for 30s and 72 °C for 1m, and a final extension at 72 °C for 3m. Products were electrophoretically separated in 1.5% agarose gel, and further purified using Amicon Ultra centrifugal filters, (Millipore, Ireland). Final concentration was determined by electrophoresis, using the Mass Ruler low range DNA Ladder (Fermentas, USA).

Sequencing of *pncA* gene from the mycobacteria isolates

The sequencing reactions were performed in forward and reverse directions using 6µl of Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 (Applied Biosystems, USA), 3.2pM of PF and PR primers and 20ng of purified PCR product in a final volume of 20µl. Amplification conditions were 25 cycles of 95 °C for 30s, 50 °C for 15s and a final step of 60 °C for 4m.

The amplified products were purified using the ZR DNA sequencing clean-up kitTM (Zymo Research, USA), re-suspended in Hi-Di formamide (Applied Biosystems, USA), heated to 95 °C for 5m, cooled on ice, and finally loaded onto a 96-well plate MicroAmp reaction plate (Applied Biosystems, USA).

Sequencing of the DNA products were done by capillary electrophoresis in a Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, USA). Fluorescence spectra

were analyzed with the software Data Collection V1.01 (Applied Bio-systems, USA). Analysis of the sequences and identification of the mutations were performed using the Sequencing Analysis V5.4 and SeqScape V2.7 programs (Applied Bio-systems, USA). The wild type *pncA* gene from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Gene Bank accession number: 888260) was used as the reference sequence. It is important to highlight that sequences were included in the analysis only if they presented quality values of individual mutation and sample score greater than 20, ensuring that the error in the assignment of the base was less than 1%.

Statistics and correlation with patient characteristics

Analysis of the data from the patients included in the study was carried out using descriptive and analytical statistics. In order to identify the factors of association the tests: chi square with Yates's correction, Fisher exact, Anova and Kruskal Wallis were used. Risks for the variables recovered were evaluated using Odds Ratio (OR), considering a value of $p < 0.05$ to be significant.

Results

Characteristics of the isolates and population

In the period, 127 isolates of *Mycobacterium* from the same number of patients were recovered, 33% (42) were resistant to pyrazinamide (Z+) and 67% (85) sensitive (Z-). The most common resistances were to isoniazid (83%) and rifampicin (70%). Multi drug resistance (MDR) was found in 66% (n=84) of the isolates and 20% were resistant to the five first line drugs. Only the 23% of the individuals were undergoing a primary

treatment. The average age of individuals was 45 years, 65% were male, and the most frequent co-morbidity was diabetes in 29% of the cases (Table 1).

Of the total number of Z+ isolates (42), 76% (32) showed resistance to S, 97% (41) to H, 97% (41) to R and 85% (36) to E. Some 97% (41) were MDR, which 10 (24.4%) were new cases and 31 (75.6%) previously treatment. Isolates resistant to the five first line drugs were observed in 59% (25) (Table 1); and none of the isolates were mono-resistant to Z. The characteristics of the population showed that 62% (26) were male, the male:female ratio was 1.6:1, and the mean age of the group was 47 years. Diabetes mellitus (DM) was observed in 28% (12), malnutrition in 7% (3), anemia in 7% (3), and no cases of HIV or cancer were identified. Alcohol consumption was reported in 12% (5), and 5% (2) presented drugs consumption. With relation to the type of treatment against TB, 76% (32) were undergoing retreatment and 24% (10) were in primary treatment.

In the Z- isolates (85), we found that 60% (51) were resistant to S, 76% (65) to H, 56% (48) to R and 37% (32) to E. MDR was observed in 50% (43) of the isolates (Table 1). In patients with Z- isolates, we found that 67% (57) were male, the mean age was 43 years; 29% (25) had DM, 1% (6) malnutrition, 2% (2) anemia and 2% (2) cancer; 14% (12) reported alcohol and 4% (4) drug addiction. According to the type of treatment against TB, 77% (66) were found with a retreatment and 22% (19) with primary treatment.

The analysis of risk variables between the Z+ and Z- groups (Table 1) showed no significances. Nevertheless associations were observed between resistance to Z and other drugs such as; H (OR=12), R (OR=31), E (OR =10) and the MDR (OR= 40). Also, we found statistic differences between means number of

drug resistances in Z+ isolates (4.5) regard to Z- isolates (2.3).

Changes in the *pncA* gene

The *pncA* sequence analysis of 42 Z+ isolates showed changes in 34 cases (81%) and grouped in three types: insertions (n=4), deletions (n=4) and point mutations or SNPs (n=26). None of the isolates showed changes in the promoter region, and eight (19%) showed no changes at all.

Four isolates (9%) showed insertions, (Table 2). The isolates 07-011, 09-218 and 07-012 showed frameshift and stop codon at amino acids 56, 127 and 160 respectively. By last the isolate 08-375 only shows an insertion and frameshift at codon 131.

