



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**“Mutaciones en los genes asociados a la resistencia a
antibióticos de primera línea en cepas de *Mycobacterium
tuberculosis* aisladas en Michoacán en 2012-2014”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

BRISEIDA BENIGNA ALCAZAR CONTRERAS

DIRECTORA DE TESIS:

**DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA) MA. SOLEDAD VÁZQUEZ
GARCIDUEÑAS**

Morelia, Mich. Mayo, 2016



AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta este día, por guiarme y ayudarme en todo momento.

A mis padres por todo el cariño brindado, por los buenos consejos, por enseñarme que los sueños se logran a base de esfuerzo y dedicación, y agradezco también que me hayan brindado los medios necesarios para que pudiera realizar mis estudios.

A mis hermanos Sandra, Pedro, Liliana, Roberto y Emiliano por los hermosos momentos compartidos, por todo el apoyo que me han dado en todos los sentidos y por seguir alegrando mi vida.

A mis sobrinos por ser tan lindos y por siempre hacerme sonreír.

A mi novio por estar a mi lado y apoyarme en todo momento, incluso en los momentos de estrés y mal humor, gracias.

A mi asesora, la Dra. Sol por la confianza para la realización de este proyecto, por compartir sus conocimientos y tiempo conmigo, por su paciencia, ayuda y por darme la oportunidad de formar parte de este excelente grupo de trabajo, del que me llevo gratos recuerdos.

A Ana, Erandi, Mar, Mariana, Paulina, por resolver mis dudas en todo momento, por compartir sus conocimientos y por la bonita amistad que me brindaron.

A mis compañeros y amigos de la licenciatura Sandra, Fany, Issa, Ariel, Julio, Jonatan por haber formado una gran amistad y ser parte de experiencias inolvidables.

A mi compañeras de casa y amigas Marleny, Azucena, Kislev y Triny, por todos los momentos compartidos y por formar parte muy importante en mi vida.

Gracias a toda mi familia, compañeros de laboratorio, amigos y a todas las personas que de alguna manera colaboraron para que esto que esto fuera posible.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la U.M.S.N.H., bajo la dirección de la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas y en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán.

Se contó con el apoyo de los Proyectos:

- 16.4/CIC-UMSNH “Diversidad genética de aislados clínicos de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de regiones con mayor incidencia del Estado de Michoacán”
- CONACyT/FORDECyT/ST 346/2012, “Análisis genómico epidemiológico del complejo *M. tuberculosis* en los estados de Querétaro, Guanajuato y Michoacán” del Fondo Institucional del Fomento Regional para el Desarrollo, Científico, Tecnológico y de Innovación”
- MICH-2012-C05-197631 “Hacia una estrategia integral para el control y tratamiento de la tuberculosis humana en Michoacán: evidencia epidemiológica y genética del Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Michoacán.

La realización de este trabajo también fue posible gracias a la beca otorgada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación del Gobierno del Estado de Michoacán.

CONTENIDO

ÍNDICE GENERALI

ÍNDICE DE TABLASIII

ÍNDICE DE FIGURASIV

ABREVIATURASV

RESUMENVIII

ABSTRACTIX

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1.1 Agente causal de la Tuberculosis.	- 1 -
1.2 Epidemiología.....	- 2 -
1.3 Características bioquímicas de <i>M. tuberculosis</i>	- 2 -
1.4 Ciclo infectivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	- 4 -
1.5 Tratamiento contra la tuberculosis	- 4 -
1.6 Mecanismos de acción de los fármacos anti-TB de primera línea.....	- 6 -
1.6.1 Isoniazida (INH)	- 6 -
1.6.2 Rifampicina (RIF).....	- 7 -
1.6.3 Pirazinamida (PZA)	- 7 -
1.6.4 Etambutol (EMB)	- 8 -
1.6.5 Estreptomicina (SM).....	- 9 -
1.7 Resistencia a antibióticos de los miembros del CMTB.....	- 9 -
1.8 Mecanismos de resistencia.....	- 10 -
1.8.1 Mecanismos de Resistencia Intrínseca.....	- 11 -
1.8.2 Mecanismos de Resistencia Adquirida	- 11 -
1.9 Características de los genes relacionados con la resistencia a isoniazida (INH), rifampicina (RIF) y estreptomicina (SM).....	- 12 -
1.9.1 <i>katG</i>	- 12 -
1.9.2 <i>rpoB</i>	- 12 -
1.9.3 <i>rpsL</i>	- 13 -
1.10 Mutaciones o Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNPs)	- 13 -
1.11 Métodos para la detección de drogo-resistencia	- 14 -
1.11.1 Métodos fenotípicos.....	- 14 -
1.11.2 Métodos genotípicos.....	- 14 -
1.12 Antecedentes	- 15 -
2. JUSTIFICACIÓN.....	- 16 -
3. HIPÓTESIS.....	- 16 -

4. OBJETIVOS.....	- 17 -
4.1 Objetivo general.....	- 17 -
4.2 Objetivos específicos.....	- 17 -
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	- 18 -
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 19 -
6.1 Material biológico.....	- 19 -
6.2 Manejo de muestras	- 19 -
6.3 Prueba de susceptibilidad a antibióticos	- 19 -
6.4 Extracción de ADN.....	- 20 -
6.5 Amplificaciones por PCR	- 21 -
6.6 Secuenciación	- 22 -
6.7 Análisis de datos	- 22 -
7. RESULTADOS	- 23 -
7.1 Calidad del ADN	- 23 -
7.2 Amplificaciones por PCR	- 23 -
7.3 Secuenciación	- 26 -
7.4 Detección de SNP's.....	- 27 -
7.4.1 Polimorfismos "sinónimos " o "no sinónimos"	- 28 -
7.4.2 Polimorfismos en los genes <i>katG</i> , <i>rpoB</i> y <i>rpsL</i>	-28-
7.5 Antibiógramas	- 29 -
7.6 Relación entre resistencia a antibióticos y presencia de mutaciones	- 31 -
7.7 Análisis comparativo entre los resultados obtenidos y otros reportados.	- 31 -
8. DISCUSIÓN.....	-33-
9. RESUMEN DE RESULTADOS.....	- 36 -
10. CONCLUSIÓN.....	- 37 -
11. BIBLIOGRAFÍA.....	- 38 -

ÍNDICE DE TABLAS

1. INICIADORES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.....	-21-
2. MUTACIONES ENCONTRADAS EN LAS CEPAS DE ESTUDIO.....	-28-
3. POLIMORFISMOS ENCONTRADOS EN LOS GENES DE ESTUDIO.....	-29-
4. ANTIBIOGRAMAS DE LAS 13 CEPAS DE ESTUDIO.....	-30-
5. RELACIÓN ENTRE RESISTENCIA Y PRESENCIA DE MUTACIONES.....	-31-
6. RESULTADOS OBTENIDOS Y OTROS RESULTADOS REPORTADOS.....	-32-

ÍNDICE DE FIGURAS

1. ADN DE LAS CEPAS DE ESTUDIO.....	-23-
2. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>katG</i> , <i>rpsL</i> Y <i>rpoB</i> CON EL ADN DE LA CEPA DE REFERENCIA (H37RV).....	-24-
3. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS CON EL ADN DE CADA UNA DE LAS CEPAS DE ESTUDIO.....	-25-
4. ELECTROFEROGRAMAS.....	-26-
5. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE EN EL PROGRAMA MEGA 6.06 DEL GEN <i>katG</i> DE LAS CEPAS DE ESTUDIO.....	-27-
1. RESISTENCIA A MEDICAMENTOS.....	-30-

ABREVIATURAS

A:	Adenina
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
Ala:	Alanina
Am:	Amikacina
Arg:	Arginina
BLAST:	Basic Local Aligment Search Tool
C:	Citosina
°C:	Grados Centígrados
Cm:	Capreomicina
CENAPRECE:	Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades
Cs:	Ciclocerina
CMTB:	Complejo Mycobacterium tuberculosis
EMB:	Etambutol
Eto:	Etionamida
FDA:	Food and Drug Administration
g:	Gravedad
G:	Guanina
HGMS:	Hospital General Dr. Miguel Silva
IMSS:	Instituto Mexicano del Seguro Social
INH:	Isoniazida

Km:	Kanamicina
Leu:	Leucina
LESP:	Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán
Lfx:	Levofloxacin
M:	Molar
MDR-TB:	Tuberculosis Multidrogo-resistente
Mfx:	Moxifloxacin
MTB:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAD:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADP:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NOM:	Norma Oficial Mexicana
Ofx:	Ofloxacin
OMS:	Organización Mundial de la Salud
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
POA:	Ácido Pirazinoico
POAH:	Ácido Pirazinoico Protonado
Pto:	Protionamida
R:	Resistente
RRDR:	Rifampicin Resistance-Determining Region
ARNm:	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNt:	Ácido Ribonucleico de transferencia
PZA:	Pirazinamida
RIF:	Rifampicina

ARN:	Ácido Ribonucleico
S:	Sensible
Ser:	Serina
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SM:	Estreptomicina
SNP's:	Polimorfismos de un solo nucleótido
sSNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido sinónimo
NSNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido no sinónimo
T:	Timina
TB:	Tuberculosis
TBTF:	Tuberculosis en Todas sus Formas
TDR-TB:	Tuberculosis Totalmente Drogo-Resistente
Thr:	Threonina
UV:	Ultra violeta
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WHO:	World Health Organization
XDR-TB:	Tuberculosis Extremadamente Drogo-Resistente

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que afecta principalmente a los pulmones y se cree que se originó hace más de 150 millones de años. La afección es curable y se puede prevenir. El tratamiento contra la tuberculosis comprende seis meses con rifampicina, isoniazida, estreptomycin, etambutol y pirazinamida; sin embargo, este se ha ido complicando con la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes, estas cepas se han clasificado como Multidrogorresistentes (MDR-TB) y extremadamente drogorresistentes (XDR-TB). Se han encontrado asociaciones entre mutaciones en el gen *katG* y la resistencia a isoniazida; el gen *rpoB* y la resistencia a rifampicina y el gen *rpsL* y la resistencia a estreptomycin. La presencia y frecuencia de estas mutaciones puede variar de acuerdo a la zona geográfica. En este trabajo se realizaron los antibiogramas de 13 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* recolectadas del 2012 al 2014 en el estado de Michoacán. Los antibiogramas fueron realizados mediante el equipo BACTEC-MGIT 960. Como resultado se encontró que el 23.1% de las cepas mencionadas fue resistente a rifampicina y a estreptomycin. Las mutaciones se detectaron mediante amplificación por PCR, secuenciación de las regiones de interés en los genes de estudio, y su alineamiento con el programa Mega 6.06. Los resultados se compararon con TB Database y TB Drug Resistance Mutation Database. El gen *katG* presentó el mayor número de mutaciones con un 46.15%, el gen *rpoB* presentó solo una mutación (7.69%) y el gen *rpsL* no presentó ninguna mutación. Las dos cepas resistentes a isoniazida presentaron la mutación Ser315Thr reportada ya en la base de datos y reportada en la literatura como la más común. De las tres cepas resistentes a rifampicina, sólo una presentó mutación, la mutación Ser450Leu en el gen *rpoB*, lo que coincide con otros estudios realizados

en el país, pero que se encuentra fuera de la región RRDR donde aparece la mayoría de las mutaciones según la literatura.

