



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”**



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

**“Estudio de los determinantes genéticos
asociados a la resistencia a antibióticos en cepas
de *M. tuberculosis* aisladas en Michoacán”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:
QUIMICA FARMACOBIOLOGA LILIANA PÉREZ
REYES**

**ASESORA:
DOCTORA EN CIENCIAS MA. SOLEDAD VÁZQUEZ
GARCIDUEÑAS**

MORELIA, MICHOACÁN. AGOSTO 2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por iluminarme, acompañarme y ayudarme siempre, en especial en los momentos difíciles.

Gracias a mis papás por su apoyo incondicional, por animarme siempre en todos mis proyectos y por sus sabios consejos, por aguantar mis neurosis, sobre todo en la escritura de la tesis,

Gracias a mis hermanos Jacqueline, Marisol, Isaias y Luis Rodrigo, pilares en mi vida.

Gracias a mi asesora, la Dra. Sol: por su guía, paciencia, ayuda, consejos, por las anécdotas y risas compartidas.

Gracias a Ana: mi maestra en el laboratorio, gracias por compartir sus enormes conocimientos conmigo, pero sobre todo, por su gran amistad.

Gracias a Mar, Erandi, Paulina, Julieta: siempre se agradece conocer personas con quien compartir el gusto por el estudio y las carcajadas a todo pulmón. Me divertí mucho con ustedes.

Gracias a mis amigos de generación, Adrián, Yazmín, Paola, Lindsey, David, Anahí y Nora: son grandes personas, espero que nuestra amistad continúe.

Gracias a Jesús, Norma, Ale, Lucero, Maribel, Lucy, Oly, Selene: mis amigas de tantos años.

Gracias a todos los que de alguna u otra manera me ayudaron y apoyaron para concretar este sueño.

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 D. en C. Ma. Soledad Vazquez 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” y 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 para estudios de maestría otorgada por CONACyT con número de expediente (CVU/Becario): 444832/268357.

CONTENIDO

Indice General	I
Indice de Tablas	IV
Indice de Figuras	V
Abreviaturas	VI
Resumen	VIII
Abstract	IX

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 AGENTE CAUSAL DE LA TUBERCULOSIS	1
1.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	2
1.3 EXPOSICIÓN E INFECCIÓN.....	3
1.4 ESTADÍSTICAS	4
1.5 TRATAMIENTO CONTRA LA TUBERCULOSIS	5
1.6 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN EL CMTB.....	7
1.7 MECANISMOS DE RESISTENCIA	8
1.7.1 Mecanismos de Resistencia Intrínseca	8
1.7.2 Mecanismos de Resistencia Adquirida.....	9
1.8 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS MEDICAMENTOS ANTIFÍMICOS	10
1.8.1 Isoniazida (INH).....	10
1.8.2 Rifampicina (RIF).....	11
1.8.3 Pirazinamida (PZA).....	12
1.8.4 Etambutol (EMB).....	12
1.8.5 Estreptomina (SM).....	13
1.9 CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	14
1.9.1 <i>katG</i>	14
1.9.2 <i>prom mabA</i>	14
1.9.3 <i>rpoB</i>	14
1.9.4 <i>embB</i>	15
1.9.5 <i>rrs</i>	15
1.9.6 <i>rpsL</i>	15
1.9.7 <i>pncA</i>	15
1.10. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUTACIONES QUE CONFIEREN RESISTENCIA.....	16

1.11 FRECUENCIA EN DISTINTOS PAÍSES DE LA PRESENCIA DE MUTACIONES RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	17
1.12 PUNTOS IMPORTANTES A CONSIDERAR	18
1.13 ANTECEDENTES.....	19
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	21
4.1 OBJETIVO GENERAL	21
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
5. ESTRATEGIA.....	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO	23
6.2 MANEJO DE MUESTRAS	23
6.3 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.....	23
6.4 EXTRACCIÓN DE ADN.....	24
6.5 AMPLIFICACIONES POR PCR.....	24
6.6 SECUENCIACIÓN.....	26
6.7 ANÁLISIS DE DATOS	26
7. RESULTADOS	27
7.1 AMPLIFICACIONES POR PCR.....	27
7.2 DETECCIÓN DE SNP'S	30
7.2.1 Mutaciones en el gen <i>katG</i>	32
7.2.2 Mutaciones en el gen <i>embB</i>	33
7.2.3 Mutaciones en el gen <i>rpoB</i>	33
7.2.4 Mutaciones en el gen <i>rpsL</i>	34
7.2.5 Mutaciones en el gen <i>pncA</i>	34
7.2.6 Mutaciones en el gen <i>rrs</i>	34

7.2.7 Mutaciones en el Promotor <i>mabA</i>	34
7.3 ANTIBIOGRAMAS	35
7.4 RELACIÓN ENTRE RESISTENCIA Y FAMILIA	37
7.5 RELACION ENTRE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y PRESENCIA DE MUTACIONES.....	39
7.5.1 ISONIAZIDA	39
7.5.2 RIFAMPICINA	39
7.5.3 ETAMBUTOL.....	40
7.5.4 PIRAZINAMIDA	40
7.5.5 ESTREPTOMICINA.....	40
7.6 FRECUENCIAS DE APARICIÓN DE MUTACIONES.....	41
8. DISCUSIÓN	43
9. RESUMEN DE RESULTADOS	49
10. CONCLUSIÓN	50
11. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE TABLAS

1. INICIADORES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.....	25
2. MUTACIONES ENCONTRADAS EN LAS CEPAS DE ESTUDIO.....	31
3. POLIMORFISMOS ENCONTRADOS EN EL GEN <i>KATG</i>	32
4. POLIMORFISMOS DETECTADOS EN EL GEN <i>EMBB</i>	33
5. POLIMORFISMOS GEN <i>RPOB</i>	33
6. POLIMORFISMOS GENES <i>RPSL</i> , <i>PNCA</i> , <i>RRS</i> , <i>MABA</i>	34
7. ANTIBIOGRAMAS DE LAS CEPAS DE ESTUDIO.....	35
8. SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN LAS CEPAS MENÍNGEAS.....	37
9. RELACIÓN ENTRE PATRONES DE RESISTENCIA, LINAJE Y FAMILIA.	38
10. CEPAS MDR-TB Y FAMILIA A LA QUE PERTENECEN.	39
11. RELACIÓN RESISTENCIA Y PRESENCIA DE MUTACIONES.....	41
12 . COMPARACIÓN DE PORCENTAJES OBTENIDOS CON OTROS REPORTADOS.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

1. ADN DE LAS CEPAS DE ESTUDIO.....	27
2. AMPLIFICACIÓN DE SIETE GENES DE INTERÉS CON EL ADN DE LA CEPA DE REFERENCIA.....	27
3. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS CON EL ADN DE LAS CEPAS DE ESTUDIO.....	28
4. ELECTROFEROGRAMAS.	29
5. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS EN EL PROGRAMA CLUSTALX2.0.	30
6. RESISTENCIA A MEDICAMENTOS.....	36

ABREVIATURAS

A:	Adenina
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
C:	Citosina
°C:	Grados Centígrados
CENAVE:	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CMTB:	Complejo Mycobacterium tuberculosis
EMb:	Etambutol
FDA:	French Departments of the Americas
g:	Gravedad
G:	Guanina
HGMS:	Hospital General Dr. Miguel Silva
IMSS:	Intituto Mexicano del Seguro Social
INH:	Isoniazida
LESP:	Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán
M:	Molar
MDR-TB:	Multidrogorresistente
MgCl ₂ :	Cloruro de Magnesio
min:	Minutos
MIRU-VNTR:	Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats
mM:	Micromolar
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NOM:	Norma Oficial Mexicana
OMS:	Organización Mundial de la Salud
pb:	Pares de Bases
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
R:	Resistente
PZA:	Pirazinamida

RIF:	Rifampicina
RNA:	Ácido ribonucleico
S:	Sensible
seg:	Segundos
SM:	Estreptomicina
SNP's:	Polimorfismo de un solo nucleótido
T:	Timina
TB:	Tuberculosis
TBTF:	Tuberculosis en todas sus formas
TDR-TB:	Tuberculosis totalmente drogo-resistente
µl:	Microlitro
µM:	Micromolar
UV:	Ultra violeta
VIH:	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WHO:	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
XDR-TB:	Extremadamente Drogorresistente

RESUMEN

El agente causal de la tuberculosis (TB) es *Mycobacterium tuberculosis*. El tratamiento estándar contra la TB involucra seis meses con rifampicina, isoniazida, pirazinamida, etambutol y estreptomina. En base a la resistencia de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, las cepas se han clasificado en Multidrogosresistentes (MDR-TB) y extremadamente drogosresistentes (XDR-TB). Se han encontrado asociaciones entre mutaciones en el gen *rpoB* y la resistencia a rifampicina; el gen *katG* y el promotor *mabA* y la resistencia a isoniazida; el gen *pncA* y la resistencia a pirazinamida; el gen *embB* y la resistencia a etambutol; los genes *rrs* y *rpsL* y la resistencia a estreptomina. La presencia de estas mutaciones varía en frecuencia en cada país y por región en un mismo país. Por lo que para poder diseñar herramientas diagnósticas, es necesario conocer la relación entre dichas mutaciones y los patrones de resistencia hacia medicamentos de primera línea en cada región. En el presente trabajo se realizaron mediante el equipo BACTEC-MGIT, los antibiogramas de 33 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* recolectadas del 2009 al 2011 en el estado de Michoacán, encontrándose que el 21.2% de las cepas fueron resistentes a rifampicina. Las mutaciones se detectaron mediante amplificación por PCR, secuenciación de los genes de interés, alineamiento con el programa Clustal X 2.0 y comparación con TB Database y TB Drug Resistance Mutation Database. El gen que presentó mayor porcentaje de mutaciones fue el gen *katG* (30.3%). El 54.5% de las cepas presentan al menos una mutación en cualquiera de los genes analizados. Al analizar las cepas resistentes encontramos mutaciones reportadas en la bibliografía, pero también encontramos mutaciones nuevas. Entre las cepas analizadas destacan 4 provenientes de pacientes con tuberculosis meníngea, que presentaron amplia sensibilidad a los medicamentos de la primera línea, hecho que coincide con lo reportado en otras regiones del mundo. 62.5% de las cepas resistentes a algún medicamento, presentaron alguna mutación relacionada a resistencia.

PALABRAS CLAVE: tuberculosis, resistencia medicamentos, mutaciones.

ABSTRACT

The Actinobacteria *Mycobacterium tuberculosis* is the causal agent of tuberculosis (TB). Based on the antibiotic resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, TB strains have been classified as multidrug-resistant (MDR-TB) and extensively drug-resistant (XDR-TB). The six-month treatment against TB involves rifampin, isoniazid, pyrazinamide, ethambutol and streptomycin. Associations between mutations in specific genes and resistance to antibiotics have been reported (*rpoB* and rifampicin; *katG* and promoter *mabA* and isoniazid; *pncA* and pyrazinamide; *embB* and ethambutol; *rrs* and *rpsL* and streptomycin). The frequency of these mutations varies in each country and region within a country so in order to design diagnostics tools, the relationship between mutations and first line resistance patterns in each country must be known. We recognized the susceptibility patterns (using BACTEC-MGIT equipment) and detected mutations (by PCR amplification, sequencing of genes of interest, alignment with Clustal X 2.0 software, and comparison with the TB Drug Resistance Mutation Database) in 33 strains of *Mycobacterium tuberculosis* collected in the state of Michoacán from 2009 to 2011. We found 21.2% of the studied strains were resistant to rifampin. Genes *katG* and *rpoB* showed the highest mutation percentage within the studied collection of strains (30.3% and 27.2%, respectively). 54.5% of the strains presents at least one mutation in any of the analyzed genes. Our analysis of resistant strains found both new and previously reported in the literature mutations such as the *katG* gene Ser315Thr. As reported for other regions of the world, the four analyzed strains isolated from patients with meningeal tuberculosis showed extensive drug susceptibility of first line antibiotics. Only two of the latter strains had mutations in the *katG* gene: strain 049 with synonymous Ala411Ala mutation having no influence on antibiotics sensitivity, and 040 with Arg463Leu mutation reported as producing resistance in some cases. 62.5% of the strains resistant to drugs showed some resistance mutation.