Deletions were observed in four (9%) isolates (Table 2). Isolate 09-466 showed a deletion of 30 bases, starting at codon 127, which resulted in lost of 10 amino acids. Isolate 09-088, had a deletion of nine bases, starting at codon 127 and causing lost of three amino acids. The isolate 07-409 deleted only one base at nucleotide 440, generating a change in the reading frame and one stop codon at amino acid 160. Finally, the isolate 08-619 presented one deletion of 10 bases at nucleotide 487, losing three amino acids starting at codon 163 and changing the reading frame.

Table 3 describes the 18 SNPs identified in the *pncA* gene from 26 Z+ isolates. The most frequent change, observed in seven isolates, was at L120P (nucleotide 359, T→C), followed by K96R present in four isolates, (nucleotide 287, A→G). Double mutations were observed in three isolates: Isolate 08-723 showed two SNPs at D49H and A102V. Isolate 09-629 show the synonymous mutation at G75G and the SNP P54L. Finally isolate 09-753, presented the same synonymous mutation G75G but the SNP L172P.

Discussion

According to national official data, the annual incidence of TB in Mexico is close to 14 cases per 100,000 habitants with an annual estimate of cases close to 17,000. In agreed to the Pan-American Health Organization¹², Mexico ranks fourth for estimated numbers of incidence TB cases in the region of the America, and ranks third for estimated cases of MDR-TB; and also have reports of XDR-TB cases.

The isolates here analyzed were collected from Veracruz; this state is the source of 10% of the TB and 35% of the DR-TB cases reported nationally every year, and has one of the highest prevalent populations of patients with MDR-TB (175 cases). For these reasons, it is considered one of the most important contributors to the DR-TB phenomenon in Mexico¹³. In this sense 66% (84), of the patients here analyzed were MDR, from which 23% were undergoing primary treatment; this confirms the magnitude of the MDR-TB dispersion and the levels of transmission of secondary resistance, marking the onset of a potential public health problem.

Of the patients with resistance to pyrazinamide, 59% were simultaneously resistant to all the first line drugs and showed, on average, resistance to 4 drugs; on the contrary no resistant to all drugs was observed in the Z- strains and the average number of resistances was two drugs. These data explain the significant associations observed with the Z+ isolates, the drugs H, R, E and the MDR (Table 1).

Mono-resistance to Z and the H57D mutation, which is sufficient to inactivate the Pzase, are strongly associated with the presence of *M. bovis*^{3,4}. In the isolates here analyzed, both characteristics were totally absent; despite that several of the individuals were from regions with

significant livestock activity. This behavior is described in other reports^{5,14-17}; and it follows that the presence of TB with resistance to pyrazinamide in the area is predominantly caused by *M. tuberculosis* and the transmission occurs mainly among humans.

To our knowledge, this is the first report to describe the changes identified by capillary sequencing in the *pncA* gene from a collection of Z+ isolates from Mexico. Based in our information we can confirm with a high level of confidence the occurrence of four insertions, four deletions, and 18 point mutations. In total 26 changes were found in 34 of 42 isolates Z+, this number of changes is not a sole phenomenon and has been reported in countries such as United States of America, where 37 changes in 60 isolates were described¹⁸⁻¹⁹; Brazil, with 29 changes in 40 isolates²⁰; Portugal, with 49 changes in 53 isolates²¹; China, where 32 and 41 changes were described in 35 and 44 isolates^{15,22}; Korea with 92 changes in 95 isolates¹⁷; and South Africa, with 10 changes in 15 isolates¹⁴.

Eight (19%) of the isolates with resistance to pyrazinamide were absent of any alteration on the sequenced *pncA* gene. This lack of changes has been also described^{14,17,19}, and explained in part by the presence of false positives as a result of the characteristics necessary by pyrazinamide in the culture media used by the MGIT system^{4,23}. In addition, recently has been suggested the involvement of an alternative mechanism of resistance to Z, through defects in the uptake of pyrazinoic acid by mutations in the ribosomal protein S1(RpsA)²⁴. At the moment we are evaluating, in these isolates, different concentrations of pyrazinamide and the participation of mutations in RpsA.

The most common mutations founded, L120P (n=7) and K96R (n=4), explained

the resistance to Z in 26% of Z+ isolates analyzed. Mutation at L120P has only been reported in isolates from Portugal²², however this is the first report of the mutation at K96R. In this sense, after a comparative analysis^{5,6, 8, 16-23, 25-29}, this is the first report of insertions at nucleotides 141 and 375, the four deletions and the six mutations (D63A, F94S, K96R, V125F, A143P, T160K), this mean the 46% of the changes found.