PALABRAS CLAVE: tuberculosis, medicamentos, resistencia, mutaciones, cepas.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, a bacterium that primarily affects the lungs and is believed to have originated over 150 million years ago. The disease is curable and preventable. The treatment against TB comprises six months of rifampin, isoniazid, streptomycin, ethambutol and pyrazinamide; however, this has been complicated by the surface of resistant strains of *M. tuberculosis*. These strains are classified as multidrug (MDR-TB) and extremely drug resistant (XDR-TB). Associations have been found between mutations in the *katG* gene and resistance to isoniazid, the *rpoB* gene and rifampicin resistance, and *rpsL* gene and streptomycin resistance. The presence and frequency of these mutations may vary according to the geographical area. In this research, antibiograms were performed to 13 *Mycobacterium tuberculosis* strains collected from 2012 to 2014 in the state of Michoacan. The antibiograms were performed using the equipment BACTEC-MGIT 960. As a result it was found that 23.1% of the mentioned strains were resistant to rifampicin and streptomycin. The mutations were detected by PCR amplification, sequencing the regions of interest in the study genes, and their alignment with the software 6.06 Mega. The results were compared with the TB Database and the TB Drug Resistance Mutation Database. The *katG* gene presented the highest number of mutations with 46.15%, the *rpoB* gene exhibited only one mutation (7.69%) and the *rpsL* gene presented no mutation. The two strains resistant to isoniazid showed the mutation Ser315Thr, already reported in the database and the most commonly reported in the literature. Of the three strains resistant to rifampin, only one showed a mutation, the Ser450Leu mutation in the *rpoB* gene, which coincides with other studies in the country, but this one is outside the RRDR region where most of the mutations appear according to the literature.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Agente causal de la Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por un miembro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, que suele afectar pulmones y hasta en 33% de los casos hay infección de otros órganos. Este agente causal de la TB en humanos pertenece al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), integrado por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum* (con dos subtipos), *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*. *M. bovis* se ha reportado también como agente causal de TB en humanos (Guillén-Nepita, 2010).

M. bovis produce tuberculosis en animales salvajes y domésticos; el ganado bovino es el mayor reservorio de esta especie, lo que también produce, con relativa frecuencia, enfermedad en el hombre. *M. caprae* y *M. microti* infectan al ganado caprino y a pequeños roedores, respectivamente, y ambas especies son causantes de casos de zoonosis, aunque en menor medida que *M. bovis*. *M. pinnipedii* es la especie que causa tuberculosis en pinnípedos, se aísla mayoritariamente en focas de varios continentes y por el momento no se han descrito casos de enfermedad en el hombre. *M. bovis-BCG* es una variante avirulenta obtenida en el laboratorio a partir de una cepa de *M. bovis* que por sucesivos pasos perdió su poder patógeno y mantuvo su capacidad antigénica; actualmente se le utiliza como vacuna para la prevención de la tuberculosis, como vehículo recombinante para otras vacunas y como tratamiento inmunógeno. Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, están infectadas por el bacilo pero aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección (Herrera-León, 2009).

1.2 Epidemiología

La tuberculosis es la segunda causa mundial de mortalidad, después del SIDA, causada por un agente infeccioso (WHO: Global Tuberculosis Control 2014). En 2013, 9 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones murieron por esta enfermedad. Aproximadamente un 60% de los casos de TB y de las muertes ocurren en hombres, aunque la carga de la enfermedad también es elevada en las mujeres. Más del 95% de las muertes por tuberculosis ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos, y esta enfermedad es una de las cinco causas principales de muerte en las mujeres entre los 15 y los 44 años. En 2013, se estima que 550 000 niños enfermaron de tuberculosis y 80 000 niños seronegativos murieron de tuberculosis. La tuberculosis es la causa principal de muerte de las personas infectadas por el VIH, pues causa una cuarta parte de las defunciones en este grupo. Se calcula que 480 000 personas desarrollaron tuberculosis multirresistente a nivel mundial en 2013. En promedio, se calcula que un 9,0% de los pacientes con TB-MR tenían TB ultrarresistente (TB-XR). La tasa de mortalidad por tuberculosis disminuyó un 45% entre 1990 y 2013. Se calcula que entre 2000 y 2013 se salvaron 37 millones de vidas mediante el diagnóstico y el tratamiento de la tuberculosis.

En México, la Secretaría de Salud (SSA) reportó en el 2014, a través del CENAPRECE (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades), 20 126 casos nuevos de tuberculosis en todas sus formas, de los cuales 16 237 casos fueron de tuberculosis pulmonar y 313 de tuberculosis meníngea (CENAPRECE). En Michoacán, en el 2014 se reportaron 324 casos nuevos de tuberculosis en todas sus formas (CENAPRECE).

1.3 Características bioquímicas de *M. tuberculosis*

El género *Mycobacterium*, del griego "mycos", denota el aspecto céreo, que se debe a la composición de la pared de dichos microorganismos. Más del 60% de la pared está formada por lípidos, en particular ácidos micólicos compuestos de 3

hidroxiácidos grasos de dos ramas, con cadenas que poseen incluso 76 a 90 átomos de carbono. Esta protección extraordinaria impide que muchos compuestos farmacológicos penetren la membrana de la bacteria y pasen al interior de la célula (Goodman y Gilman, 2012).

Mycobacterium tuberculosis (MTB) es una bacteria inmóvil, no esporógena, ácido-alcohol resistente, y microscópicamente aparentan varillas rectas o ligeramente curvadas, que miden de 1 a 4 μm de longitud y de 0,3 a 0,6 μm de ancho. Las micobacterias están dentro del orden *Actinomycetales*. MTB es miembro de las especies de micobacterias patógenas de crecimiento lento, que se caracteriza por una tasa de división de 12 a 24 horas. Esto es por la limitada absorción de nutrientes, debido a que la pared celular es altamente impermeable, y a la baja tasa de síntesis de ARN. Las micobacterias son bacterias intracelulares que se multiplican dentro de las células fagocíticas, particularmente macrófagos y monocitos (Sakamoto, 2012).

Las bacterias del complejo CMTB se multiplican en un intervalo estrecho de temperatura y pH, y en alta tensión de oxígeno, lo cual indica el efecto producido por estas condiciones fisiológicas en su actividad enzimática. También estos microorganismos son capaces de resistir bajas temperaturas. Su viabilidad se incrementa cuando son preservados a temperaturas desde 2 a 4°C hasta -70°C. Con ultra congelación, la viabilidad del bacilo permanece casi intacta, así como sus propiedades taxonómicas, serológicas, inmunológicas y patogénicas. Sin embargo, el bacilo es muy sensible al calor, la luz del sol y la radiación ultravioleta. En esputo o en suspensión acuosa, pierden progresivamente su viabilidad entre 30 y 37°C dentro de una semana. La estructura cerrada de la pared celular del bacilo de la tuberculosis es sin duda el escudo que conserva la posición y la función de la maquinaria metabólica y replicante, incluso cuando está inactivo. Al mismo tiempo, una serie de mecanismos fisiológicos, que todavía no se entienden bien, están listos para cambiar esta maquinaria hacia la inactividad siempre que sea necesario. Ésta parece ser la principal respuesta de adaptación de los bacilos a casi todas las condiciones sub-óptimas o incluso hostiles, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (Palomino, 2007).

1.4. Ciclo infectivo de *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis se transmite casi siempre desde un paciente con tuberculosis pulmonar contagiosa a otras personas por medio de las gotitas respiratorias que la tos y el estornudo convierten en un aerosol. El ciclo de la infección tuberculosa se inicia con la tos de un paciente con TB pulmonar, bacilos en aerosol. Estas gotitas infecciosas son inhaladas por los contactos cercanos y con buena ventilación penetran en la parte inferior de los pulmones. La respuesta inmune del huésped intenta controlar la infección, resultando en la formación de granulomas. Este granuloma inicial puede sanar, dejando un complejo de Ghon calcificado en las zonas inferiores de los pulmones, lo que demuestra que éste es el sitio de la infección inicial (Elkington, 2014).

Cuando la TB se presenta, los síntomas (tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, etcétera) pueden ser leves por muchos meses. Como resultado, los pacientes tardan en buscar atención médica y en el transcurso transmiten la bacteria a otros. A lo largo de un año, un enfermo tuberculoso puede infectar a unas 10 o 15 personas por contacto estrecho. Si no reciben el tratamiento adecuado, hasta dos terceras partes de los enfermos tuberculosos mueren (WHO).

Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, están infectadas por el bacilo pero aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección. Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo de 10% a lo largo de la vida de enfermarse de tuberculosis. Sin embargo, este riesgo es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmunitario está dañado, como ocurre en casos de infección por el VIH, desnutrición o diabetes, o en quienes consumen tabaco (WHO).

1.5 Tratamiento contra la tuberculosis

El primer fármaco con el que se lograron buenos resultados en el tratamiento de la tuberculosis fue el ácido para-aminosalicílico, sintetizado por Lehman en 1943. Waksman y Schatz lograron un avance más trascendente al obtener la

estreptomycin. Nuevos intentos permitieron la síntesis de la tiacetazona por parte de Domagk en 1946, la isoniazida en los laboratorios Squibb, Hoffman La Roche y Bayer en 1952 y las rifampicinas por Sensi y Margalith en 1957. En los laboratorios Lederle en 1961 se descubrió el etambutol (Goodman y Gilman, 2012).

De acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, para la prevención y control de la tuberculosis, los medicamentos que se utilizan en el tratamiento de la tuberculosis se clasifican en (NOM-006-SSA2-2013):

- **primera línea:** isoniácida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA), etambutol (EMB), estreptomycin (SM)
- **segunda línea:** kanamicina (Km), amikacina (Am), capreomicina (Cm), etionamida (Eto), protionamida (Pto), ofloxacina (Ofx), levofloxacina (Lfx), moxifloxacina (Mfx) y cicloserina (Cs)

El tratamiento actual de corta duración para la completa eliminación de bacilos activos y latentes implica dos fases (Palomino, 2007):

- **Fase inicial:** tres o más fármacos (por lo general la isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol o estreptomycin) se utilizan durante dos meses; permiten una matanza rápida al dividir activamente bacterias, resultando en la negativización del esputo.
- **Fase de mantenimiento:** menos fármacos (por lo general la isoniazida y rifampicina) se utilizan de 4 a 7 meses como prevención; su función es matar a cualquier bacilo restante o latente.