KEY WORDS: tuberculosis, antibiotic resistance, mutations

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 en TB en humanos (Guillén-Nepita y col., 2010).

Desde la última década del siglo pasado, estudios del CMTB utilizando técnicas genético moleculares, han permitido:

- conocer la variación genética entre los aislados clínicos y la incidencia y distribución de los diferentes genotipos a escala regional y global.
- establecer subespecies del CMTB.
- distinguir entre micobacterias clasificadas en el CMTB y micobacterias atípicas.
- establecer subfamilias y la relación evolutiva entre ellas.
- identificar si un caso es debido a transmisión reciente o por reactivación de una infección previa.
- identificar patrones de resistencia a medicamentos.
- la descripción de la transmisión dinámica en poblaciones en particular (WHO: Global Tuberculosis Control 2011).

El crecimiento de la epidemiología molecular hizo posible la primera identificación de grandes grupos de aislados con patrones de bandeo similares, los cuales fueron llamados genotipos (WHO: Global Tuberculosis Control 2011). El primer genotipo identificado fue nombrado Beijing (Van-Soolingen y col., 1995).

La biología molecular ha hecho aportes significativos al estudio de la epidemiología de la TB a través de diversos métodos, con lo cual se ha podido describir mejor los brotes epidémicos de TB, la dinámica de transmisión, el estudio de TB posprimaria, los factores de riesgo para TB en población general y en grupos vulnerables, la distribución geográfica de *M. tuberculosis* y la resistencia a medicamentos (Wong y col., 2011).

1.2 Características bioquímicas de *M. tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria aerobia, no esporógena, cilíndrica, que mide 0.5 a 3 µm. Las micobacterias no suelen captar el colorante de Gram. Sin embargo, una vez teñidos, los bacilos no pueden decolorarse con el alcohol ni los ácidos, propiedad que los caracteriza como bacilos ácido alcohol resistentes. Esa resistencia a la coloración se debe principalmente a que estos microorganismos tienen en la pared celular una gran cantidad de ácidos micólicos, ácidos grasos de cadena larga y enlaces cruzados, y otros lípidos. Esta estructura es causa de la escasísima permeabilidad de la pared celular, y por lo tanto, de la ineficacia que muestran los antibióticos contra este microorganismo (Raviglione y col., 2008).

Bajo las condiciones favorables del laboratorio, *M. tuberculosis* se divide cada 12 a 24 h. Este crecimiento es extremadamente lento en comparación con otras bacterias, las cuales se duplican en intervalos tan cortos como 15 minutos a una hora. Esto se debe parcialmente a la impermeabilidad de la pared celular, que limita el paso de los nutrientes. Las bacterias del complejo *M. tuberculosis* se multiplican en un rango estrecho de temperatura y pH, y en alta tensión de oxígeno, lo cual es indicativo del 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 2-4°C hasta -70°C. Con ultra congelación, la viabilidad del bacilo permanece casi intacta, así como sus propiedades taxonómicas, serológicas, inmunológicas y patogénicas. Por otro lado, el bacilo es

muy sensible al calor, la luz del sol y la radiación ultravioleta (Palomino y col., 2007).

1.3 Exposición e infección

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. Estas gotitas se secan pronto; pueden permanecer suspendidas en el aire durante horas y alcanzar las vías respiratorias terminales al ser inhaladas. Las probabilidades de entrar en contacto con un caso de tuberculosis positivo, la duración e intimidad del contacto, el grado de contagiosidad y el ambiente que se comparte con la persona enferma, todo éstos son factores importantes para la transmisión. Por lo tanto, el riesgo de adquirir la infección tuberculosa depende principalmente de factores exógenos; aunque también entran en juego factores endógenos como la predisposición natural a la enfermedad y la eficacia funcional de la inmunidad celular (Raviglione y col., 2008).

La enfermedad clínica que aparece poco después de la infección se clasifica como tuberculosis primaria. La mayoría de los individuos infectados que finalmente desarrollará tuberculosis lo hacen en el primer o segundo año después de adquirir la infección. Sin embargo, el bacilo inactivo puede persistir por años antes de reactivarse y producir tuberculosis secundaria (o post primaria), que a causa de la formación de cavidades, es más infecciosa que la primaria. Se calcula que el 10% de las personas infectadas finalmente desarrollarán tuberculosis activa en algún momento de su vida. Una condición que favorece el desarrollo de una tuberculosis activa es sin duda la infección simultánea por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que suprime la inmunidad celular. La tuberculosis es una enfermedad oportunista muy importante para personas infectadas con VIH (Raviglione y col., 2008).

La tuberculosis no tratada suele ser letal; alrededor del 33% de los pacientes sin tratamiento fallecía en el primer año tras el diagnóstico, y la mitad en los cinco

años posteriores al mismo. Si los pacientes son tratados adecuada y oportunamente, tienen gran posibilidad de curarse. Sin embargo, el uso inapropiado de antifímicos, a pesar de que disminuye la cifra de mortalidad, también origina gran número de casos infecciosos crónicos, a menudo con bacilos farmacorresistentes (Raviglione y col., 2008).

En las primeras fases evolutivas de la enfermedad las manifestaciones clínicas suelen ser inespecíficas e insidiosas, consistiendo ante todo en fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, anorexia, malestar general y debilidad. Casi siempre aparece la tos, que al principio puede ser seca y después se acompaña de expectoración purulenta, a veces con estrías de sangre en el esputo (Raviglione y col., 2008).

Fuera del pulmón, los sitios donde con mayor frecuencia se localiza la tuberculosis son, por orden de frecuencia: ganglios linfáticos, pleura, aparato genitourinario, huesos y articulaciones, meninges, peritoneo y pericardio. Pero prácticamente todos los órganos y aparatos pueden resultar afectados. Dada la diseminación hematogena en los individuos infectados por el VIH, la tuberculosis extrapulmonar es más frecuente hoy en día (Raviglione y col., 2008).

1.4 Estadísticas

La tuberculosis es más común entre hombres que entre mujeres, y afecta principalmente a la población económicamente activa: dos tercios de los casos se presentan entre personas de 15-59 años. En general, una pequeña porción de las personas infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* desarrollará la enfermedad; sin embargo, ésta probabilidad aumenta entre personas infectadas con VIH. (WHO: Global Tuberculosis Control 2012).

El tratamiento tiene una efectividad reportada en el 2009 a la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 87%. A pesar de existir tratamientos eficaces disponibles, la tuberculosis es considerada un gran problema de salud a nivel mundial. En 1993, la OMS declaró una emergencia global de TB, ya que se presentaron de 7-8 millones de casos y 1.3-1.6 millones de muertes por año en esas fechas. La tuberculosis es la segunda causa de muerte por enfermedades

infecciosas a nivel mundial, siendo la primera el VIH (WHO: Global Tuberculosis Control 2012).

En el reporte del año 2012, la OMS informó que:

- había 8.7 millones de casos de TB en el mundo (204 países y territorios).
- se registraron 1.4 millones de muertes, incluidos 430 000 pacientes VIH-positivos.
- uno de cada cuatro muertes entre los pacientes VIH-positivos, es debida a TB.
- los países que reportan más casos son los asiáticos y los africanos.
- ningún país ha podido erradicar la tuberculosis.
- se reportaron 630 000 casos de multidrogo-resistencia MDR-TB a nivel mundial, y se estima que el 9% de éstos fueron XDR-TB.

En México la Secretaría de Salud a través del CENAVE (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades) reportó para el 2012, 19,445 casos nuevos de TB en todas sus formas; de estos 15,843 casos fueron de TB pulmonar y se reportaron 2414 defunciones para TBTF (TB en todas sus formas) (CENAVE).

1.5 Tratamiento contra la tuberculosis

La historia de la tuberculosis cambió dramáticamente con la introducción de los agentes anti-fímicos. El tratamiento es fundamental para controlar la TB, promover la cura de los pacientes y romper la cadena de transmisión cuando el régimen del tratamiento se sigue completa y correctamente (Palomino y col., 2007).

Los medicamentos anti-TB se clasifican en:

- ★ Primera línea: isoniazida, rifampicina, pirazonamida, etambutol y estreptomicina.
- ★ Segunda línea: incluye los aminoglucósidos, kanamicina y amikacina, el capreomicina polipéptido, ácido para-aminosalicílico, cicloserina, las

tioamidas etionamida y protionamida y algunas fluoroquilonas como moxifloxacino, levofloxacino y gatifloxacino (Palomino y col., 2007).

Algunos esquemas de tratamiento están recomendados dependiendo de factores, tales como localización y gravedad de la enfermedad, resultado de la baciloscopía, co-infección con VIH, prevalencia de la resistencia a medicamentos, disponibilidad de los medicamentos, costo del tratamiento y la supervisión médica, si el paciente ha recibido previamente algún medicamento anti-TB, el presupuesto del país, cobertura de los sistemas de salud pública. Se deben considerar todos estos factores para seleccionar el cuadro de tratamiento (Palomino y col., 2007).

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud, los medicamentos que se utilizan en el tratamiento de la tuberculosis son: Isoniazida, Rifampicina, Pirazonamida, Estreptomina y Etambutol.

El tratamiento primario supervisado comprende:

- una fase intensiva: diario de lunes a sábado hasta completar 60 dosis, administración en una toma, medicamentos separados, combinación fija, administrar 4 grageas juntas: isoniazida, rifampicina, pirazonamida.
- una fase de sostén: Intermitente dos veces por semana, lunes y jueves o martes y viernes, hasta completar 30 dosis, administración en una toma, medicamentos separados, combinación fija, administrar 4 cápsulas juntas: isoniazida, rifampicina (NOM-006-SSA2-1993).

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 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 y col., 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 y col., 2007).

1.6 Resistencia a antibióticos en el CMTB

La resistencia a medicamentos que presenta el 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 (Borrel y Gagneux, 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:

- tuberculosis 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.
- tuberculosis 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) (Global report on surveillance and response OMS, 2010).

Los pacientes que presentan estas cepas MDR-TB necesitan tratamientos que involucren medicamentos de la segunda línea, que son más costosos, más tóxicos y menos efectivos. La resistencia a medicamentos en la tuberculosis es un hecho de gran preocupación en los programas de control de la TB, ya que para algunas cepas multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) no hay tratamiento. Por otra parte, las cepas que presentan extrema farmacorresistencia (XDR-TB) ya han sido aisladas en diferentes países del mundo, incluyendo México, y constituyen una amenaza para el control y

diseminación de esta enfermedad. La vigilancia de la farmacorresistencia en la TB es un componente crítico para el monitoreo de la TB (Palomino y col., 2007).