The main limitation of our study was the restricted number of isolates recovered with resistance to pyrazinamide. However the absent, diversity and occurrence of changes found in the *pncA* gene suggest an important variety of DR-TB strains generating and circulating in this region of Mexico, observation supported by other reports from the same area³⁰⁻³¹. Nevertheless, is necessary to increase the number of isolates resistant to pyrazinamide, including other regions of Mexico and strain of *M. bovis*, in order to characterize with more detail and precision the diversity and frequency of the changes in the *pncA* gene.

Conclusion

We can conclude that the molecular changes found in *pncA* gene conforms a very particular scenario for the generation of resistance against pyrazinamide in the region studied; this will have important repercussions to health services, and the design or implementation of genotypic methods for the diagnosis of resistance to pyrazinamide.

References

- 1 WHO: Global tuberculosis control: WHO Report 2011; in WHO (ed), 2011. Available in: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf

- 2 WHO: Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response; in WHO (ed), 2010. Available in: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf.
- 3 Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*. 1996;2:662-7.
- 4 Zhang Y MD: The curious characteristics of pyrazinamide: A review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:6-21.
- 5 Lemaître N SW, Truffot-Pernot C, Jarlier V.: Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase *pncA*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1761-1763.
- 6 Zimic M SP, Quiliano M, Gutierrez A, Gilman RH: Peruvian and globally reported amino acid substitutions on the *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase suggest a conserved pattern of mutations associated to pyrazinamide resistance. *Infect Genet Evol* 2010;10:346-349.
- 7 Sandgren A SM, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, et al.: Tuberculosis drug resistance mutation database. *PLoS Med* 2009;6.
- 8 Scorpio, A., P. Lindholm-Levy, et al.. "Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; **41**(3): 540-543.
- 9 Petrella S G-ZN, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W.: Crystal structure of the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PLoS One* 2011;6
- 10 Van Soolingen D dHP, Kremer K: Restriction fragment length polymorphism typing of mycobacteria. *Methods Mol Med* 2001;54:165-203.
- 11 Sekiguchi J M-A, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, et al: Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007;45:179-192.
- 12 PAHO/WHO. Tuberculosis in the Region of the Americas 2009. Regional Report: Epidemiology, Control and Financing. Pan American Health Organization, Washington DC, 2011. Disponible en http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16315&Itemid=
- 13 Zenteno-Cuevas R, Fuentes-Dominguez J, Lara-Gonzalez JL, Escobar-Mesa A.: Dynamics of multidrug resistant tuberculosis in Veracruz, Mexico between 2002 and 2008. *J Infect Dev Ctries* 2010;4:776-778.
- 14 Bishop KS BL, Trollip AP, Smith AN, Roux L, York DF, Kiepiela P.: Characterisation of the *pncA* gene in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Gauteng, South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:952-957.
- 15 Hou L DO-H, Z Zhang, B Wang, A Yang, K Kano K,: Molecular characterization of *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from china. *Epidemiol Infect* 2000 124:227-232.
- 16 Juréen P WJ, Toro JC, Hoffner S.: Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium*

- tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:1852-1854.
- 17 Lee KW LJ, Jung KS.: Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. J Korean Med Sci 2001;16:537-543.
 - 18 Morlock GP PB, Crawford JT.: Characterization of spontaneous, in vitro-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37rv. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:3298-3301.
 - 19 Scorpio A L-LP, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y.: Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:540-543.
 - 20 Rodrigues Vde F TM, Ribeiro MO, Cafrune PI, Rossetti ML, Zaha A.: Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:444-446.
 - 21 Portugal I BL, Moniz-Pereira J, Brum L.: *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:2736-2738.
 - 22 Zhang H BL, Li CY, Sun ZG, Deng JY, Zhang XE.: Mutations found in the *pncA* gene of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical pyrazinamide-resistant isolates from a local region of China. J Int Med Res 2009;37:1430-1435.
 - 23 Werngren J, Sturegård E, Juréen P, Ångebyc K, Hoffner S, Schön T. Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against pyrazinamide using wild-type MIC distributions and *pncA* gene sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:1253-7.
 - 24 Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, Wang H, Zhang W, Zhang Y: Pyrazinamide inhibits translation in mycobacterium tuberculosis. Science 2011:1630-1632.
 - 25 Somoskovi A DJ, Parsons LM, Kaswa M, Goh KS, Rastogi N, Salfinger M.: Sequencing of the *pncA* gene in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has important diagnostic applications: Identification of a species-specific *pncA* mutation in "*Mycobacterium canettii*" and the reliable and rapid predictor of pyrazinamide resistance. J Clin Microbiol 2007;45:595-599.
 - 26 Tracevska T JI, Baumanis V, Nodieva A, Marga O, Skenders G.: Spectrum of *pncA* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Latvia. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3209-3210.
 - 27 Hirano K TM, Kazumi Y, Fukasawa Y, Abe C.: Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber Lung Dis 1997;78:117-122.
 - 28 Marttila HJ MM, Vyshnevskaya E, Vyshnevskiy BI, Otten TF, Vasilyef AV, Viljanen MK.: *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Northwestern Russia. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1764-1766.
 - 29 Sreevatsan S PX, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM.: Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:636-640.
 - 30 Zenteno-Cuevas R, Cuevas-Cordoba B, Enciso A, Enciso L, Cuellar A. Assessing the utility of three TaqMan