Dos características biológicas explican por qué el uso de terapia combinada de medicamentos es más efectivo que una monoterapia. La primera es que el tratamiento de la TB activa con un solo medicamento resulta en la selección de bacilos resistentes y en el fracaso de dicho tratamiento. La segunda es que diferentes poblaciones del bacilo, cada una mostrando diferentes patrones de

sensibilidad a medicamentos, pueden coexistir en un mismo paciente (Palomino, 2007).

Es de vital importancia asegurar el apego del paciente al tratamiento anti-TB, para garantizar la completa eliminación del bacilo, y también para prevenir el surgimiento de la resistencia a los medicamentos (Palomino, 2007).

Cuando se genera resistencia en cualquiera de los fármacos de primera línea o si durante la terapia se desarrollan efectos adversos a los fármacos de primera línea, el tratamiento debe incluir otros fármacos conocidos como fármacos de segunda línea (Palomino, 2007).

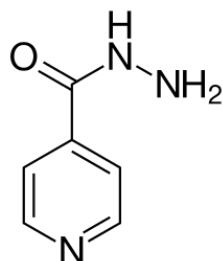
Como podía preverse, el empleo de estos fármacos propicia problemas de resistencia farmacológica, episodios adversos e interacciones farmacológicas. Por lo tanto, están en fase de estudio nuevas clases de fármacos. La moxifloxacina, PA-824 y TMC-207 han llegado a la fase de estudios clínicos avanzados (Goodman y Gilman, 2012).

1.6 Mecanismos de acción de los fármacos anti-TB de primera línea.

1.6.1 Isoniazida (INH). La INH es uno de los principales medicamentos para el tratamiento de la tuberculosis. Tiene una estructura simple que contiene un anillo de piridina y un grupo hidrazida, con los dos componentes esenciales para la alta actividad contra *M. Tuberculosis* (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

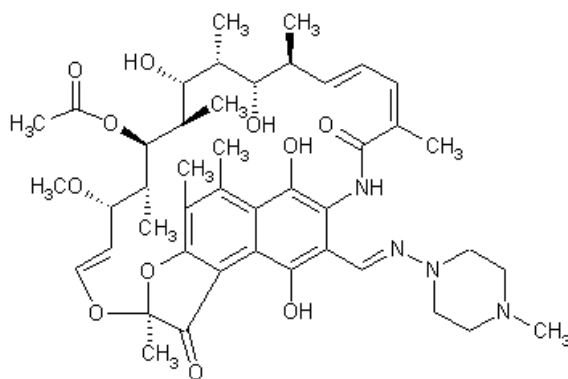
La INH penetra en los bacilos por difusión pasiva y no es directamente tóxica, debe ser activada hasta la forma tóxica dentro del microorganismo por una catalasa- peroxidasa multifuncional codificada por *katG*. Dicha sustancia cataliza la producción a partir de isoniazida de un radical isonicotinoílo que después interactúa con NAD y NADP micobacteriano para producir una docena de aductos. Uno de ellos, el isómero nicotinoílo-NAD, inhibe las actividades de la reductasa de la proteína portadora enoíl acilo (codificada por *InhA*) y la sintetasa de la proteína portadora β -cetoacil acilo (codificada por *KasA*). La inhibición de dichas enzimas impide la síntesis de ácido micólico, componente esencial de la pared de la micobacteria, y con ello el microorganismo muere. Otro aducto, el isómero de

nicotinoílo-NADP, inhibe de manera potente la dihidrofolato reductasa micobacteriana, con lo que interfiere en la síntesis de ácido nucleico (Goodman y Gilman, 2012).



ISONIAZIDA

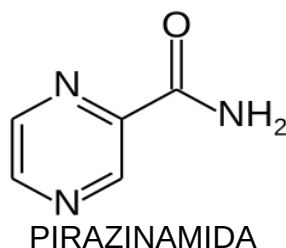
1.6.2 Rifampicina (RIF). La penetración de la rifampicina a los bacilos depende de la concentración y alcanza un equilibrio dinámico al término de 15 min. La RIF se une a la subunidad β de la ARN polimerasa (codificada por *rpoB*), para formar un complejo estable de fármaco-enzima. La unión del fármaco suprime la formación de cadenas en la síntesis de ARN (Goodman y Gilman, 2012). La RIF es bactericida de bacilos en división y tiene cierta actividad contra bacilos que no se están dividiendo. La introducción de RIF permitió la reducción del tratamiento de un año a 9 meses. Después se redujo a seis meses con la incorporación de pirazinamida (Palomino y col, 2007).



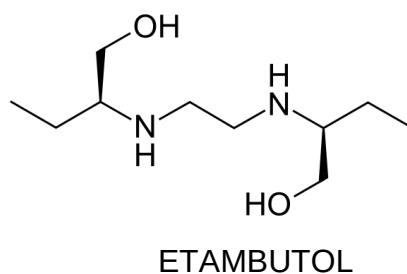
RIFAMPICINA

1.6.3 Pirazinamida (PZA). La pirazinamida es el análogo pirazínico sintético de la nicotinamida. También se le conoce como amida del ácido pirazinoico, carboxilamida de pirazina y pirazina de carboxilamida (Goodman y Gilman, 2012).

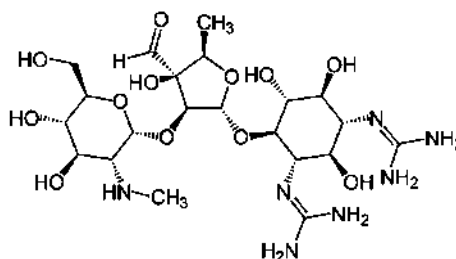
La nicotinamidasasa o pirazinamidasasa (codificada por *pncA*) de *M. tuberculosis*, desamina la pirazinamida hasta formar ácido pirazinoico (POA-), que es transportado hasta el medio extracelular por una bomba de expulsión. En un medio extracelular ácido, una fracción de POA- es protonada hasta la forma POAH, que es más liposoluble y que penetra en el bacilo (Goodman y Gilman, 2012). La pirazinamida no actúa contra *Mycobacterium tuberculosis* "normal" en condiciones básicas pH de 9, la pirazinamida sólo es activa contra *M. tuberculosis* a pH ácido (Zhang y col., 2003). Se han propuesto tres mecanismos de destrucción del microorganismo (Goodman y Gilman, 2012): inhibición de la sintetasa tipo I de ácidos grasos que conduce a la interferencia en la síntesis del ácido micólico; disminución del pH intracelular; e inhibición del transporte por la membrana causada por POAH.



1.6.4 Etambutol (EMB). El clorhidrato de etambutol es un compuesto hidrosoluble y estable al calor. El etambutol inhibe la arabinosil transferasa III, con lo que se interrumpe la transferencia de arabinosa en la biosíntesis de arabinogalactano, que a su vez interrumpe el ensamblamiento de la pared celular de la micobacteria. Las transferasas de arabinosil están codificadas por los genes *embAB* (Goodman y Gilman, 2012). Dentro de los aislados resistentes a etambutol, cerca del 50% tienen mutaciones en el codón 306 de *embB* (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).



1.6.5 Estreptomicina (SM). Fue el primer medicamento que se descubrió con actividad antituberculosa (Palomino y col, 2007). A través de su unión a la subunidad ribosomal 30S afecta la síntesis de polipéptidos, en última instancia, lo que ocasiona la inhibición de la traducción (Kolyva y Karakousis, 2009). La unidad ribosómica 30S está compuesta de ARNm 16S (codificada para *rpsL*) que se une a la proteína ribosómica S12 (codificada por *rrs*) para optimizar la unión con ARNt y la decodificación de ARNm (Goodman y Gilman, 2012).



ESTREPTOMICINA

1.7 Resistencia a antibióticos de los miembros del CMTB

La historia de la TB cambió drásticamente después de la introducción de los primeros fármacos con actividad anti-micobacteriana. Sin embargo, no mucho después de que el primer antibiótico fue introducido en 1944, surgió la resistencia a fármacos, debido principalmente a la utilización de monoterapia con estreptomicina. Con el descubrimiento de varios otros fármacos con actividad anti-TB, la terapia de múltiples fármacos se convirtió en fundamental para el control de la enfermedad (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

La Organización Mundial de la Salud ha clasificado a los casos de tuberculosis drogo resistentes en dos grupos, de acuerdo al grado de resistencia que presentan:

- TB multidrogo-resistente, **MDR-TB**, la cual es causada por bacterias que son resistentes al menos a isoniazida y rifampicina, los medicamentos anti-TB más efectivos. MDR-TB resulta ya sea de

infección primaria con bacterias resistentes o puede desarrollarse en el curso del tratamiento de un paciente. (Report y Surveillanceresponse, 2010)

- TB extremadamente drogo-resistente, **XDR-TB**, es una forma de tuberculosis causada por bacterias que son resistentes a isoniazida y rifampicina (son MDR-TB) y también son resistentes a alguna fluoroquinolona y a cualquiera de los medicamentos inyectables de la segunda línea (amikacina, kanamicina o capreomicina) (Report y Surveillance response, 2010).

La TB totalmente resistente, **TDR-TB**, es la forma más peligrosa de la enfermedad. Son cepas MDR y que además son resistentes a todos los medicamentos de segunda línea (aminoglucósidos, polipéptidos cíclicos, fluoroquinolonas, tioamidas, análogos de serina, y derivados del ácido salicílico) (“Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli”, 2009).

La aparición de la TB resistente a medicamentos, en particular la MDR-TB y XDR-TB, ha sido identificada como uno de los principales obstáculos para el control eficaz de la TB en muchos países (Zhao, 2014).

La resistencia a medicamentos que presentan los miembros del CMTB puede ser adquirida *de novo* en pacientes bajo tratamiento, ya sea por poca adherencia al mismo o por falta del medicamento. Así mismo, puede haber diseminación por transmisión directa de cepas que ya son resistentes. Adicionalmente, el tratamiento para otras enfermedades puede también contribuir a la resistencia adquirida en TB; por ejemplo el uso de fluoroquinolonas para enfermedades del tracto respiratorio y otras infecciones (Borrell y Gagneux, 2011).

1.8 Mecanismos de resistencia

Los principales avances en herramientas de biología molecular y la disponibilidad de nueva información generada después de descifrar la secuencia completa del

genoma de *M. tuberculosis* aumentaron el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a los principales medicamentos antituberculosos y demostraron qué mutaciones genéticas específicas se asocian con droga-resistencia (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

Los mecanismos de resistencia que presenta *M. tuberculosis* se clasifican en dos grupos: mecanismos de resistencia intrínseca y mecanismos de resistencia adquirida.