Durante el resurgimiento de la TB en los años 80 y los años posteriores, se observó un incremento en la múltiple y extensiva resistencia a medicamentos (Palomino y col., 2007). En el 2009, se propuso el término “Tuberculosis totalmente drogo-resistente (TDR-TB)” para cepas que mostraron resistencia *in vitro* a todos los medicamentos probados de primera y segunda línea (isoniazida, rifampicina, estreptomina, etambutol, pirazinamida, etionamida, ácido para-aminosalicílico, cicloserina, ofloxacina, amikacina, ciprofloxacina, capreomicina, kanamicina) (Velayati y col., 2013).

1.7 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia que presenta *Mycobacterium tuberculosis* se puede clasificar en dos grupos: mecanismos de resistencia intrínseca y mecanismos de resistencia adquirida.

1.7.1 Mecanismos de Resistencia Intrínseca.

Son mecanismos que permiten neutralizar la acción de los antibióticos y no sólo limitan la aplicación de los medicamentos disponibles, sino que obstaculizan el desarrollo de nuevos fármacos (Smith y col., 2013).

- a) La impermeabilidad de la pared, que funciona como una barrera efectiva que impide la penetración de los antibióticos, ya que es muy gruesa, formada por múltiples capas y con variada hidrofobicidad. Su composición es la siguiente: sáculos de péptido glucano están cubiertos por una capa de arabinogalactano; ambas capas están covalentemente unidas a una capa externa de ácidos micólicos, largas cadenas de ácidos grasos que forman una cera, restringiendo la penetración de moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas (Smith y col., 2013).
- b) Las porinas, proteínas localizadas en las capas externas de la pared celular, que permiten importar nutrientes y pequeñas moléculas que se

requieren en el crecimiento, también están involucradas en el paso de los antibióticos al interior de la célula. Aunque en *M. smegmatis* ya se ha estudiado la sobreexpresión de estos elementos, en *M. tuberculosis* no se ha demostrado directamente la relación entre las porinas y la susceptibilidad a medicamentos (Smith y col., 2013).

- c) Modificación estructural de los puntos de acción de los medicamentos: un ejemplo es la resistencia natural de *M. tuberculosis* a macrólidos. Estos antibióticos detienen el crecimiento de las bacterias inhibiendo la maquinaria de síntesis de proteínas, al unirse a un sitio específico del RNA ribosomal (Smith y col., 2013).
- d) Modificación química de los medicamentos: un ejemplo es la acción de la enzima acetiltransferasa sobre los aminoglucósidos, lo que le confiere la resistencia a *M. tuberculosis* a medicamentos de éste grupo (Smith y col., 2013).
- e) Degradación enzimática de los medicamentos: a través de enzimas hidrolasas, como las β -lactamasas (Smith y col., 2013).
- f) Bombas de eflujo: muchas de estas proteínas de membrana participan en la fisiología de la bacteria: transportando nutrientes, toxinas, desechos y moléculas a través de la membrana. Sus funciones en la resistencia a antibióticos pueden ser secundarias y debidas a transportación no específica, expulsando el medicamento al exterior (Smith y col., 2013).

1.7.2 Mecanismos de Resistencia Adquirida

Son mutaciones cromosomales específicas que son seleccionadas bajo presión selectiva del antibiótico en uso. En *M. tuberculosis*, la transferencia horizontal de genes de resistencia vía plásmidos o transposones no ha sido reportada. Como cualquier otro rasgo durante la evolución selectiva, las cepas resistentes a antibióticos solo serán predominantes en la población de *M. tuberculosis* si el fenotipo resistente proporciona mutantes con ventajas de supervivencia sobre sus contrapartes sensibles. La prolongada exposición a los medicamentos debido a los largos tratamientos pueden contribuir de manera importante a la selección

evolutiva de cepas resistentes que de otra manera apenas sobresaldrían entre la población debido a su reducido metabolismo comparado con cepas sensibles. Recientes estudios mostraron que la exposición de las bacterias a niveles sub letales promueve mutagénesis celular, incrementando las tasas de mutaciones en los genes de resistencia. Los mecanismos de resistencia adquirida están frecuentemente asociados a una reducción del metabolismo en las mutantes resistentes. Se han observado mecanismos compensatorios en éstas cepas, por ejemplo, sobre-expresión de enzimas o mutaciones adicionales que corrigen el costo metabólico (Smith y col., 2013).

Los principales genes en los que se encuentran localizadas mutaciones relacionadas con resistencia a medicamentos son: *katG* y *prom mabA* (INH), *rpoB* (RIF), *embB* (EMB), *rrs* y *rpsL* (SM) y *pncA* (PZA). Este tipo de mutaciones independientes se localizan en genes que codifican ya sea el blanco de acción del medicamento o la enzima involucrada en la activación del medicamento. Sin embargo, las bases genéticas de la resistencia a algunos agentes anti-TB no son totalmente conocidas (De Rossi y col., 2006).

1.8 Mecanismo de acción de los medicamentos antifímicos

A continuación se presentan los medicamentos de la primera línea utilizados para el tratamiento de la tuberculosis y sus características.

1.8.1 Isoniazida (INH). Es un fármaco sintético introducido en terapéutica en 1952. De hecho, la INH es un profármaco que requiere una activación *in vivo* que producirá un potente derivado, que finalmente actuará en la síntesis de los ácidos micólicos de la pared de *M. tuberculosis*. La activación de la INH se lleva a cabo por la enzima catalasa-peroxidasa (Pere, 2003). Es un medicamento que actúa contra bacilos tanto metabólicamente activos, como bacilos en latencia (Palomino y col., 2007). La forma activada interfiere con la síntesis de ácidos micólicos esenciales por inhibición de la enoil-ACP reductasa dependiente de

NADH, la cual es codificada por *inhA*. Se ha demostrado que dos mecanismos moleculares son la causa principal de resistencia a isoniazida: mutaciones en *katG* y mutaciones en *inhA*, o más frecuentemente en su región promotora. 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. La mutación más común es S315T, la cual resulta en un producto de isoniazida que es altamente deficiente para formar el isoniazida-NAD relacionado con la actividad antimicrobial de isoniazida. Interesantemente, se ha demostrado que la mutación S315T en *katG* ocurre con más frecuencia en MDR que en cepas mono-resistentes a isoniazida, y se ha postulado que ésta alteración no produce un costo metabólico, mientras una sobre expresión de *inhA* sí puede producir este costo. La mutación más común en *inhA* ocurre en la región promotora (-15C→T) y se ha encontrado más frecuentemente asociada con cepas monorresistentes (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

1.8.2 Rifampicina (RIF). Es un antimicrobiano semisintético introducido en terapéutica en el año 1967 (Pere, 2003). Es bactericida contra 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 PZA (Palomino y col, 2007). Difunde fácilmente a través de la envoltura celular; es inhibidor de la síntesis de mRNA, al bloquear la elongación, fijándose a la subunidad β de la RNA polimerasa, codificada por el gen *rpoB* (Lemus-Molina y col., 2007). Cuando hay alguna mutación en este gen *rpoB* hay un cambio conformacional para ésta subunidad β y esto deriva en una baja afinidad por la RIF (Karakousis, 2009). Un descubrimiento importante relacionado a la resistencia a rifampicina es que casi todas las cepas resistentes a rifampicina también muestran resistencia a otros medicamentos, particularmente a la isoniazida. Por esta razón, la detección de resistencia a rifampicina ha sido propuesta como un marcador molecular para MDR (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

1.8.3 Pirazinamida (PZA). Fue descubierta en 1952 e introducida en el tratamiento anti TB a principios de los años 50. Su uso permitió la reducción del tratamiento de 9 a 6 meses. Una característica clave de la PZA es su habilidad para inhibir bacilos latentes que residen en ambiente ácidos. Es un pre fármaco que es convertido a su forma activa, el ácido pirazinóico, por la enzima micobacteriana piracinamidasa (Almeida Da Silva y Palomino, 2011). La PZA difunde pasivamente al interior de los macrófagos, donde es convertida en ácido piracinoico que se acumula intracelularmente por un sistema ineficiente de bombeo. El ácido piracinoico actúa sobre su diana, una enzima implicada en la síntesis de los ácidos micólicos, tanto directamente como porque disminuye el pH intracelular por debajo de los límites tolerados por esta enzima (Pere, 2003). PZA es bactericida solo contra *M. tuberculosis*, no presenta actividad in vitro contra ninguna otra micobacteria, ni ningún otro microorganismo. Es activo contra bacilos persistentes y bacilos que no están en división; incluso aquellos que están de manera intracelular (Palomino y col., 2007).

Se ha observado que cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA, poseen mutaciones dispersas en el gen estructural (*pncA*) o en el promotor de la piracinamidasa. No obstante, existen cepas resistentes a la PZA, sin mutaciones en el gen *pncA*, en las que esta resistencia se debe a otros mecanismos relacionados con la permeabilidad o bombas de eflujo. Otro miembro del complejo, *Micobacterium bovis* es constitutivamente resistente a la PZA debido a una mutación puntual, C → G en el codón 169, en el gen *pncA* (Pere, 2003).

1.8.4 Etambutol (EMB). El etilen-diamino-dibutanol es un producto derivado de la etilendiamina (Pere, 2003). Fue usado por primera vez contra TB en 1966 (Almeida Da Silva y Palomino, 2011). Bloquea la incorporación de los ácidos micólicos, lo que provoca una inhibición de la biosíntesis de la pared micobacteriana (Lemus-Molina y col., 2007). EMB es solo activo contra bacilos en división, siendo bacteriostático (Palomino y col., 2007). Sin embargo, incrementa la susceptibilidad a otras drogas. La resistencia a etambutol (EMB) es mediada

primeramente por mutaciones en el gen *embB*, que codifica para la arabinosiltransferasa que participa en la síntesis de la pared celular de la micobacteria, cuyo codón 304 es el más afectado comúnmente. Además, mutaciones en otros sitios del gen *embB* (como el codón 406) y río arriba en *embA* y en *embC*, también están involucradas en la resistencia a EMB (Feuerriegel y col., 2012). Hay un porcentaje importante de aislados resistentes a etambutol que no tienen mutaciones en *embB*, destacando el hecho de que debe haber otros mecanismos para la resistencia a etambutol que todavía no hay sido descritos (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

1.8.5 Estreptomicina (SM). Fue el primer medicamento que se descubrió con actividad antituberculosa (Palomino y col, 2007). Es un aminoglucósido que interfiere en la síntesis de proteínas procarióticas, produce errores de lectura en el código genético como son la inhibición de la iniciación y la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica durante la transcripción del mRNA. La resistencia a la estreptomicina es mediada por mutaciones en diferentes genes (Lemus-Molina y col., 2007). Polimorfismos en *rrs* y *rpsL*, que codifican para el 16S rRNA y la proteína S12 ribosomal, respectivamente, son los principales responsables de la alta resistencia a este medicamento (Feuerriegel y col., 2012). La mayoría de los puntos de las mutaciones que resultan en resistencia a estreptomicina ocurren en *rpsL*, siendo la mutación más común K43R. Algunos aislados clínicos muestran bajo nivel de resistencia a estreptomicina y ninguna mutación en *rpsL* o *rrs* se ha encontrado, y en consecuencia se ha teorizado como un mecanismo alternativo de resistencia a estreptomicina (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

1.9 Características de los genes relacionados con la resistencia a antibióticos

1.9.1 *katG*: relacionado con resistencia a INH. Tiene un tamaño de 2222 pb, localizado en el genoma en la siguiente región: 2153889 al 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. Las mutaciones más comunes reportadas en este gen son en los codones 315 (más común), 291, 471 (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

1.9.2 *prom mabA*: conocido también como *fabG1*, relacionado con resistencia a INH. Tiene un tamaño de 743 pb, localizado en el genoma en la siguiente región: 1673440 al 1674183; gen ID: 886551 (NCBI). Es la región promotora del gen *inhA*, el cual codifica la enzima enoil-ACP reductasa involucrada en la síntesis de ácidos micólicos. La mutación más común en *inhA* ocurre en la región promotora (-15C→T) (Bing-Shao y col., 2012).