- probes for the diagnosis of tuberculosis and resistance to rifampin and isoniazid in Veracruz, México. *Can J Microbiol.* 2012;58(3):318-25.
- 31 Zenteno-Cuevas R. Zenteno J.C. Cuellar A. Cuevas B. Sampieri C. Riviera JE. Parissi A. Mutations in the *rpoB* and *katG* genes in resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Veracruz, Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009, 104;4: 468-472.

Table 1. General characteristics and risk variables analysis in patients with a pyrazinamide resistant (Z+) or sensitive (Z-) isolate.

Change Phenotypic	S	H	R	E	TB-MDR (R+H)	Mean Number of resistances	Gender Male	Mean Age	Diabetes mellitus	Re-treatment
<i>Total (n=127)</i>	65.4%	83.5%	70.1%	53.5%	66.1%	3.1 (±1.4)	65.4%	45.0 (±15.1)	29.1%	77.2%
Z+ (n=42)	76.2%	97.6%	97.6%	85.7%	97.6%	4.5 (±0.6)	61.9%	47.8 (±16.0)	28.6%	76.2%
Z- (n=85)	60%	76.5%	56.5%	37.6%	50.6%	2.3 (±1.0)	67.1%	43.6 (±14.6)	29.4%	77.6%
OR, Z- vs. Z+ (p value)	2 (0.1 [¥])	12 (0.001[§])	31 (0.001[§])	10 (0.001[¥])	40 (0.001[§])	NA (<0.01 ^{**})	0.8 (0.70 [¥])	NA (0.15 [*])	0.96 (0.91 [¥])	0.92 (0.96 [¥])

OR) Odds Ratio, ¥) Chi square with Yates's correction, §) Fisher Exact Test, *) Anova, **) Kruskal- Wallis for two groups. NA) Not apply to measure risk, is a difference of means test.

Table 2. Insertions and deletions in *pncA* gene in pyrazinamide resistant (Z+) isolates from Veracruz, Mexico

Code	Nucleotide	Codon	Resistances
<i>Insertions</i> (n=4)			
07-011	141* (GGCAACC)	47/CF** stop codon at AA ¹ 56	SHREZ
09-218	375* (C)	126/CF stop codon at AA 127	SHREZ
07-012	390 (GG)	131/CF stop codon at AA 160	SHREZ
08-375	391 (G)	131/CF	HREZ
<i>Deletions</i> (n=4)			
09-466	379-408* (30 bases)	127-136	SHREZ
09-088	380-388* (9 bases)	127-129	SHREZ
07-409	440* (1 base)	147/ CF stop codon at AA 160	HREZ
08-619	487-496* (10 bases)	163/CF	SHREZ

*) change without previous description. **) Change in Frameshift; 1) Amino acid.

Table 3: SNP's in *pncA* gene in pyrazinamide resistant isolates from Veracruz, Mexico

Code (n=26)	Nucleotide	Amino Acid	Cumulative Percentage	Resistances
08-305	35 A → C	D12A	4.7%	HREZ
09-303				SHREZ
07-535	139 A → G	T47A	2.3%	HREZ
08-723**	145 G → C	D49H	2.3%	SHREZ
09-629**	161 C → T	P54L	2.3%	HREZ
09-164	188 A → C *	D63A	2.3%	SHREZ
10-398	202 T → G	W68G	2.3%	SHREZ
07-054	211 C → T	H71Y	2.3%	SHREZ
09-629**	225 T → C*	G75G	4.7%	HREZ
09-753**				HREZ
10-718	226 A → C	T76P	2.3%	SHREZ
10-661	281 T → C *	F94 S	2.3%	SHRZ
07-063	287 A → G *	K96R	9.5%	HREZ
07-123				SHREZ
09-665				SHREZ
10-009				SHRZ
08-723**	305 C → T	A102V	2.3%	SHREZ
07-053	359 T → C	L120P	16.6%	HREZ
08-492				SHREZ
09-171				HREZ
09-325				HREZ
09-416				SHREZ
09-475				HREZ
09-687				HREZ
10-327				374 G → T*
10-785	415 G → C	V139L	2.3%	SHREZ
10-475	427 G → C *	A143P	2.3%	SHREZ
09-557	479 C → A *	T160K	2.3%	SHREZ
09-753**	515 T → C	L172 P	2.3%	SHRZ

**) Isolates with double mutations. *) SNP without previous description.