1.8.1 Mecanismos de Resistencia Intrínseca

La resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* hacia los fármacos tradicionalmente se ha atribuido a la estructura inusual de su pared celular que contiene ácidos micólicos, la cual le da a las bacterias una baja permeabilidad para muchos compuestos tales como antibióticos y otros agentes (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

1.8.2 Mecanismos de Resistencia Adquirida

A diferencia de la situación en otras bacterias, donde generalmente la resistencia adquirida a algunos fármacos es mediada a través de la transferencia de elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, transposones o integrones, en *M. tuberculosis*, la resistencia adquirida a los fármacos es causada principalmente por mutaciones espontáneas en genes cromosómicos, produciendo la selección de cepas resistentes durante el tratamiento (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

1.9 Características de los genes relacionados con la resistencia a isoniazida (INH), rifampicina (RIF) y estreptomycin (SM)

1.9.1 *katG*: relacionado con resistencia a INH. Tiene un tamaño de 2222 pb, localizado en el genoma en la región 2153889 a 2156111; gen ID: 885638. Es un gen que codifica la enzima catalasa-peroxidasa-peroxinitritasa T KATG de 740 aminoácidos (NCBI). Un decremento o una pérdida total de la actividad catalasa/peroxidasa, como resultado de mutaciones en *katG*, son las alteraciones genéticas más comunes asociadas con resistencia a isoniazida. (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

La mutación del gen *katG* en el codón 315 es la más común en las cepas resistentes a INH, lo que representa el 50-95% de los aislados clínicos resistentes a INH (Zhang y Yew, 2009).

1.9.2 *rpoB*: relacionado con resistencia a RIF. Tiene un tamaño de 3518 pb, está localizado en la región del genoma 759807 a 763325; gen ID: 888164 (NCBI). En la mayoría de los casos, la resistencia a RIF está vinculada con mutaciones dentro de una región de 81 pb, denominada “rifampicin resistance-determining region” (RRDR) del gene *rpoB*. La detección de mutaciones genéticas en *rpoB* se considera un marcador alternativo para la detección de la tuberculosis multirresistente y puede ser utilizado como una herramienta en el diagnóstico de TB-MDR. Los patrones y la frecuencia de mutaciones en la región RRDR del gen *rpoB* en los aislados clínicos de MTB varía significativamente de acuerdo a la ubicación geográfica (Qazi, 2014). Aproximadamente el 95% de las cepas resistentes a rifampicina llevan mutaciones dentro de una región de 81 pb, que contiene los codones 507 al 533 del gene *rpoB*.

En *M. tuberculosis*, la resistencia a rifampicina resulta de mutaciones en la subunidad β de la ARN polimerasa que es codificada por el gen *rpoB*. (Zaczek, 2009). Las mutaciones más frecuentes se encuentran en los codones 531, 516 y 526 (Tracevska, 2002).

1.9.3 *rpsL*: relacionado con resistencia a SM. Tiene un tamaño de 374 pb, que se localizan en el genoma en la posición 781560 a 781934; gen ID: 888259. Codifica la proteína ribosomal 30S (NCBI). Mutaciones en este gen producen alteraciones en el sitio de unión de la estreptomicina al ribosoma (Almeida Da Silva y Palomino, 2011). La mutación más común se encuentra en el codón 43 (Sun 2009).

1.10 Mutaciones o Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNPs)

Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP's (Single nucleotide polymorphisms) son la forma más común de variación genética en MTBC, después de las inserciones y deleciones. El término "SNP" a menudo se intercambia por "mutación", "polimorfismo" o "sustitución". Este fenómeno ocurre como consecuencia de un daño en el ADN o por errores durante la replicación del mismo. Cuando un alelo (forma alternativa que puede tener un mismo gen) alcanza una cierta frecuencia en la población, se le llama polimorfismo (Stucki y Gagneux, 2013).

Dependiendo de su posición en el genoma, los SNPs pueden ser o bien de codificación o de no codificación. Con una densidad de codificación de 90 a 96%, la mayoría de los SNPs en MTBC están en regiones del genoma de codificación. Los SNPs codificantes se pueden dividir además en sinónimos (sSNP) y no sinónimos (NSNP) dependiendo de si conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos correspondiente (Stucki y Gagneux, 2013).

1.11 Métodos para la detección de drogo-resistencia

La detección temprana de la resistencia a los antibióticos constituye una de las prioridades de los programas de control de la tuberculosis. Permite iniciar el tratamiento adecuado de los pacientes, así como la vigilancia de la resistencia a los antibióticos. La detección de la resistencia a los medicamentos se ha realizado en el pasado por los llamados “métodos convencionales” basado en la detección del crecimiento de *M. tuberculosis* en la presencia de los antibióticos. Sin embargo, debido a la laboriosidad de algunos de estos métodos, y sobre todo, el largo período de tiempo necesario para obtener resultados, en los últimos años se han propuesto nuevas tecnologías y enfoques. Estos incluyen tanto métodos fenotípicos como genotípicos (Palomino, 2007).

1.11.1 Métodos fenotípicos

En general, los métodos fenotípicos evalúan la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* en presencia de antibióticos para distinguir entre cepas sensibles y resistentes. Hay tres métodos convencionales fenotípicos para las pruebas de sensibilidad a los antibióticos basados en medios sólidos: el método de la proporción, el método de relación de resistencias y el método de concentración absoluta. Métodos más recientes se basan en medios líquidos, incluido el radiométrico BACTEC y el método de tubo indicador de crecimiento de micobacterias (Palomino, 2007).

1.11.2 Métodos genotípicos

Los métodos genotípicos buscan los determinantes genéticos de resistencia a antibióticos de la tuberculosis, más que el fenotipo de resistencia, e involucran dos pasos básicos: la amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar las secciones del genoma de *M. tuberculosis* que están alteradas en las cepas resistentes; y una segunda etapa de

la evaluación de los productos amplificados con mutaciones específicas en correlación con la resistencia a antibióticos. Estos métodos son: secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN), Técnica de hibridación en fase sólida, técnicas de PCR en tiempo real y micromatrices (Palomino, 2007).

Existe una prueba nueva y rápida para la tuberculosis – conocida como Xpert MTB / RIF – que es un sistema totalmente automatizado de diagnóstico molecular. Tiene el potencial de revolucionar y transformar el cuidado y control de la tuberculosis. La prueba (WHO, 2008):

- detecta a *M. tuberculosis* así como mutaciones que confieren resistencia a la rifampicina a partir del esputo
- proporciona resultados precisos en menos de dos horas para que los pacientes puedan iniciar un tratamiento adecuado en el mismo día
- tiene requisitos de bioseguridad y capacitación mínimas y puede ser ubicado en los laboratorios no convencionales.

1.12 Antecedentes

El laboratorio de Genética Molecular Microbiana cuenta con una colección de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, recolectadas a partir del año 2009 que incluyen datos epidemiológicos de los pacientes, como: ubicación de la enfermedad, edad, género, comorbilidad, y jurisdicción de procedencia. Además, las cepas cuentan con datos fenotípicos. Un estudio similar se hizo en el 2014, en el cual se estudiaron los determinantes genéticos asociados a la resistencia a antibióticos en 33 cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Michoacán, las cuales presentaron las mutaciones previamente reportadas en la literatura y que se asocian con resistencia a antibióticos de primera línea. Los genes que presentaron mayor número de mutaciones fueron los genes *katG*, *rpoB* y *rpsL* (Pérez Reyes, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

La detección de marcadores moleculares de resistencia es una forma de determinar si una cepa es resistente a algún antibiótico; ésta debe caracterizar las mutaciones de las cepas circulantes en cada región, ya que la frecuencia de las mutaciones en los genes asociados a resistencia a fármacos de primera línea varía de acuerdo a la zona geográfica; además, constantemente se están reportando mutaciones nuevas. De esta manera se pueden elegir las mutaciones con mayor prevalencia para cada caso y así poder tener un mayor potencial diagnóstico y epidemiológico en cada región. En el laboratorio se cuenta con una colección de cepas aisladas de pacientes con tuberculosis provenientes de Michoacán, por lo que es necesario conocer los patrones de resistencia a fármacos de estas cepas y encontrar las mutaciones más comunes en los genes asociados con resistencia a antibióticos de primera línea y así poder diseñar marcadores que se puedan utilizar en la región de Michoacán para un mejor diagnóstico.

3. HIPÓTESIS

Las cepas de *M. tuberculosis*, obtenidas en el periodo 2012-2014 de aislados en Michoacán, presentan las mismas mutaciones en los genes que se asocian a la resistencia a antibióticos de primera línea que las encontradas en cepas aisladas en el periodo 2009-2011.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Establecer la relación entre las mutaciones presentes en los genes *katG*, *rpoB* y *rpsL* en cepas obtenidas de 2012 a 2014 en el estado de Michoacán y la resistencia a isoniazida, rifampicina y estreptomicina respectivamente.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la resistencia a isoniazida, rifampicina y estreptomicina en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* del Estado de Michoacán.
- Identificar las mutaciones presentes en los genes relacionados con la resistencia a isoniazida, rifampicina y estreptomicina de las cepas de estudio de *M. tuberculosis*.
- Determinar la relación entre resistencia a isoniazida, rifampicina y estreptomicina y las mutaciones encontradas en los genes *katG*, *rpoB* y *rpsL*, respectivamente.
- Realizar un análisis comparativo entre las mutaciones encontradas en las cepas de Michoacán y aquellas reportadas en diferentes estados del país y diferentes regiones del mundo.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Para este estudio se incluyeron 13 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de 13 pacientes con tuberculosis en el periodo 2012-2014 por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán (LESP).

Se utilizó la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv donada por el DC. Antonio Enciso Moreno, de la Unidad de Investigación del IMSS Zacatecas.

6.2 Manejo de muestras

Las resiembras de las cepas y la extracción de ADN se llevaron a cabo en campana de bioseguridad tipo II A, con prácticas Nivel III (en un área aislada y con uso de mascarilla N98 y vestimenta de protección adecuada).

6.3 Prueba de susceptibilidad a antibióticos

El Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz, Veracruz realizó los antibiogramas de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando el equipo BACTEC-MGIT 960, aprobado por la FDA para la detección de drogo-resistencia a antibióticos de primera línea.

Este equipo detecta la fluorescencia de crecimiento bacteriano en un tubo con medio Middlebrook 7H9 modificado (adicionado con nutrientes como el glicerol, ácido oleico, albúmina y dextrosa), junto con un sensor de oxígeno con una base de enfriamiento fluorescente, que se encuentra embebido en la base del tubo. El consumo del oxígeno del medio produce fluorescencia cuando es iluminado por la lámpara UV.

Los tubos se inoculan con una suspensión estandarizada de micobacterias, y se incuban a 37°C (día 0). Empezando en el tercer día (día 2), los tubos son

controlados diariamente con una lámpara UV. La presencia de fluorescencia naranja en el tubo con medicamento y en el tubo control, se interpreta como cepa resistente al medicamento; de modo contrario, sería una cepa susceptible. La prueba es válida si el crecimiento en el tubo control da una señal positiva hasta el día 14 de incubación.