1.9.3 *rpoB*: relacionado con resistencia a RIF. Tiene un tamaño de 3518 pb, está localizado en la siguiente región del genoma: 759807 al 763325; gen ID: 888164 (NCBI). Codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa. La gran mayoría de las cepas resistentes a RIF, presentan mutaciones agrupadas en la región denominada “rifampicin resistance-determining region” RRDR de 81 pb entre los codones 507–533 (Telenti y col, 1993) donde las tres más comunes mutaciones están localizadas en los codones 516, 526 y 531. Cuando las cepas presentan estas mutaciones, hay un cambio conformacional para esta subunidad β que deriva en una baja afinidad por la RIF (Karakousis, 2009).

1.9.4 *embB*: relacionado con resistencia a EMB. Tiene un tamaño de 3300 pb, se encuentra en la siguiente región del genoma: del 4246514 al 4249810; gen ID: 886126 (NCBI). Codifica para la enzima arabinosil indolacetilinositol transferasa. Mutaciones en este gen provocan una disminución de la afinidad del etambutol por ésta enzima, por lo cual el efecto del medicamento se ve disminuido. Las mutaciones más comunes en este gen se presentan en los codones 306, 378-380, 406 y 497 (Wang y col., 2012).

1.9.5 *rrs*: relacionado con resistencia a SM. Tiene un tamaño de 1537 pb, está localizado en la siguiente región del genoma: 1471846 al 1473382; gen ID: 2700429. Codifica la subunidad 16S del RNA ribosomal (traducción) (NCBI). Mutaciones en este gen producen alteraciones en el sitio de unión de la estreptomicina en el ribosoma (Almeida Da Silva y Palomino, 2011). Las mutaciones más comunes reportadas son en las posiciones: 513 (A→C) y 516 (C→T) (Cuevas-Córdoba y col., 2012).

1.9.6 *rpsL*: relacionado con resistencia a SM. Tiene un tamaño de 374 pb, que se localizan en el genoma: del 781560 al 781934; gen ID: 888259. Codifica la proteína ribosomal 30S (NCBI). Mutaciones en este gen producen alteraciones en el sitio de unión de la estreptomicina en el ribosoma (Almeida Da Silva y Palomino, 2011). Las mutaciones más comunes son en las posiciones: 491, 513, 516 and 905 (Cuevas-Córdoba y col., 2012).

1.9.7 *pncA*: relacionado con resistencia a PZA. Tiene un tamaño de 560 pb, localizadas en la región del genoma siguiente: de 2288681 al 2289241; gen ID: 888260. Codifica para la enzima pirazinamidasas nicotinamidasas *pncA* (NCBI). Las cepas que presentan mutaciones en este gen, alteran la enzima pirazinamidasas, impidiendo la activación del medicamento PZA. Las mutaciones más comunes

reportadas son tanto inserciones: codón 141, codón 375, codón 390 y codón 391; como deleciones: codón 379-408 (30 bases), codón 380-388 (9 bases), codón 440 (1 base) codón 487-496 (10 bases) (Cuevas-Córdoba y col., 2013).

1.10. Características de las mutaciones que confieren resistencia

Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP's (Single nucleotide polymorphisms) son la variación genética más común en el complejo *Micobacterium tuberculosis* (CMTB). Este término se puede intercambiar 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, 2012).

Dependiendo de su posición en el genoma, los SNP's pueden ser codificantes o no-codificantes. Con una densidad codificante (proporción del genoma que participa en transcripción y traducción) del 90-96%, la mayoría de los SNP's en CMTB están en regiones codificantes del genoma. SNP's codificantes pueden dividirse a su vez en sinónimos (sSNP's) y no-sinónimos (nSNP's) dependiendo de si determinan o no un cambio en la secuencia de aminoácidos (Stucki y Gagneux, 2012). Estudios de secuenciación en aislados del complejo de *M. tuberculosis* encontraron consistentemente que dos tercios de los SNP's fueron no sinónimos; y que cerca del 40% de estos SNP's no sinónimos, ocurrieron en posiciones altamente conservadas en otras micobacterias, y que por lo tanto, es muy factible que estén afectando la función del gen (Borrell y Gagneux, 2011).

La secuenciación del genoma de H37Rv, que se publicó en 1982, estableció la primera referencia contra la cual otros genomas pudieran compararse. Los SNP's más caracterizados en CMTB son los que confieren resistencia a medicamentos. Muchas de estas mutaciones han sido identificadas y se encuentran depositadas en bases de datos como la TBdREAMMDM, la Tuberculosis Drug Resistance

Mutation Database y la dbSNP de NCBI, que contiene el mayor número de SNP's reportados para CMTB. Este tipo de información es crucial para el desarrollo de nuevos y más rápidos métodos de diagnóstico para detectar farmacorresistencia. (Stucki y Gagneux, 2012).

Las consecuencias funcionales de estos SNP's, y su potencial para producir cambios fenotípicos entre las cepas, deben ser estudiadas en el futuro (Stucki y Gagneux, 2012). Más allá, la asociación entre las mutaciones y la drogoresistencia debe ser confirmada con técnicas como: generación de mutantes con cambios alélicos, experimentos de selección *in vitro*, mediciones de actividad enzimática, etc. (Köser y col., 2012).

1.11 Frecuencia en distintos países de la presencia de mutaciones relacionadas con la resistencia a antibióticos

Los resultados reportados en diferentes países muestran variaciones en la frecuencia de las mutaciones. A continuación se presentan algunos ejemplos:

- En lo referente a isoniazida: en el gen *katG* codón 315, el 70.1% de las cepas resistentes en Panamá presentaron mutación (Bing-Shao y col., 2012), mientras en EUA se reportó un porcentaje del 60.6% (Pérez-Osorio y col., 2012). En México, en Veracruz el porcentaje fue del 58% (Zenteno-Cuevas y col., 2009), mientras en Sonora el 27.3% de las cepas tienen esta mutación (Bolado-Martínez y col., 2012).
- En lo referente a rifampicina: mutaciones en el gen *rpoB* entre cepas resistentes, en Panamá el 79.1% de ellas las presentan (Bing-Shao y col., 2012); mientras en EUA el porcentaje que se encontró fue del 97.4% (Pérez-Osorio y col., 2012). En México, en Veracruz el 93% de las cepas resistentes las presentaron (Zenteno-Cuevas y col., 2009).

De acuerdo con los datos anteriores, podemos observar que la frecuencia de las mutaciones en los genes de interés, depende de la zona geográfica de la que se aíslan las cepas correspondientes; cabe mencionar también que constantemente

se están reportando mutaciones nuevas en cada estudio publicado, aunque presentan baja frecuencia (Bing-Shao y col, 2012; Zenteno-Cuevas y col., 2009; Bolado-Martínez y col., 2012). Por lo que es importante conocer las mutaciones que presentan dichos genes en cepas de cada región, para poder establecer las más comunes, y poder utilizar estos conocimientos en el diseño de marcadores con aplicación clínica.

1.12 Puntos importantes a considerar

Aunque mutaciones en varios genes están evidentemente relacionadas con la resistencia a medicamentos en *M. tuberculosis*, existen cepas resistentes que no presentan estas mutaciones clásicas. Desde el punto de vista clínico, es probablemente más importante contar con herramientas de diagnóstico que sean de fácil uso, más económicas y que se obtengan resultados más rápido en cuanto a la drogo sensibilidad o resistencia de una cepa.

En la actualidad se encuentra en el mercado el equipo GENE-XPRT MTB/RIF, el cual detecta directamente de la muestra la presencia de *Mycobacterium tuberculosis*, y en base a la amplificación de una región del gen *rpoB*, predice si la cepa es resistente a rifampicina. La metodología de este equipo está descrita en base a estadísticas de otros países. Por lo que el conocer la frecuencia de mutaciones en una región específica, como en nuestro estado, es importantísimo para validar el uso y aplicación real de éste tipo de tecnología.

De acuerdo a la dinámica de transmisión de la TB, y también en vista de la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos anti-TB, es extremadamente importante aumentar los conocimientos de las bases moleculares de la resistencia medicamentos y su complejidad. Es necesario, por ejemplo, clarificar la asociación entre mutaciones específicas y el desarrollo de cepas MDR-TB o la asociación entre la resistencia a medicamentos y su costo biológico. Esto puede permitir mejorar la evaluación de la dinámica de transmisión de las cepas resistentes y predecir más exactamente el escenario futuro de la enfermedad. Más allá de esto, el conocimiento de las bases moleculares de la drogo-resistencia permitirá el desarrollo más racional de nuevos medicamentos; algo que es urgente, cuando

tomamos en cuenta las tasas que se incrementan de MDR y XDR-TB alrededor del mundo. Nuevos medicamentos deben sobrepasar los mecanismos moleculares de resistencia y actuar como drogas disponibles (Almeida Da Silva y Palomino, 2011).

1.13 Antecedentes

En el laboratorio de Genética Molecular Microbiana, se tiene una colección de 74 cepas de micobacterias, recolectadas a partir del año 2009, con datos epidemiológicos de los pacientes, que incluyen: ubicación de la enfermedad, edad, género, comorbilidad y jurisdicción de procedencia. De estos aislados, 32 se han caracterizado a nivel de especie mediante la amplificación de 8 regiones genómicas según el protocolo descrito por Huard y col. (2003). Los resultados son los siguientes en lo referente a las cepas utilizadas en este estudio: 30 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y 3 cepas RD^{RIO}: *Mycobacterium tuberculosis* que portan una deleción desde el gen Rv3346c hasta el gen Rv3355c, genotipo reportado previamente por Lazzarini y col (2007).

Mediante la técnica de espoligotipificación se asignaron las siguientes familias y linajes a cada aislado; la familia LAM con 7 aislados, la T 3, la X con 5, la Haarlem con 1, la S con 2, 2 a la familia Beijing, 1 a la familia EAI1o5, 1 a la familia H1, 1 a la familia EAI3, además 9 aislados presentaron espoligotipos que no se pudieron asignar a un linaje en particular.

A través de MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats) se caracterizaron dichas cepas, los datos obtenidos muestran a los aislados del laboratorio agrupados con las cepas de referencia correspondientes de acuerdo con el linaje al que pertenecen. Esta tipificación se realizó en 27 de las 33 cepas, quedan agrupadas en los siguientes linajes: 22 pertenecen al linaje Euro-Americano, 4 pertenecen al linaje Indo-Oceánico y 1 al linaje del Este-Asia.

2. JUSTIFICACIÓN

La frecuencia de las mutaciones en los genes relacionados con la resistencia a antibióticos depende de la zona geográfica de la que se aíslan las cepas correspondientes, además constantemente se están reportando mutaciones nuevas de baja frecuencia.