6.4 Extracción de ADN

Las cepas se resembraron en medio Lowestein-Jensen y se incubaron a 37°C por tres a ocho semanas. Se tomaron las colonias crecidas y se suspendieron en 600 µL de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM pH8, SDS 10%, NaCl 5 M, EDTA 0,5 M). Se inactivaron a 80°C por 60 min. Se agregaron 600 µL de fenol-cloroformo (1:1). Las muestras se agitaron fuertemente y se centrifugaron a 9,3 g por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 600 µL fenol-cloroformo (1:1). Tras una fuerte agitación se centrifugaron a 9,3 g por 10 min. Una vez más, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, al cual se le agregaron 600 µL de isopropanol frío mezclando suavemente por inversión e incubando a -20°C por 10 min. En seguida se centrifugó la muestra a 9,3 g por 10 min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se lavó una vez con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca la pastilla, ésta se resuspendió en 30 µL de agua desionizada estéril. A continuación se realizó el tratamiento con ARNasa adicionando 3 µL de enzima Pure Link ARNsa A de Invitrogen e incubando a 37°C por 30 min. Posteriormente la muestra se centrifugó por 10 min a 9,3 g, se lavó dos veces con 200 µL de etanol al 70% y se dejó evaporar a sequedad. La pastilla de ADN se resuspendió en 50 µL de agua y se mantuvo en congelación a -20°C hasta su uso (Sambrook y Russell, 2001).

6.5 Amplificaciones por PCR

Se estandarizaron las condiciones de amplificación de los genes *katG*, *rpoB* y *rpsL* utilizando el ADN de la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y los iniciadores que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Iniciadores utilizados en este estudio.

GEN	NOMBRE DE INICIADORES	SECUENCIA	TEMPERATURA ALINEAMIENTO	TAMAÑO PRODUCTO (pb)
<i>katG</i>	MTB 38 F	GCATGGCCATGAACGACGTC	68°C	765
	MTB 38 R	CGTTGACCTCCCACCCGACTT		
<i>rpoB</i>	PR 1	CCGCGATCAAGGAGTTCTTC	68°C	315
	PR 2	ACACGATCTCGTCGCTAACC		
<i>rpsL</i>	PR 11	CCAACCATCCAGCAGCTGGT	66°C	572
	PR 12	GTCGAGAGCCCGCTTGAGGG		

(Sekiguchi 2007), (Chia 2012), (oligos diseñados).

Las mezclas de reacción para las amplificaciones contenían Tris–HCl pH 9,0, 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP's 2 mM, 10 µM de cada iniciador, 60 ng de ADN y 1 U de Taq DNA polimerasa recombinante de Invitrogen en un volumen final de 30 µL.

Se utilizó un termociclador Corbett Research Palm Cycler para estandarizar las temperaturas de amplificación y un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 para obtener los amplicones finales de cada cepa. El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 95°C/15 min; 30 ciclos con desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento con temperatura variable para cada par de iniciadores por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg; y una extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio, usando un fotodocumentador Chemi Doc de BioRad.

6.6 Secuenciación

Los productos amplificados fueron secuenciados por la empresa Elim Biopharm utilizando un secuenciador de electroforesis capilar ABI 3730xl de Applied Biosystems.

6.7 Análisis de datos

Una vez obtenidas las secuencias de los 3 genes de interés para las 13 cepas, se compararon en el GenBank de la página de NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el algoritmo BLASTn; con esto se verificó que las amplificaciones realmente pertenecieran a los genes analizados.

La búsqueda de SNP's se realizó mediante un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas en el programa Mega 6.06 para cada gen de las 13 cepas y la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (obtenidas de la página GenBank, número de acceso NC_000962).

Los SNP's encontrados se compararon con los reportados en las páginas TB Database (Galagan y col., 2010; Reddy y col., 2010) y TB Drug Resistance Mutation Database (Sandgren y col., 2009); ambas son bases de datos que han recopilado SNP's relacionados con resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.

Para determinar si las mutaciones detectadas eran sinónimas o no sinónimas, se hizo un alineamiento con cada una de las secuencias, en el programa BlastX de la página NCBI.

7. RESULTADOS

7.1 Calidad del ADN

Se evaluó la calidad del ADN de las cepas de estudio mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se observó que el ADN tenía la calidad adecuada para la realización de los experimentos subsecuentes (Fig. 1).

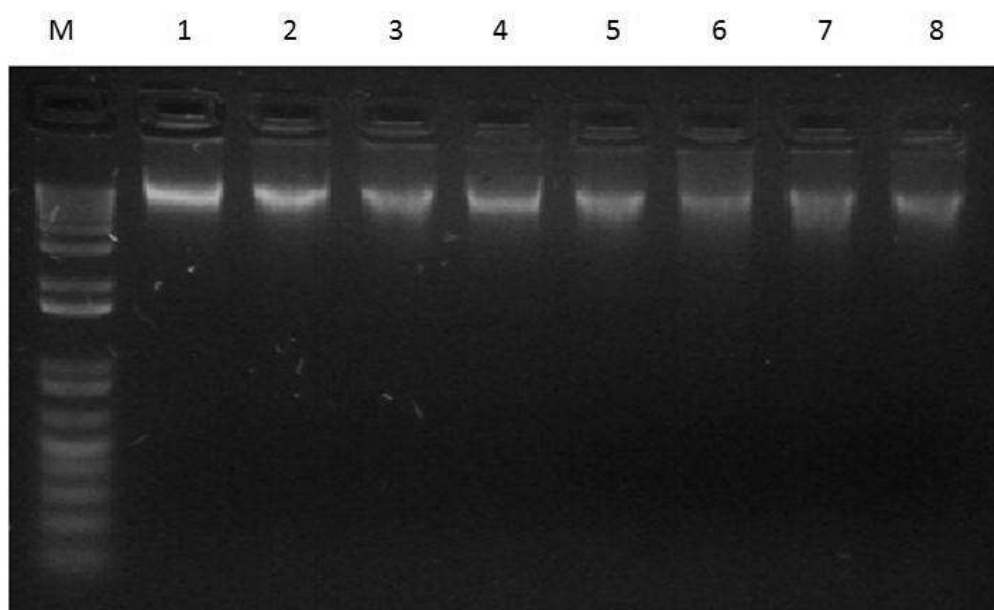


Figura 2. ADN de las cepas de estudio. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra: carril 1: marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA ladder, Invitrogen), carriles del 1 al 8: ADN de diferentes cepas de estudio.

7.2 Amplificaciones por PCR

Se estandarizaron las condiciones de amplificación para cada uno de los genes *katG*, *rpoB* y *rpsL*, utilizando ADN de la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y se observaron los productos de PCR esperados para cada

uno de ellos; 765 pb para el gen *katG* , 572 pb para el gen *rpsL* (carril 3), y 315 pb para el gen *rpoB* (Fig. 2).

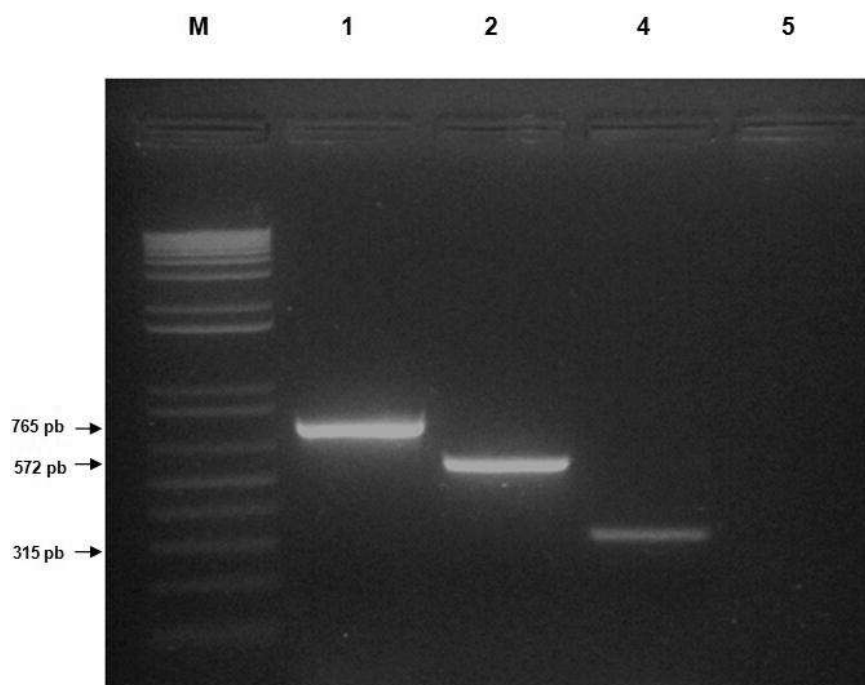


Figura 3. Amplificación de los genes *katG*, *rpsL* y *rpoB* con el ADN de la cepa de referencia H37Rv. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra: Carriles M. Marcador de 1 Kb Plus de Invitrogen, 1. *katG* , 2. *rpsL* , 3. *rpoB*, 4. control negativo.

Después de estandarizar las condiciones de amplificación para los 3 genes, se procedió a amplificar por PCR las regiones de cada uno de los genes en las cepas de estudio, donde se obtuvo el tamaño de amplicón esperado para las trece cepas con cada uno de los genes de estudio (Fig. 3).

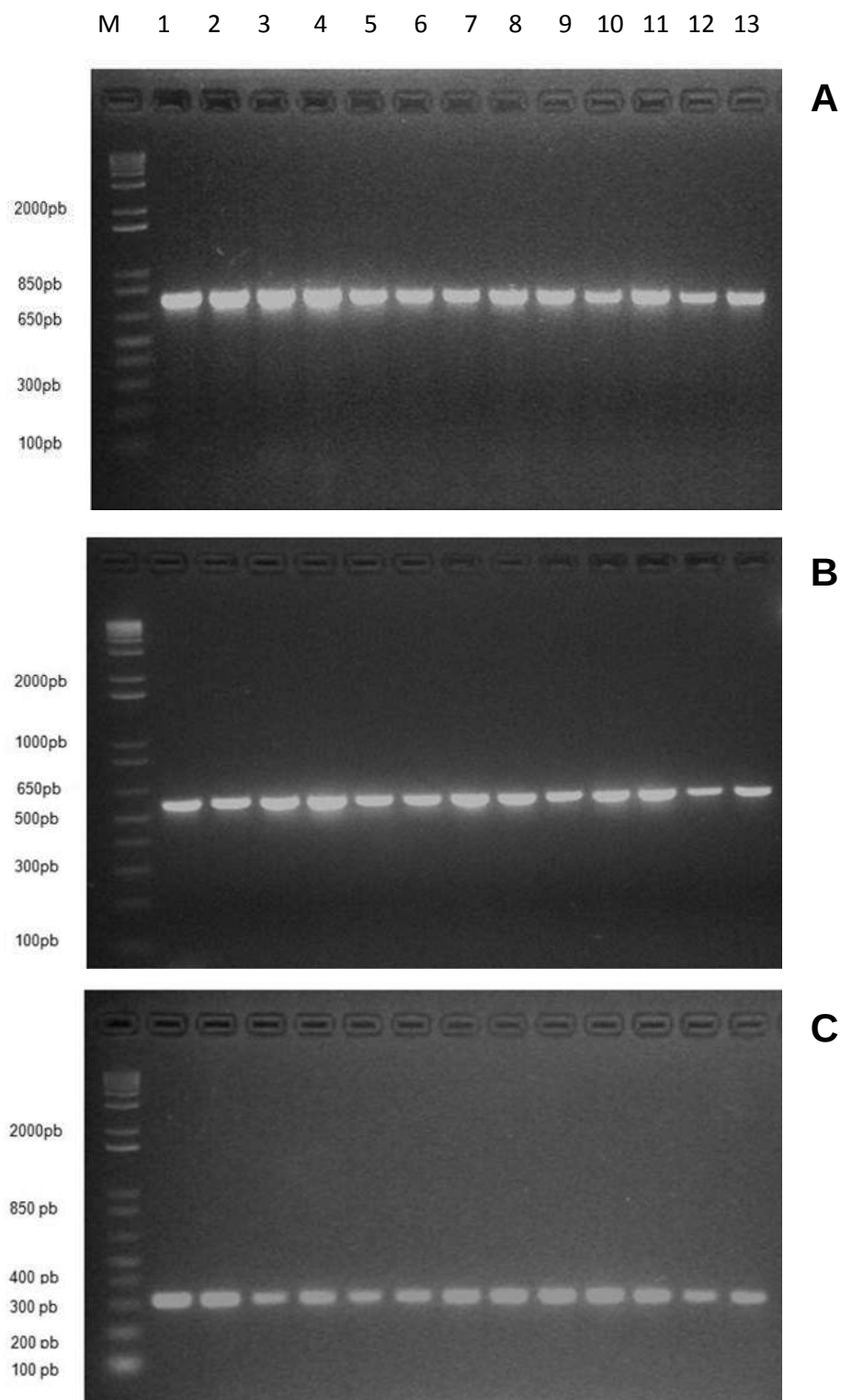


Figura 4. Amplificación de los genes de interés con el ADN de cada una de las cepas de estudio. Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio que muestran los amplicones obtenidos para el gen A) *katG*; B) *rpsL*; y C) *rpoB*. Carriles: M marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA ladder de Invitrogen; 1 al 13: amplicones obtenidos con el ADN de las cepas de estudio.

7.3 Secuenciación

Una vez terminadas las amplificaciones de los tres genes con las trece cepas, los productos de PCR se mandaron secuenciar a la empresa Elim Biopharm, donde se obtuvieron los electroferogramas correspondientes a cada una de las trece cepas con su respectivo gen en estudio, mismos que fueron editados usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Estos electroferogramas fueron nítidos, es decir, con picos bien definidos, sin ruido de fondo y con pocas indeterminaciones (Fig. 4), para subsecuentemente hacer los alineamientos y la detección de SNP's.

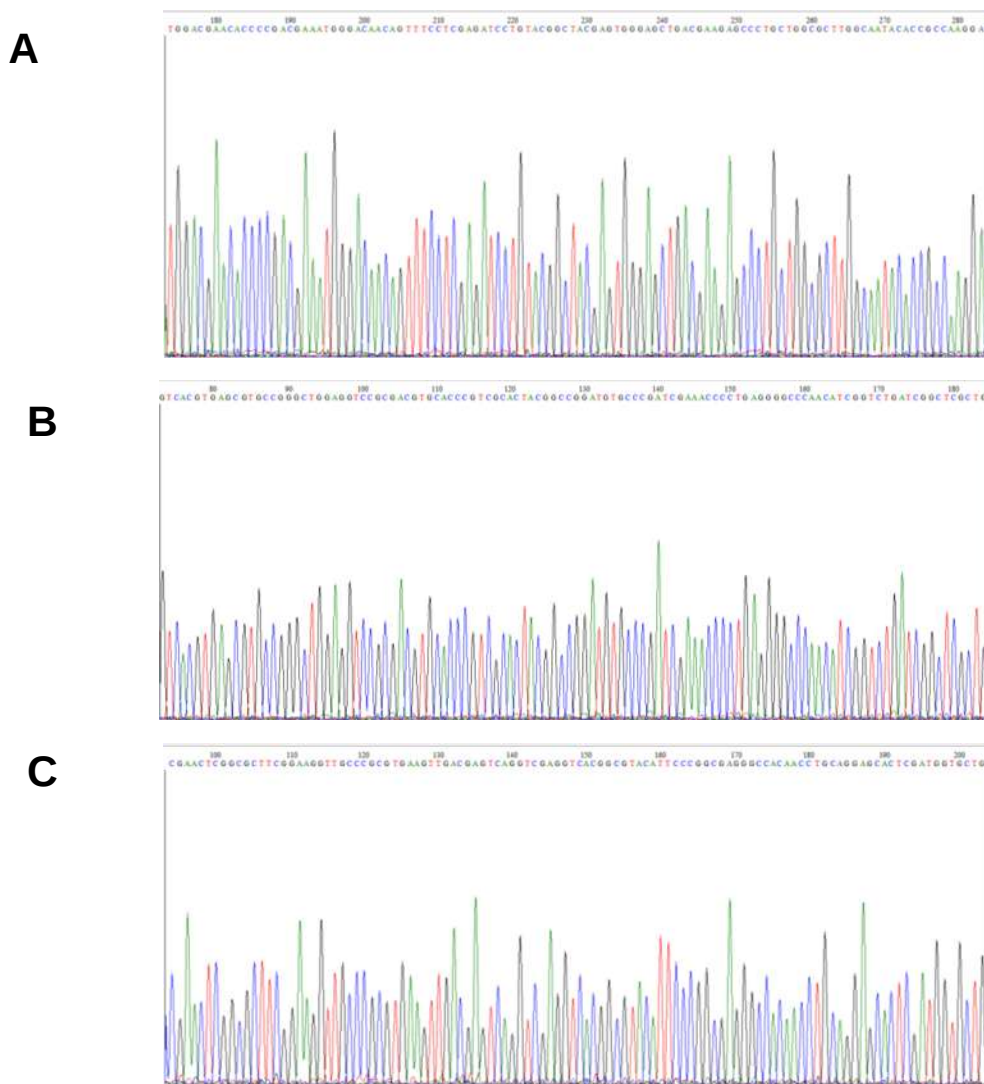


Figura 5. Electroferogramas. Ejemplos de los electroferogramas obtenidos en la secuenciación de A) gen *katG* cepa 052; B) gen *rpsL* cepa 060; y C) gen *rpoB* cepa 072.

Tabla 2. Mutaciones encontradas en las cepas de estudio

No de cepa	<i>katG</i>	<i>rpsL</i>	<i>rpoB</i>
CEPA			
052			
053			
055			
056			
058			
059	✓		✓
060	✓		
061			
062	✓		
064			
065	✓		
071	✓		
072	✓		
%	46.15	0	7.69

✓ Presencia de mutación

% Porcentaje de mutaciones por gen dentro de la colección de cepas

7.4.1 Polimorfismos "sinónimos " o "no sinónimos"

Las mutaciones o SNP's se analizaron en el programa BLASTx de la página NCBI, con el objetivo de saber si los cambios encontrados eran sinónimos o no sinónimos, es decir, si el cambio del nucleótido ocasionaba o no un cambio de aminoácido (Tabla 3).

7.4.2 Polimorfismos en los genes *katG*, *rpoB* y *rpsL*

De los 6 SNP's encontrados en el gen *katG*, 5 (83,33%) fueron no sinónimos y sólo uno (16,66%) fue sinónimo. Las cepas 062, 071 y 072 presentaron la mutación Arg463Leu. La mutación Ser315Thr reportada como la más común, (Hazbo, 2006; Zhang y Yew, 2009) fue encontrada en la cepa 059 y 065. La cepa 060 presentó un polimorfismo sinónimo, Ala411Ala. En el gen *rpoB*, sólo la cepa 059 presentó el polimorfismo Ser450Leu, el cual fue no sinónimo. Ninguna de las cepas presentó mutaciones en el gen *rpsL*.

Tabla 3. Polimorfismos encontrados en los genes de estudio

GEN	No. DE CEPA	POLIMORFISMO	NUCLEÓTIDO	CODÓN	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	SINÓNIMO (S) O NO SINÓNIMO (NS)
<i>katG</i> (INH)	59	G-C	944	315	Ser315Thr	NS
	60	C-G	1233	411	Ala411Ala	S
	62	G-T	1388	463	Arg463Leu	NS
	65	G-C	944	315	Ser315Thr	NS
	71	G-T	1388	463	Arg463Leu	NS
	72	G-T	1388	463	Arg463Leu	NS
<i>rpoB</i> (RIF)	059	C-T	1349	450	Ser450Leu	NS

7.5 Antibiogramas

Las cepas 055 y 072 mostraron resistencia a un medicamento de primera línea, la cepa 59 a 2 y la cepa 062 a 3 medicamentos. La cepa 65 mostró resistencia a 4 de los medicamentos de primera línea. Las cepas 052, 053, 056, 058, 060, 061, 064 y 071 presentaron sensibilidad a los 5 antibióticos de primera línea. Las cepas 059 y 065 mostraron multidrogo-resistencia. 3 cepas (23,07%) fueron resistentes a estreptomicina, 2 (15,38%) a isoniazida, 3 a rifampicina (23,07%), 1 (7,69%) a etambutol y 3 (23,07%) a pirazinamida (Tabla 4). De las 13 cepas de estudio, 11 cepas provienen de tuberculosis pulmonar, la cepa 052 de tuberculosis ganglionar (sensible a los 5 medicamentos de primera línea) y la cepa 055 proviene de tuberculosis meníngea (solo presentó resistencia a estreptomicina).

Tabla 4. Antibiogramas de las 13 cepas de estudio

CEPA	SM	INH	RIF	EMB	PZA
052	S	S	S	S	S
053	S	S	S	S	S
055	R	S	S	S	S
056	S	S	S	S	S
058	S	S	S	S	S
059	S	R	R	S	S
060	S	S	S	S	S
061	S	S	S	S	S
062	R	S	S	R	R
064	S	S	S	S	S
065	R	R	R	S	R
071	S	S	S	S	R
072	S	S	R	S	S

El antibiótico al que menor número de cepas presentaron resistencia fue el etambutol (7,7%). Menos del 30% de las cepas presentaron resistencia a cualquiera de los 5 medicamentos de primera línea (Fig. 6).