Una manera alterna de determinar si una cepa es resistente a determinado antibiótico es mediante la detección de marcadores moleculares de resistencia, la cual debe incluir la caracterización de las mutaciones de las cepas circulantes en cada región, de manera que se elijan las variaciones con mayor prevalencia en cada caso y que por lo tanto tengan un mayor potencial diagnóstico y epidemiológico en regiones específicas y poder utilizar estos conocimientos en el diseño de marcadores con aplicación clínica.

Ya que se cuenta con una colección de cepas aisladas de pacientes con tuberculosis provenientes de Michoacán y que éstas han sido tipificadas genético molecularmente, es necesario conocer los patrones de resistencia a medicamentos que presentan dichas cepas y detectar las mutaciones más comunes que presentan en genes relacionados con la resistencia a antibióticos de primera línea para diseñar marcadores que se puedan utilizar en la región de Michoacán para el diagnóstico.

3. HIPÓTESIS

Las cepas de *M. tuberculosis* obtenidas de casos clínicos del estado de Michoacán, presentan tanto las mutaciones previamente reportadas que confieren resistencia a fármacos de primera línea como nuevas variantes genéticas relacionadas con dicho fenotipo.

4. OBJETIVOS

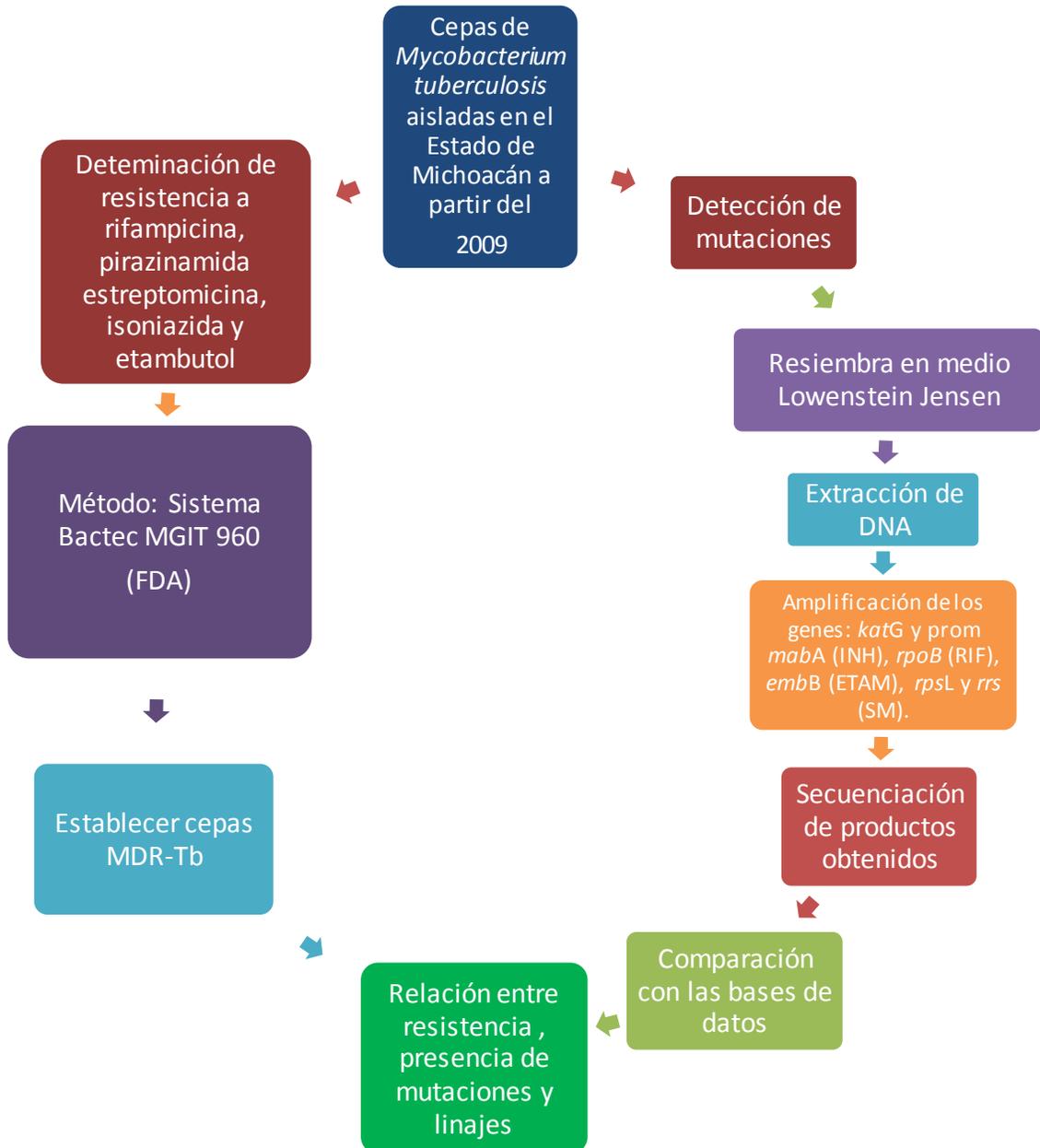
4.1 Objetivo general

Caracterizar las mutaciones presentes en genes relacionados con la resistencia a antibióticos de primera línea en *Mycobacterium tuberculosis* y establecer la posible relación de éstas con el linaje de cepas obtenidas de casos clínicos del estado de Michoacán.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la resistencia a isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* del Estado de Michoacán.
- ✓ Identificar mutaciones en los genes relacionados con la resistencia a isoniazida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida de las cepas de estudio de *M. tuberculosis*.
- ✓ Realizar un análisis comparativo entre las mutaciones encontradas en las cepas de Michoacán y aquellas reportadas en otros estados del país y otras regiones del mundo.

5. ESTRATEGIA



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Para este estudio se incluyeron 33 aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de 29 pacientes con tuberculosis pulmonar y 4 con tuberculosis meníngea; recolectados en el periodo 2009-2011 y donados por:

- El “Hospital General Dr. Miguel Silva” (HGMS)
- La clínica no. 75 y el Hospital General del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Morelia Michoacán
- El Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán (LESP)

Como cepa de referencia se utilizó *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 medicamentos de la primera línea (Palomino y col, 2007).

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 micobacteras, 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 600µl de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM pH8, SDS 10 %, NaCl 5M, EDTA 0.5 M). Se inactivaron a 80°C por 60 min. Se agregaron 600µl 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 600µl 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 600µl 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 30µl de agua desionizada estéril. A continuación se realizó el tratamiento con RNAsa adicionando 3 µl de enzima Pure Link RNAsa A de Invitrogen e incubando a 37°C por 30 min. Posteriormente la muestra se centrifugó por 10 min a 9.3 g, y 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*, *embB*, *rpsL*, *prom mabA*, *rpoB*, *pncA* y *rrs*, 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 5' → 3'	TEMPERATURA ALINEAMIENTO	TAMANO PRODUCTO (pb)
<i>katG</i> ***	MTB 38 F	GCATGGCCATGAAACGACGTC	68°C	765
	MTB 38 R	CGTTGACCTCCCACCCGACTT		
<i>embB</i> ***	MTB 37 F	CGCACCTTCAACCTGACCGACGC	70°C	743
	MTB 37 R	TCGGTATACCAACGCTGGCTC		
<i>rpsL</i> *	PR 11	CCAAACCATCCAGCAGCTGGT	68°C	572
	PR 12	GTCGAGAGCCCGCTTGAGGG		
<i>prom</i>	inhA P-15	CACCCCGACAACTATCG	56°C	270
<i>mabA</i> **	inhA PF ₂	GCGCGGTCAAGTTCCACA		
<i>rpoB</i> *	PR 1	CCGCGATCAAGGAGTTCTTC	68°C	315
	PR 2	ACACGATCTCGTCGCTAACCC		
<i>pncA</i> *	PR 9	GGCGTCA TGGACCCATATC	60°C	670
	PR 10	CAACAGTTCA TCCCGGTTCC		
<i>rrs</i> *	PR 13	AAACCTCTTTCAACCATCGAC	60°C	552
	PR 30	CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTG		

* (Sekiguchi J. y col., 2007), ** (Bing-Shao C. y col., 2012), *** (oligos diseñados).

Las reacciones de 30 µl contenían solución reguladora 20 mM, MgCl₂ 1.5 mM, dnTP's 2 mM, 10 µM de cada iniciador, 60 ng de ADN y 1U de Taq DNA polimerasa recombinante de Invitrogen.

Para realizar las amplificaciones se utilizaron dos termocicladores: el GeneAmp® PCR System 2700 de Applied Biosystems y el Corbett Research Palm Cyclor, el primero para realizar las amplificaciones y el segundo para estandarizar las temperaturas de las mismas. 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 (Tabla 1) 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 utilizando electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, usando el 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 fragmentos de los 7 genes de interés, para las 33 cepas, se compararon en la página de NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el programa BLAST; con esto se verificó que las amplificaciones realmente pertenecieran a los genes analizados.

La búsqueda de SNP's se realizó mediante un alineamiento múltiple en el programa ClustalX 2.0 de las secuencias obtenidas para cada gen de las 33 cepas y de la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (obtenidas de la página GenBank, número de acceso NC_000962).

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.

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*.

7. RESULTADOS

7.1 Amplificaciones por PCR

La calidad del ADN extraído de las diferentes cepas fue de alto peso molecular, según se observó mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 1)

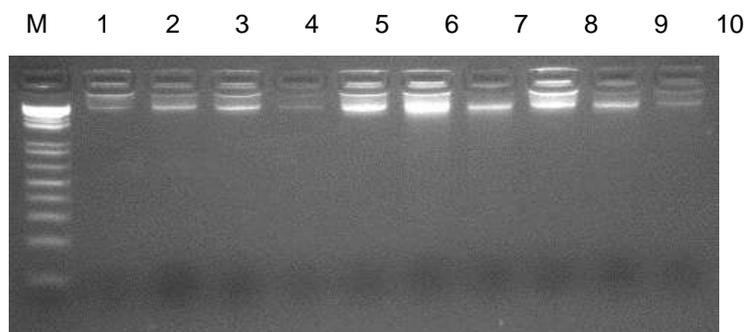


Figura 1. ADN de las cepas de estudio. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra algunos ejemplos de la calidad y cantidad del ADN obtenido de las cepas de *M. tuberculosis* estudiadas. Carriles: M, 1 Kb Plus DNA ladder; 1 al 10, ADN de diferentes cepas de la colección.

Se utilizó el ADN de la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para estandarizar las condiciones de amplificación de cada uno de los genes en estudio y se obtuvieron los productos de PCR esperados (Fig. 2): para el gen *rpoB* de 315 pb (Carril 1), para el gen *katG* de 2223 pb (carril 2), para *mabA* de 1362 pb (carril 3), para el gen *embB* de 2748 pb (carril 4), para el gen *pncA* de 670 pb (carril 5), para el gen *rpsL* 572 pb (carril 6) y para el gen *rrs* de 1329 pb (carril 7).