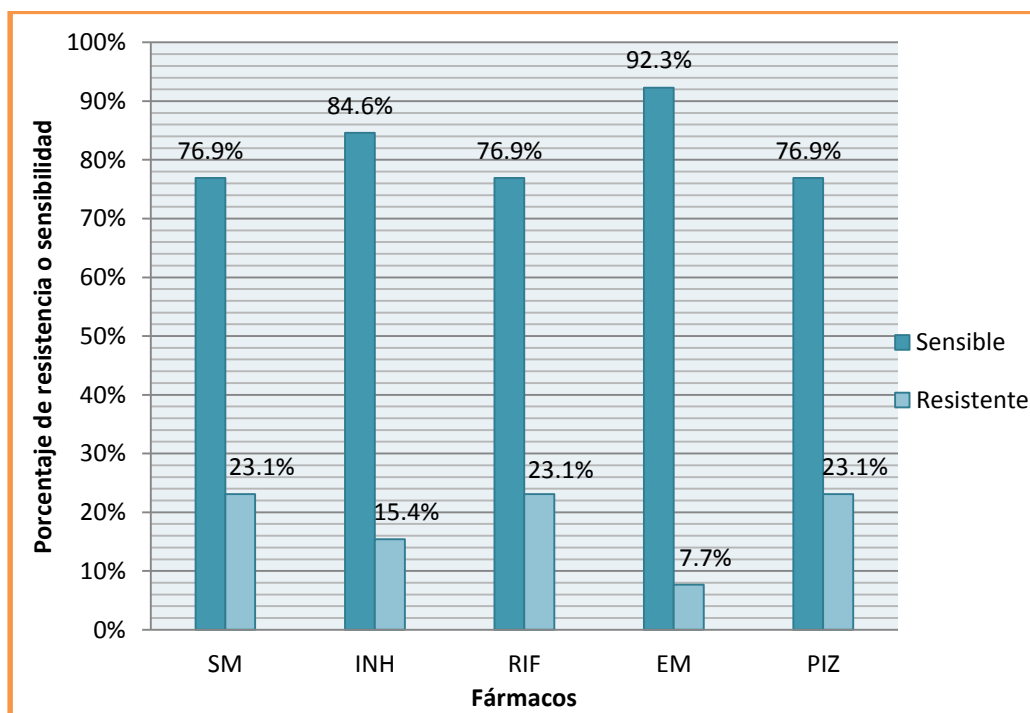


Figura 6. Resistencia a medicamentos.

7.6 Relación entre resistencia a antibióticos y presencia de mutaciones

Las dos cepas resistentes a isoniazida, presentaron la mutación Ser315Thr en el gen *katG*. Cabe mencionar que la isoniazida fue el medicamento al que el menor porcentaje de cepas presentaron resistencia (Tabla 5).

Sólo una de las cepas que presentó resistencia a rifampicina presentó mutación, esta fue Ser450Leu.

A pesar de que el 23,07% de las cepas en estudio (3 de las 13 cepas) mostraron resistencia a estreptomicina, ninguna presentó mutaciones en el gen *rpsL* para que se pudieran asociar con dicha resistencia.

Tabla 5. Relación entre resistencia y presencia de mutaciones

MEDICAMENTO	CEPA	GEN	MUTACIÓN	REPORTADA/ NO REPORTADA
Isoniazida	059	<i>katG</i>	Ser315Thr	Reportada
	065	<i>katG</i>	Ser315Thr	Reportada
Rifampicina	059	<i>rpoB</i>	Ser450Leu	Reportada
Estreptomicina	-	-	-	-

7.7 Análisis comparativo entre los resultados obtenidos y otros reportados.

Se compararon los porcentajes de mutaciones en los genes asociados con la resistencia a isoniazida, rifampicina y estreptomicina reportados en otros estados del país y otras regiones del mundo, con los porcentajes obtenidos en este estudio. Los porcentajes obtenidos para los genes *katG*, *rpoB* y *rpsL* son semejantes a los reportados en otros estados del país y en otras regiones del mundo. A pesar de que el gen *rpsL* no presentó ninguna mutación, coincide con los resultados reportados, ya que es el gen que presenta menor porcentaje de mutaciones en comparación con los genes *katG* y *rpoB* (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados obtenidos y otros resultados reportados

GEN ANALIZADO	% ENCONTRADO EN ESTE ESTUDIO	% ENCONTRADO EN OTROS ESTADOS	% ENCONTRADO EN OTROS PAISES
<i>katG</i>	100 (2/2)	* 66 (4/6) Michoacán (Pérez Reyes, 2014) * 81 (30/37) Monterrey (Ramaswamy, 2004) * 27 (3/12) Sonora (Bolado-Martínez, 2012) *83 (10/12) Tamaulipas (Bocanegra-García, 2014) *81 (26/34) Veracruz (Cuevas-Córdoba, 2013)	* 92 (46/50) Polonia (Napio, 2014) *88 (23/26) Chile (Araya, 2011) *73 (32/44) Camerún (Tekwu, 2014) *71 (25/35) China (Wang, 2009)
<i>rpoB</i>	33 (1/3)	*85 (6/7) Michoacán (Pérez Reyes, 2014) *81 (30/37) Monterrey (Ramaswamy, 2004) *50 (4/8) Sonora (Bolado-Martínez, 2012) *42 (3/7) Tamaulipas (Bocanegra-García, 2014)	*88 (22/25) Chile (Araya, 2011) *100 (7/7) Camerún (Tekwu, 2014) *81 (22/27) China (Wang, 2009)
<i>rpsL</i>	0 (0/3)	*100 (2/2) Michoacán (Pérez Reyes, 2014) *28 (26/91) Veracruz (Cuevas-Córdoba, 2012)	*50 (16/32) Polonia (Jagielski, 2014) *76 (88/115) China (Shi, 2007) *25 (7/27) Camerún (Tekwu, 2014) *76 (19/25) China (Wang, 2009)

8. DISCUSIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa y una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. En 2013, 9,0 millones de personas enfermaron de TB, de los cuales, 480 000 fueron MDR-TB. 1,5 millones de personas murieron por esta enfermedad. Entre estas muertes se estima que 210 000 fueron por MDR-TB. (WHO: Global Tuberculosis Control 2014). La TB es una enfermedad que se puede prevenir y curar, el tratamiento estándar contra la tuberculosis comprende seis meses de isoniazida, rifampizina, pirazinamida, etambutol y estreptomicina; sin embargo, el surgimiento de cepas farmacorresistentes en *M. tuberculosis*, principalmente multi-drogoresistentes (MDR) y extremadamente drogo-resistente (XDR), ha complicado aún más el tratamiento y ocasiona un gran problema de salud, especialmente en países en vías de desarrollo. Por ello, en este trabajo se llevó a cabo la detección de mutaciones en cepas obtenidas en el estado de Michoacán, en los genes *katG*, *rpoB* y *rpsL* asociados con la resistencia a isoniazida, rifampicina y estreptomicina, respectivamente, y se evaluó la posible relación entre estos.

En cuanto a la resistencia a isoniazida, las cepas 059 y 065 presentaron la mutación Ser315Thr, según la literatura es la mutación más común (Freitas, 2014). Además de presentar resistencia a isoniazida la cepa 059 fue resistente a rifampicina y la cepa 065 fue resistente a rifampicina, estreptomicina y pirazinamida; ambas presentaron multidrogo-resistencia. Recordando que en este estudio sólo se evaluó la relación entre mutaciones en los tres genes asociados a la resistencia de 3 de los fármacos de primera línea: isoniazida, rifampicina y estreptomicina, ya que fueron los que presentaron mayor número de polimorfismos en estudios realizados anteriormente en el grupo de trabajo (Pérez Reyes, 2014). Sin embargo, los antibiogramas se realizaron para los cinco fármacos de primera línea ya que no se descarta la posibilidad de estudiar posteriormente los dos genes restantes asociados con la resistencia a pirazinamida y etambutol en nuestro grupo de trabajo.

Sólo el 15.38% de las cepas resultó resistente a isoniazida y el 100% (2 de 2) de las cepas resistentes a isoniazida presentaron una mutación. Pero esto no es indicativo de que en estas cepas no haya más mutaciones en alguna otra región del gen *katG*, puesto que sólo se obtuvo la secuencia de la región del gen que de acuerdo a la literatura presenta las mutaciones más comunes (Sekiguchi, 2007).

A pesar de que en este estudio solo se analizó un pequeño número de cepas, se puede considerar a esta mutación como un posible marcador de resistencia a isoniazida de las cepas del estado de Michoacán, pues se ha conservado desde el 2009 al 2014.

La mutación Arg463Leu fue la más común, se presentó en el 50% (3 de 6) de las cepas que presentaron mutación, pero éstas fueron sensibles a isoniazida. Esta mutación ya se reportó en la base de datos, y ha sido estudiada por presentarse en cepas con sensibilidad a isoniazida, se ha considerado como una mutación no relacionada con dicha resistencia, ya que se encontró que la actividad de la enzima catalasa no cambia en presencia de esta mutación (Kuijper et al. 2001). Otros estudios también han demostrado que la mutación Arg463Leu tiene poco efecto en la actividad enzimática, por lo tanto, la activación de la isoniazida no se ve perjudicada (Kelley et al. 1997).

La rifampicina junto con la estreptomicina fueron los antibióticos a los que la mayor cantidad de cepas presentaron resistencia. El 23,1% (3 de 13) de las cepas resultaron resistentes a rifampicina y solo el 33% (1 de 3 cepas) presentó una mutación. Las cepas 065 y 072 no presentaron mutación, pero esto puede deberse a la presencia de una mutación en otra región del gen o bien a algún otro mecanismo de resistencia. Es importante mencionar que aproximadamente el 95% de las mutaciones se presentan dentro de una región de 81 pb denominada “rifampicin resistance-determining region” (RRDR) del gen *rpoB*, correspondientes a los codones 507 a 533 (Narayanan, 2001). En nuestro estudio la mutación que se encontró fue en el codón Ser450Leu, fuera de la RRDR. Esto coincide con otros estudios realizados en México, donde ya ha sido reportada la mutación Ser450Leu como la más común (Ramaswamy, 2016). Es importante recordar que

la frecuencia de las mutaciones puede variar de acuerdo a la zona geográfica de la que se trate (Ozkutuk, 2007).

A pesar de que en nuestro estudio sólo se encontró una mutación en una cepa resistente a rifampicina, se puede ver una relación entre mutación y resistencia. De la misma forma se puede considerar la mutación Ser450Leu como un posible indicador de resistencia a rifampicina de las cepas del estado Michoacán, ya que en Monterrey, México también se ha reportado esta mutación como la más común (Ramaswamy, 2016).

Ninguna de las cepas en estudio presentó mutaciones en el gen *rpsL*, sin embargo, el 23,1% (3 de 13) de las cepas presentaron resistencia a estreptomicina. Esto se puede deber a la existencia de mutaciones en otra región del gen, mutaciones en otro gen asociado a la resistencia a estreptomicina como *rrs* o a algunas mutaciones genéticas y mecanismos de resistencia indefinidos (Wang, 2009).