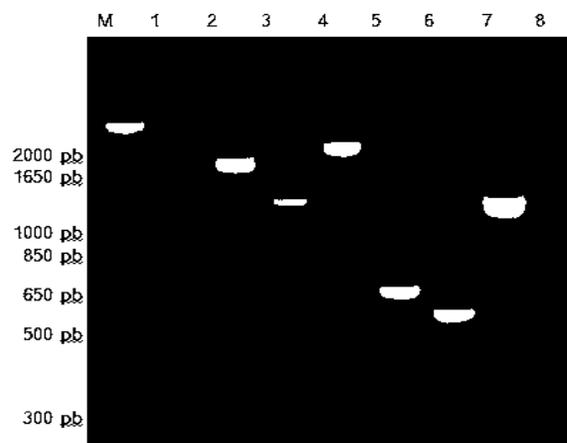


Figura 2. Amplificación de los siete genes de interés con el ADN de la cepa de referencia. Gel de agarosa al 2% que muestra. Carriles: M: marcador de 1 Kb Plus de Invitrogen, 1: *rpoB* 315

pb, 2: *katG* 2223 pb, 3: prom *mabA* 1362 pb, 4: *embB* 2748 pb, 5: *pncA* 670 pb, 6: *rpsL* 572 pb, 7: *rrs* 1329 pb, 8: control negativo.

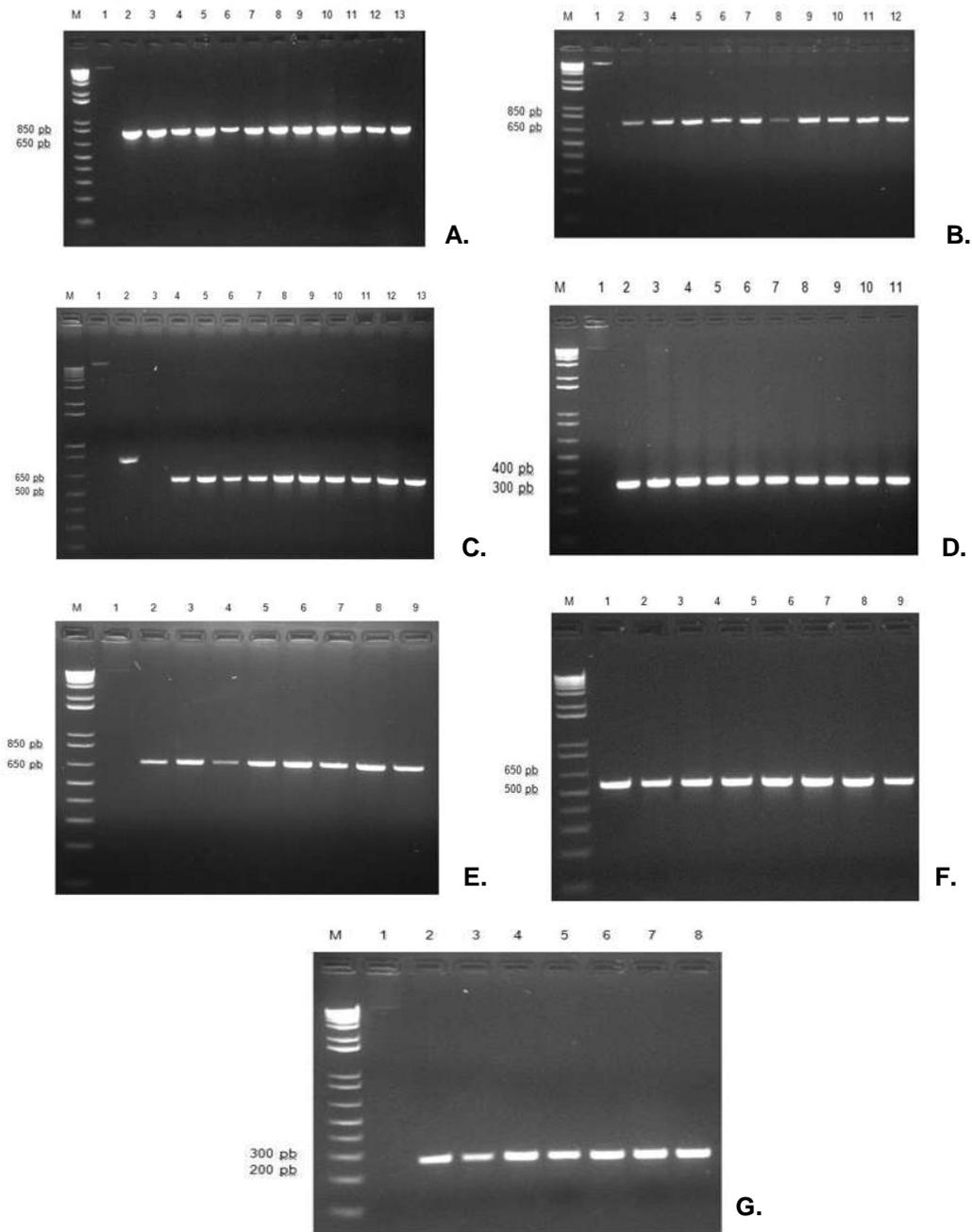


Figura 3. Amplificación de los genes de interés con el ADN de las cepas de estudio. Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio que muestran los productos de amplificación de los genes: A) *katG*; B) *embB*; C) *rpsL*; D) *rpoB*; E) *pncA*; F) *rrs*; G) *mabA*. Carriles: M: marcador de 1 Kb Plus DNA ladder de Invitrogen; 1: ADN del fago λ ; 2 al 13: amplicones obtenido con el ADN de las cepas de estudio.

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación para los genes de interés, se procedió a amplificar las diferentes regiones en las cepas de estudio.

Para todas las cepas se obtuvo el tamaño de amplicón esperado para cada uno de los genes: gen *katG* de 765 pb; *embB* de 743 pb; *rpsL* de 572 pb; *rpoB* de 315 pb; el gen *pncA* de 670 pb; el gen *rrs* de 1329 pb y para el prom *mabA* de 1362 pb (Fig. 3).

Cuando se tuvieron los 7 productos de PCR de las 33 cepas, se enviaron a secuenciar a la empresa Elim Biopharm. Como resultado se obtuvieron electroferogramas de muy buena calidad, con picos bien definidos y sin ambigüedades (Fig. 4), lo que permitió tener secuencias adecuadas para proceder a hacer los alineamientos.



Figura 4. Electroferogramas. Ejemplos de los electroferogramas obtenidos en la secuenciación de A) gen *katG* cepa 001; B) gen *embB* cepa 040; C) gen *rpsL* cepa 011.

7.2 Detección de SNP's

Con las secuencias obtenidas se realizó un BLASTn en la página del NCBI y comprobamos que cada una de estas secuencias correspondía al fragmento del gen de interés. Posteriormente se hicieron los alineamientos múltiples utilizando el programa ClustalX 2.0 lo que permitió visualizar claramente si había algún cambio en cualquiera de las bases de las secuencias (Fig. 5); como por ejemplo, en el alineamiento del gen *rpoB*, podemos observar que cinco de las secuencias presentaron en la base 1349 un cambio de una timina (T) por una citosina (C).

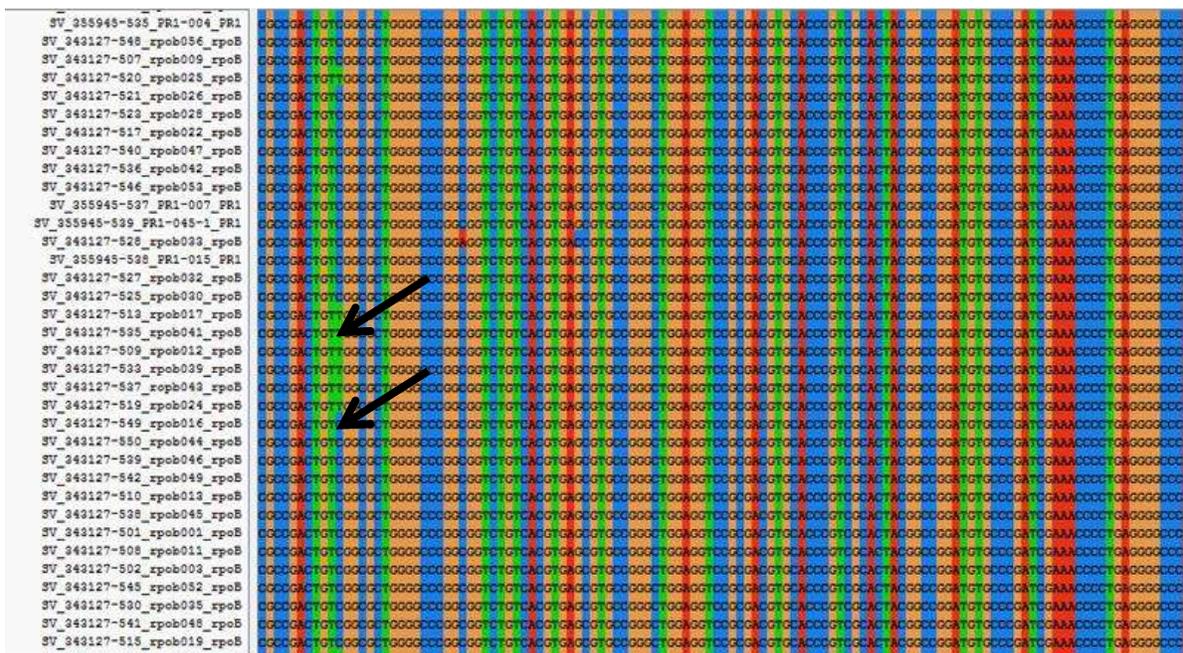


Figura 5. Alineamiento de las secuencias en el programa ClustalX2.0. Se alinearon las 33 secuencias que corresponden a cada una de las cepas, y la secuencia de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv para el gen *rpoB*. Las flechas señalan la mutación puntual (cambio de T por C) que presentan 5 de las cepas.

Se analizaron los alineamientos de las 33 secuencias para cada uno de los 7 genes. Los SNP's encontrados están enlistados en la Tabla 2.

Tabla 2. Mutaciones encontradas en las cepas de estudio.

CEPA	<i>katG</i> (INH)	<i>rpoB</i> (RF)	<i>embB</i> (EMB)	<i>pncA</i> (PZA)	<i>rrs</i> (SM)	<i>mabA</i> (INH)	<i>rpsL</i> (SM)
001							
003							
004	*				*		
007		*					
008							
011							
012	*	*					
013		*					
014							
015	*		*				
016	*	*					
017	*	*		*			**
018	*						*
019							
022							
023							
024	*	*					*
025		*		*			
026							
027	*		*				
028							*
029							
030							
031							
032							
039		*					
040		*		**			
042							
045	*						
046							
047							
049	*						
051			*				
%	30.3	27.2	9	9	3	0	12.1

* Presencia de una mutación en el gen respectivo, ** presencia de dos mutaciones.
% Porcentaje de mutaciones por gen dentro de la colección de cepas

Los genes que presentaron mayor porcentaje de mutaciones dentro de la colección de cepas, son el gen *katG*, con un 30.3% (10 cepas) y el gen *rpoB* con 27.2% (9 cepas); mientras que el gen que codifica para el promotor *mabA* no

presentó ninguna mutación. El 54.5% (18) de las cepas presentan al menos una mutación en cualquiera de los genes analizados; y el 45.5% (15) de las cepas no presentaron ninguna mutación. Una de las cepas, la 017 fue la que presentó más mutaciones: 5 en cuatro genes diferentes. Las cepas 024 y 039 presentaron 3 mutaciones en tres genes diferentes. La cepa 040 presentó también tres mutaciones pero en dos genes diferentes.

Los cambios en los nucleótidos o SNP's encontrados, se analizaron en el programa Blastx de la página del NCBI para comprobar si se trataban de cambios "sinónimos" o "no sinónimos". Los resultados se enumeran a continuación.