Lo que se ha encontrado en este estudio nos indica que existe una correlación parcial más no absoluta entre la presencia de mutaciones en los genes *katG*, *rpoB* y *rpsL* y la resistencia a isoniazida, rifampicina y estreptomicina en las cepas del estado de Michoacán. Sería conveniente seguir analizando nuevas cepas resistentes en estudios posteriores y así seguir contribuyendo con información epidemiológica para un mejor diagnóstico en el estado de Michoacán.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- I. El 38,46% (5 de 13) de las cepas presentaron resistencia a por lo menos uno de los medicamentos de primera línea (INH, RIF, EMB, PZA, SM).
- II. El 15,38% (2 de 13) de las cepas resultaron multidrogo-resistentes (MDR-Tb)
- III. Una de las cepas (065) presentó resistencia a cuatro de los medicamentos de primera línea excepto a etambutol.
- IV. El etambutol fue el medicamento con menor cantidad de cepas resistentes con sólo el 7,69%, la isoniazida presentó el 15,38% y la rifampicina, estreptomicina y pirazinamida presentaron el 23,07% de las cepas resistentes.
- V. El mayor número de mutaciones se presentó en el gen *katG* en un 46,15% (6 de 13) de las cepas. El gen *rpoB* presentó un 7,69% de mutaciones (1 de 13 cepas) y en el gen *rpsL* no se presentaron mutaciones en ninguna de las cepas.
- VI. El gen *katG* presentó el mayor número de mutaciones, la mutación más común en cepas resistentes fue la Ser315Thr, esta mutación ya ha sido reportada en la base de datos y se presentó en el 100% (2 de 2) de las cepas resistentes.
- VII. En el gen *rpoB* sólo se presentó una mutación en una cepa resistente fuera de la región RRDR y fue la mutación Ser450Leu.
- VIII. En el gen *rpsL* asociado a la resistencia a rifampicina, no se encontraron mutaciones en ninguna de las 13 cepas de estudio, sin embargo, 3 cepas presentaron resistencia a rifampicina, esto se puede deber a la existencia de mutaciones en otra región del gen o en otro gen asociado a resistencia.

10. CONCLUSIÓN

Las cepas de *M. tuberculosis* obtenidas en el periodo 2012-2014 de aislados del estado de Michoacán, presentaron las mismas mutaciones encontradas en cepas aisladas en 2009-2011 en los genes *katG*, *rpsL* y *rpoB* que se asocian a la resistencia a antibióticos de primera línea. Por lo tanto se acepta la hipótesis planteada.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Almeida Da Silva, P. E., & Palomino, J. C. (2011). Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(7), 1417–1430. <http://doi.org/10.1093/jac/dkr173>
- Araya P, Velasco M, Tognarelli J, Arias F, Leiva T, Sccapatticio P y Alviz J. Detección de mutaciones asociadas a cepas multidrogo resistente de *Mycobacterium tuberculosis* en Chile. *Revista Médica Chile*. 2011; 139(4): 467-473. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003498872011000400008&lng=es.
- Bocanegra-García V, Garza-González E, Cruz-Pulido WL, Guevara-Molina YL, Cantú-Ramírez R, González GM, Rivera G and Palma-Nicolas J. Molecular Assessment, Drug-Resistant Profile, and Spacer Oligonucleotide Typing (Spoligotyping) of *Mycobacterium tuberculosis* Strains From Tamaulipas, México. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2014; 28: 97–103.
- Borrell S and Gagneux S. Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect*. 2011 June; 17(6): 815–820. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3122159/>
- CENAPRECE: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. Disponible en: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/>
- Cuevas-Córdoba B, Cuellar-Sánchez A, Pasissi-Crivelli A, Santana-Álvarez CA, Hernández-Illezcas J and Zenteno-Cuevas R. *rrs* and *rpsL* mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012; 46(1):30-4. doi: 10.1016/j.jmii.2012.08.020. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23040237>

- Chia, B., Lanzas, F., Rifat, D., Herrera, A., Kim, E. Y., Sailer, C., ... Karakousis, P. C. (2012). Use of Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) to Detect Multidrug-Resistant Tuberculosis in Panama, 7(7), 1–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040456>
- Elkington, P. T. (2014). Tuberculosis: Time For a New Pespective NIH-PA Author Manuscript, 66(4), 299–302. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.02.002.TUBERCULOSIS>
- Ali Akbar Velayati, Mohammad Reza Masjedi, MD; Parissa Farnia. Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli. (2009). CHEST, 163: 420-425. <http://doi.org/10.1378/chest.08-2427>
- Freitas, A. D. De, Bernardo, V., Gomgnimbou, M. K., Sola, C., Marques, E. A., & Albano, R. M. (2014). Multidrug Resistant Mycobacterium tuberculosis : A Retrospective katG and rpoB Mutation Profile Analysis in Isolates from a Reference Center in Brazil, 9(8), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0104100>
- Hazbo, M. H., Brimacombe, M., Bobadilla, M., Cavatore, M., Varma-basil, M., Billman-jacobe, H., ... Alland, D. (2006). Population Genetics Study of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis †. Antimicrobial Agentes and Chemotherapy, 50(8), 2640–2649. <http://doi.org/10.1128/AAC.00112-06>
- Herrera-León, L., Pozuelo-Díaz, R., Molina Moreno, T., Valverde Cobacho, A., Saiz Vega, P., & Jiménez Pajares, M. S. (2009). Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo Mycobacterium tuberulosis. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(9), 496–502. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.01.008>
- Jagielski T, Ignatowska H, Bakula Z, Dziewit L, Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z and Bielecki J. Screening for Streptomycin Resistance-Confering Mutations in Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates from

Poland. PLoS One. 2014; 9(6): e100078. Published online Jun 17, 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0100078. PMCID: PMC4061058

Kelley CI, Rouse DA and Morris SI. (1997) Analysis of *ahpC* Gene Mutations in Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. American Society for Microbiology, p. 2057–2058 Vol. 41, No. 9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164068/pdf/412057.pdf>

Karakousis PC and Mayers D. (2009), Mechanisms of Action and Resistance of Antimycobacterial Agents. Antimicrobial Drug Resistance. New York: Human Press, p. 271–291. Disponible: http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-59745-180-2_24

Kuijper, E. J., Welten, A. G. A., & Dankert, J. (2001). The Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and the Arg 3 Leu Mutation at Codon 463 of *katG* Are Not Associated. Journal of Clinical Microbiology, 39(4), 1591–1594. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1591>

Napio, A. (2014). Detection of mutations associated with isoniazid resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2369–2375. <http://doi.org/10.1093/jac/dku161>

Narayanan, P. R. (2001). Mutations in the *rpoB* Gene of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from India. Journal of Clinical Microbiology, 39(8), 2987–2990. <http://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2987>

NCBI: National Center for Biotechnology. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013 para la Prevención y Control de la Tuberculosis. Disponible: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5321934&fecha=13/11/2013

Ozkutuk, N., Gazi, H., Surucuoglu, S., Gunduz, A., & Ozbakkaloglu, B. (2007). Characterization of *rpoB* Mutations by Line Probe Assay in Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from the Aegean

- Region in Turkey. Jpn. J. Infect. Dis, 211–213.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17642536>
- Qazi, O., Rahman, H., Tahir, Z., Qasim, M., Khan, S., Ahmad, A., ... Firyal, S. (2014). Mutation pattern in rifampicin resistance determining region of rpoB gene in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Pakistan. *International Journal of Mycobacteriology*, 3(3), 173–177.
<http://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.06.004>
- Ramaswamy, S. V, Dou, S., Rendon, A., Yang, Z., Cave, M. D., & Graviss, E. A. (2016). Genotypic analysis of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from. *Journal of Clinical Microbiology*, 107–113.
<http://doi.org/10.1099/jmm.0.05343-0>
- Report, G., & Surveillanceresponse, O. N. (2010). Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) 2010.
- Sakamoto, K. (2012). The Pathology of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Infectious Disease*, 49(3), 423–439. <http://doi.org/10.1177/0300985811429313>
- Sambrook J and Russell David. Molecular cloning: A laboratory manual. 2001. 3 ed. Vol.II, Chap. 8, protocol 1.
- Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, Kobayashi I, Morita K, Kudo K, Kato S, Kuratsuji T, Mori T, and Kirikae T. (2007). Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 45(1): 179–192. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828975/>
- Shi R, Zhang J, Otomo K, Zhang G and Sugawara I. (2007). Lack of Correlation between embB Mutation and Ethambutol MIC in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from China. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 51(12): 4515–4517. Doi: 10.1128/AAC.00416-07. PMCID: PMC2167975
- Sonora, D., Bolado-martínez, E., C, D., Pérez-mendoza, A., Alegría-morquecho, F.

- M., Candia-plata, M. C., ... C, D. (2012). Mutaciones asociadas con resistencia a rifampicina o isoniazida en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*. *Artículo Breve*, 54(2), 167–170.
- Stucki D and Gagneux S. (2013). Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. *Tuberculosis* Volume 93, Issue 1 , Pages 30-39, 2013 [http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792\(12\)00202-8/fulltext](http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792(12)00202-8/fulltext)
- Sun, Y., Luo, J., Wong, S., & Lee, A. S. G. (2009). Analysis of rpsL and rrs mutations in Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Singapore. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(3), 287–289. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02800.x>
- Tekwu, E. M., Sidze, L. K., Assam, J. A., Tedom, J., Tchatchouang, S., Makafe, G. G., ... Frank, M. (2014). Sequence analysis for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from the Central Region of Cameroon. *BMC Microbiology* 1–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4017682/pdf/1471-2180-14-113.pdf>
- Tracevska, T., Jansone, I., Broka, L., Marga, O., & Baumanis, V. (2002). Mutations in the rpoB and katG Genes Leading to Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. *J Clin Microbiol*, 40(10), 3789–3792. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3789>
- Wang, Y., Zhu, R., Xu, Y., Zhao, M., Liu, Y., Li, B., & Chen, J. (2009). Molecular Characterization of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Guangdong , China. *Jpn. J. Infect. Dis* 270–274.
- WHO. (2008). New Laboratory Diagnostic Tools for Tuberculosis Control. *World Health*, 1–20.
- WHO: World Health Organization. <http://www.who.int/en/>

- Zaczek, A., Brzostek, A., Augustynowicz-kopec, E., Zwolska, Z., & Dziadek, J. (2009). Genetic evaluation of relationship between mutations in *rpoB* and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin, 8(Cdc). *BMC microbiology*, 1–8. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-9-10>
- Zhang, Y., Wade, M. M., Scorpio, A., Zhang, H., & Sun, Z. (2003). Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid, 52(5), 790–795. <http://doi.org/10.1093/jac/dkg446>
- Zhang, Y., & Yew, W. W. (2009). STATE OF THE ART Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Long Dis* 13(11), 1320–1330.
- Zhao, L., Chen, Y., Chen, Z., Liu, H., Hu, P., Sun, Q., ... Wan, K. (2014). Prevalence and Molecular Characteristics of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Hunan , China. *AAC Journals. AMS* 58(6), 3475–3480. <http://doi.org/10.1128/AAC.02426-14>