7.2.1 Mutaciones en el gen *katG*

De las 10 mutaciones que presentaron las cepas en el gen *katG*, 8 fueron no sinónimas y 2 sinónimas. La mutación Ser315Thr, reportada en la literatura como la más común, se presentó en 3 de las 10 cepas; al igual que la mutación Arg463Leu, que es reportada en otros países como menos común.

Tabla 3. Polimorfismos encontrados en el gen *katG*

GEN	No. CEPA	POLIMORFISMO	NUCLEÓTIDO	CODÓN	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	SINÓNIMO (S) o NO SINÓNIMO (NS)
<i>katG</i>	004	G --- T	1388	463	Arg463Leu	N S
	012	A --- G	1238	413	Tyr413Cis	N S
	015	G --- A	1516	506	Glu506Lys	N S
	016	G --- C	944	315	Ser315Thr	N S
	017	G --- C	944	315	Ser315Thr	N S
	018	G --- T	1388	463	Arg463Leu	N S
	024	G --- C	944	315	Ser315Thr	N S
	027	G --- T	1388	463	Arg463Leu	N S
	045	C --- G	1233	411	Ala411Ala	S
	049	C --- G	1233	411	Ala411Ala	S

7.2.2 Mutaciones en el gen *embB*

Las mutaciones que se presentaron en 3 de las cepas, fueron diferentes y “no sinónimas” (Tabla 4).

Tabla 4. Polimorfismos detectados en el gen *embB*

GEN	No. CEPA	POLIMORFISMO	NUCLEÓTIDO	CODON	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	SINÓNIMO (S) o NO SINÓNIMO (NS)
<i>embB</i>	015	T --- C	1106	369	Val369Ala	N S
	027	A --- C	1133	378	Glu378Ala	N S
	051	C --- G	1370	457	Ala457Gly	N S

7.2.3 Mutaciones en el gen *rpoB*

La mutación más común Ser531Leu se presentó en 6 de las 9 cepas. Las otras tres mutaciones son todas diferentes: Ser600Thr, Leu571Leu y Hys526Asp. Solo una de las nueve mutaciones (Leu571Leu) que se encontraron es “sinónima” (Tabla 5).

Tabla 5. Polimorfismos encontrados en el gen *rpoB*

GEN	No. CEPA	POLIMORFISMO	NUCLEÓTIDO	CODON	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	SINÓNIMO (S) o NO SINÓNIMO (NS)
<i>rpoB</i>	007	G --- C	1802	600	Ser600Thr	N S
	012	C --- T	1595	531	Ser531Leu	N S
	013	T --- A	1713	571	Leu571Leu	S
	016	C --- A	1579	526	Hys526Asp	N S
	017	C --- T	1595	531	Ser531Leu	N S
	024	C --- T	1595	531	Ser531Leu	N S
	025	C --- T	1595	531	Ser531Leu	N S
	039	C --- G	1595	531	Ser531Leu	N S
	040	C --- G	1595	531	Ser531Leu	N S

7.2.4 Mutaciones en el gen *rpsL*

Las 4 mutaciones que observamos son diferentes; 3 son “no sinónimas” y una es “sinónima” (Tabla 6).

Tabla 6. Polimorfismos genes *rpsL*, *pncA*, *rrs*, *mabA*

GEN	No. CEPA	POLIMORFISMO	NUCLEÓTIDO	CODÓN	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	SINÓNIMO (S) Ó NO SINÓNIMO (NS)
<i>rpsL</i>	017	T --- G	69	23	Ala23Ala	S
	018	G --- C	88	29	Gln29Hys	N S
	024	A --- G	128	43	Lys43Arg	N S
	028	G --- A	151	50	Arg50Gln	N S
<i>pncA</i>	017	T --- C	225	75	Gly75Gly	S
	025	A --- C	529	177	Thr177Pro	N S
	040	C --- A	535	178	Ala178Pro	S
	040	C --- G	536	179	Ser179Pro	S
<i>rrs</i>	004	A --- G	786	–	–	–
<i>mabA</i>	–	–	–	–	–	–

7.2.5 Mutaciones en el gen *pncA*

Se encontraron cuatro mutaciones: una “sinónima” y tres “no sinónimas” (Tabla 6).

La cepa 040 presentó dos mutaciones diferentes en este gen.

7.2.6 Mutaciones en el gen *rrs*

Se encontró un solo SNP en la cepa 004 (Tabla 6).

7.2.7 Mutaciones en el Promotor *mabA*

Ninguna de las cepas presentó mutaciones en esta región (Tabla 6).

7.3 Antibiogramas

Los resultados de los antibiogramas realizados con cada una de las cepas de estudio (Tabla 7), nos indican que tres cepas (016, 028, 039) son resistentes a un medicamento.

Tabla 7. Antibiogramas de las cepas de estudio

CEPA	SM	INH	RIF	EMB	PZA
001	S	S	S	S	S
003	S	S	S	S	S
004	S	S	S	S	S
007	S	S	S	S	S
008	S	S	S	S	S
011	S	S	S	S	S
012	S	R	R	S	R
013	S	S	S	S	S
014	S	S	S	S	S
015	S	S	S	S	S
016	S	R	S	S	S
017	S	R	R	S	R
018	R	S	S	R	S
019	S	S	S	S	S
022	S	S	S	S	S
023	S	S	S	S	S
024	R	R	R	R	R
025	S	R	R	S	R
026	S	S	S	S	R
027	S	S	S	S	S
028	S	S	R	S	S
029	S	S	S	S	S
030	S	S	S	S	S
031	S	S	S	S	S
032	S	S	S	S	S
039	S	S	R	S	S
040	S	R	R	R	R
042	S	S	S	S	S
045	S	S	S	S	S
046	S	S	S	S	S
047	S	S	S	S	S
049	S	S	S	S	S
051	S	S	S	S	S

SM= estreptomina, INH= isoniazida, RIF= rifampicina, EMB= etambutol, PZA= pirazinamida, S= sensible, R= resistente.

La cepa 018 presentó resistencia a dos medicamentos. Tres cepas (012, 017, 025) fueron resistentes a tres medicamentos. La cepa 040 fue resistente a cuatro de los

cinco medicamentos analizados. La cepa 024 fue resistente a los cinco medicamentos. Además, 24 de las 33 cepas (72.7%) fueron sensibles a todos los medicamentos. Cinco cepas resultaron con multidrogo resistencia MDR-Tb (resistentes a isoniazida y rifampicina) (WHO, 2010).

De las 33 cepas, 2 cepas (6.8%) fueron resistentes a estreptomicina, 6 (18.1%) fueron resistentes a isoniazida, 7 (21.2%) fueron resistentes a rifampicina, 3 (9%) fueron resistentes a etambutol y 6 (18.1%) fueron resistentes a pirazinamida. Estos datos los observamos en la figura 5, donde están representados los porcentajes de las cepas que fueron tanto sensibles como resistentes a los medicamentos de la primera línea.

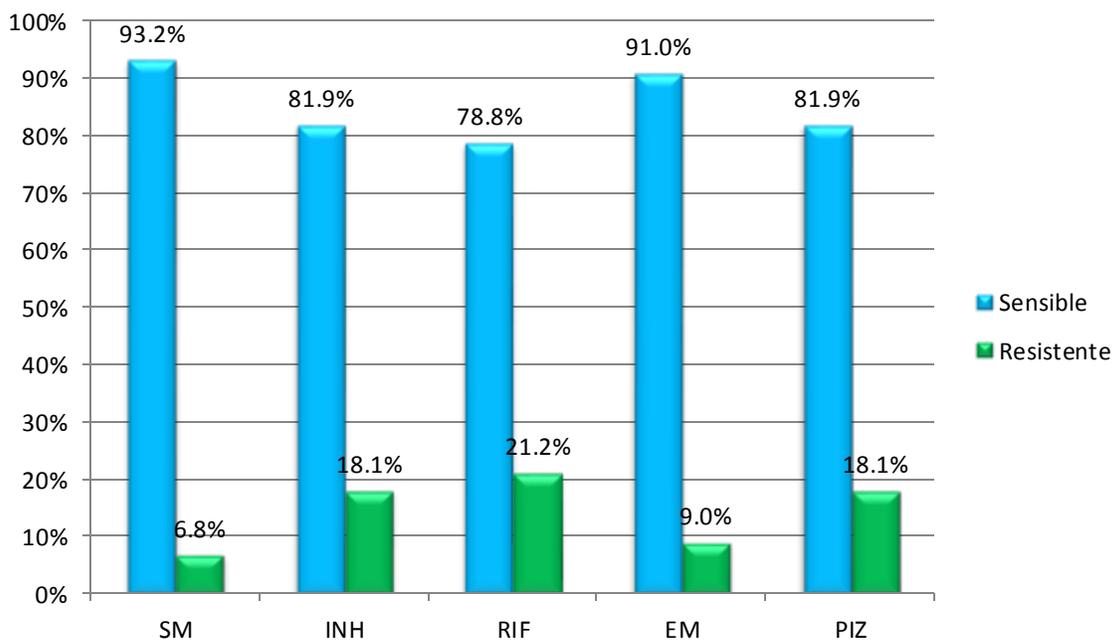


Figura 6. Resistencia a medicamentos. Porcentaje de cepas resistentes y sensibles a los cinco medicamentos de la primera línea. SM= estreptomicina, INH= isoniazida, RIF= rifampicina, EMB= etambutol, PZA= pirazinamida.

En los resultados de los antibiogramas de las cuatro cepas provenientes de tuberculosis meníngea incluídas en el presente estudio, 3 (003, 004 y 049), resultaron sensibles a los cinco medicamentos de la primera línea (tabla 8). Solamente la cepa 026 presentó resistencia a pirazinamida, aunque no tiene ninguna mutación en el gen *pncA*.

Tabla 8. Sensibilidad a antibióticos en las cepas meníngeas

CEPA	SM	INH	RIF	EMB	PZA
003	S	S	S	S	S
004	S	S	S	S	S
026	S	S	S	S	R
049	S	S	S	S	S

7.4 Relación entre resistencia y familia

Al analizar los datos de resistencia y correspondencia con familias, se observan cosas interesantes (Tabla 9). La cepa 024, resistente a todos los medicamentos de la primera línea, es de la familia T2. La cepa 040, resistente a INH, RIF, EMB y PZA, pertenece a la familia S, pero tenemos las cepas 047 y 049 que son sensibles. Las cepas 012, la 017 y la 025, a pesar de tener el mismo patrón de resistencia (resistente a INH, RIF y PZA), pertenecen a familias diferentes: PTE, T1 y LAM9, respectivamente. Al analizar las cepas MDR-Tb también se observa que todas pertenecen a familias diferentes (Tabla 10).

Al tratar de relacionar los patrones de resistencia con la familia a la que pertenecen las cepas ya tipificadas, no se encontró ninguna tendencia o característica en común.

En lo referente a los linajes, 81.4% (22/27) de las cepas tipificadas pertenecen al linaje Euro-Americano. De estas, 14 son sensibles y 8 presentan alguna resistencia, pero sin que sean patrones uniformes. De las tres cepas pertenecientes al linaje Indo-Oceánico, dos (027 y 032) son sensibles a los cinco medicamentos de la primera línea, y la otra (026) presenta resistencia a PZA. Tampoco se encuentra ninguna relación entre este linaje y resistencias en particular.

En el presente trabajo, las cepas 004 y la 046 de la familia Beijing, son sensibles a los cinco medicamentos de la primera línea (Tabla 9). Cabe mencionar que la frecuencia de esta familia en América Latina, es muy baja, lo que coincide con la frecuencia de 6.2% (2/32 cepas) encontrada en este trabajo.

Tabla 9. Relación entre patrones de resistencia, Linaje y Familia.

CEPA	SM	INH	RIF	EMB	PZA	LINAJE	FAMILIA
001	S	S	S	S	S	Eur-Am	X1
003	S	S	S	S	S	Eur-Am	T1
004	S	S	S	S	S	East-Asian (B)	Beijing
007	S	S	S	S	S	Eur-Am	LAM9
008	S	S	S	S	S	Eur-Am	LAM1
011	S	S	S	S	S	Eur-Am	NR
012	S	R	R	S	R	--	--
013	S	S	S	S	S	Eur-Am	X3
014	S	S	S	S	S	Eur-Am	X3
015	S	S	S	S	S	Eur-Am	NR
016	S	R	S	S	S	Eur-Am	NR
017	S	R	R	S	R	Eur-Am	T1
018	R	S	S	R	S	Eur-Am	NR
019	S	S	S	S	S	Eur-Am	H1
022	S	S	S	S	S	Eur-Am	X1
023	S	S	S	S	S	Eur-Am	LAM6
024	R	R	R	R	R	Eur-Am	T2
025	S	R	R	S	R	Eur-Am	LAM9
026	S	S	S	S	R	Indo-Ocean	EAI5
027	S	S	S	S	S	Indo-Ocean	EAI3
028	S	S	R	S	S	Eur-Am	NR
029	S	S	S	S	S	Eur-Am	LAM9
030	S	S	S	S	S	Eur-Am	NR
031	S	S	S	S	S	Eur-Am	LAM1
032	S	S	S	S	S	Indo-Ocean	NR
039	S	S	R	S	S	Eur-Am	NR
040	S	R	R	R	R	--	S
042	S	S	S	S	S	Eur-Am	X2
045	S	S	S	S	S	Indo-Ocean	NR
046	S	S	S	S	S	--	Beijing
047	S	S	S	S	S		LAM
049	S	S	S	S	S	--	S
051	S	S	S	S	S	--	Harlem

Todas las cepas MDR-Tb aquí estudiadas pertenecen a familias diferentes, por lo que no se puede establecer ninguna relación entre familia y resistencia (Tabla 10).

Tabla 10. Cepas MDR-Tb y familia a la que pertenecen.

CEPA	SM	INH	RIF	EMB	PZA	FAMILIA
012	S	R	R	S	R	--
017	S	R	R	S	R	T1
024	R	R	R	R	R	T2
025	S	R	R	S	R	LAM9
040	S	R	R	R	R	S

7.5 Relacion entre resistencia a antibióticos y presencia de mutaciones

La relación entre la resistencia a los medicamentos de la primera línea y la presencia de mutaciones específicas (Tabla 11), se detalla a continuación.

7.5.1 Isoniazida

Entre las cepas resistentes a isoniazida se encontraron dos mutaciones en el gen *katG*: la Ser315Thr, con una frecuencia del 50% (3 de las 6 cepas resistentes la presentaron); y la mutación Tyr413Cis, que no estaba reportada previamente, con una frecuencia del 16.6% (1 de las 6 cepas resistentes la presentó)(Tabla 11). La otra región genética relacionada con resistencia a este medicamento es el promotor *mabA*, en la cual ninguna las cepas aquí analizadas presentó mutaciones. Así, el 66.6% de las cepas (4 de 6) resistentes a isoniazida presentaron alguna mutación en el gen *katG*.

7.5.2 Rifampicina

El mayor número de cepas resistentes (7 cepas) a los medicamentos evaluados en este estudio fueron resistentes a rifampicina. El 85.7% de las cepas resistentes (6 de 7) presentaron la mutación más común reportada en la literatura: Ser531Leu en el gen *rpoB* (Tabla 11). La cepa resistente 028 no presentó mutación en éste gen, por lo que la resistencia en este caso esta relacionada con otro mecanismo no evaluado en el presente trabajo.

7.5.3 Etambutol

El 9% de las cepas (3 de 33), fueron resistentes etambutol, aun cuando no presentaron mutaciones en el gen *embB* asociadas a dicha resistencia (Tabla 11).

7.5.4 Pirazinamida

El 18.1% de las cepas (6 de 33 cepas) presentaron resistencia a pirazinamida. Solo el 33.3% (2) de ellas presentaron mutaciones en alguna región del gen *pncA*, comúnmente asociado a la resistencia a dicha droga. Así, la cepa 025 presentó la mutación Thr177Pro (no reportada), mientras que la cepa 040 presentó dos mutaciones diferentes, Ala178Pro y Ser179Pro, ambas no reportadas (Tabla 11). El 72.7% (4) de las cepas encontradas como resistentes en este trabajo no presentaron mutaciones en este gen.

7.5.5 Estreptomicina

La estreptomicina fue el medicamento al cual se presentó menor resistencia, con solo el 6.8% (2), de las cepas analizadas. Ambas cepas, la 018 y la 024, presentaron mutaciones en el gen *rpsL*: Gln29Hys (no reportada) y Lys43Arg (reportada) respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Relación resistencia y presencia de mutaciones

MEDICAMENTO	CEPA	GEN	MUTACIÓN	REPORTADA/ NO REPORTADA
ISONIAZIDA	012	<i>katG</i>	Tyr413Cis	NO Reportada
		<i>mabA</i>	-	-
	016	<i>katG</i>	Ser315Thr	Reportada
		<i>mabA</i>	-	-
	017	<i>katG</i>	Ser315Thr	Reportada
		<i>mabA</i>	-	-
	024	<i>katG</i>	Ser315Thr	Reportada
		<i>mabA</i>	-	-
	025	<i>katG</i>	-	-
		<i>mabA</i>	-	-
040	<i>katG</i>	-	-	
	<i>mabA</i>	-	-	
RIFAMPICINA	012	<i>rpoB</i>	Ser531Leu	Reportada
	017		Ser531Leu	Reportada
	024		Ser531Leu	Reportada
	025		Ser531Leu	Reportada
	028		-	-
	039		Ser531Leu	Reportada
	040		Ser531Leu	Reportada
ETAMBUTOL	018	<i>embB</i>	-	-
	024		-	-
	040		-	-
PIRAZINAMIDA	012	<i>pncA</i>	-	-
	017		-	-
	024		-	-
	025		Thr177Pro	NO Reportada
	026		-	-
	040		Ala178Pro	NO Reportada
	040		Ser179Pro	NO Reportada
ESTREPTOMICINA	018	<i>rpsL</i>	Gln29Hys	NO Reportada
		<i>rrs</i>	-	-
	024	<i>rpsL</i>	Lys43Arg	Reportada
		<i>rrs</i>	-	-

7.6 Frecuencias de aparición de mutaciones

Al comparar el porcentaje de las cepas resistentes con la presencia de mutaciones asociadas obtenido en el presente trabajo con los porcentajes reportados en otros estados del país y en otros países del mundo (Tabla 12), podemos observar varios

datos. En el caso de los genes *katG* (66%), *rpoB* (85%) y *rpsL* (33%), los porcentajes obtenidos son semejantes a los reportados tanto en otros estados del país como en otros países del mundo.

Tabla 12 . Comparación de porcentajes obtenidos con otros reportados.

GEN ANALIZADO	% ENCONTRADO EN ESTE ESTUDIO	% EN OTROS ESTADOS	% EN OTROS PAISES
<i>katG</i>	66 (4/6)	81 (26/34) Veracruz (Cuevas-Córdoba y col. 2013)	88 (23/26) Chile (Araya y col. 2011)
		81 (30/37) Monterrey (Ramaswamy y col. 2004)	
		27 (3/12) Sonora (Bolado-Martínez y col. 2012)	73 (32/44) Camerún (Mouafo y col. 2014)
		83 (10/12) Tamaulipas (Bocanegra-García y col. 2014)	53 (42/78) Argentina (Imperiale y col. 2013)
<i>mabA</i>	0 (0/6)	—	20 (20/103) China (Wang y col. 2013)
<i>embB</i>	0 (0/3)	66 (12/18) Monterrey (Ramaswamy y col. 2004)	50 (1/2) Camerún (Mouafo y col. 2014)
<i>rpoB</i>	85 (6/7)	81 (30/37) Monterrey (Ramaswamy y col. 2004)	88 (22/25) Chile (Araya y col. 2011)
		50 (4/8) Sonora (Bolado-Martínez y col. 2012)	100 (7/7) Camerún (Mouafo y col. 2014)
		42 (3/7) Tamaulipas (Bocanegra-García y col. 2014)	78 (10/13) Argentina (Imperiale y col. 2013)
<i>pncA</i>	33 (2/6)	—	62 (15/24) Brasil (Bhaju y col. 2013)
<i>rpsL</i>	33 (2/2)	19 (18/91) (Cuevas-Córdoba y col. 2012)	50 (16/32) Polonia (Jagielsky y col, 2014)
			25 (7/27) Camerún (Mouafo y col. 2014)
<i>rrs</i>	0 (0/2)	28 (26/91) (Cuevas-Córdoba y col. 2012)	25 (8/32) Polonia (Jagielsky y col, 2014)

8. DISCUSIÓN

A nivel global, la tuberculosis permanece como la principal causante de muertes entre las enfermedades infecciosas prevenibles y curables; y las perspectivas de control de la tuberculosis se enfrentan al reto de la emergencia de cepas drogo-resistentes, especialmente multi-drogoresistentes (MDR) y extensivamente drogo-resistentes (XDR). Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la resistencia a diferentes antibióticos de primera línea y los posibles determinantes genéticos asociados a dicha resistencia en cepas de *M. tuberculosis* obtenidas de casos clínicos del estado de Michoacán. También se analizó la posible relación entre las mutaciones asociadas a la resistencia a fármacos y el linaje de las cepas estudiadas.

En cuanto a la resistencia a isoniazida, el 66.6% de las cepas (4 de 6) resistentes a isoniazida presentaron alguna mutación en el gen *katG*. No se excluye la posibilidad de que el resto de las cepas (2 de 6) resistentes presenten alguna mutación en otra región del gen *katG*, ya que en el presente trabajo únicamente se obtuvo la secuencia parcial del gen, comprendiendo la región donde de acuerdo a la literatura se encuentran las mutaciones más comunes (Sekiguchi J y col., 2007). Es importante hacer notar que si se utilizara solamente a la mutación Ser315Tyr en el gen *katG* como criterio para definir la resistencia o sensibilidad a isoniazida de una cepa, esto excluiría al 50% de las cepas que en los ensayos de sensibilidad fueron resistentes. Esto sugiere que aunque la presencia de dicha mutación en las cepas circulantes en el estado de Michoacán, es importante, y posiblemente la de mayor incidencia, no es determinante como posible marcador de resistencia a isoniazida.

Dos cepas resistentes a isoniazida (025, 040) no presentaron mutaciones en la región secuenciada del gen *katG*, por lo que es posible que dichas cepas presenten mutaciones en otra región del mismo gen, o de otros genes no evaluados en el presente trabajo. Así, se ha observado que una sobreexpresión

del gen *aphC*, el cual codifica para la enzima alquil hidroperóxido reductasa, puede ser un factor que produzca resistencia a isoniazida en cepas de *M. tuberculosis* (Kelley y col., 1997).

Dentro de las cepas sensibles a isoniazida, se encontraron 3 (004, 018, 027) que presentan la mutación Arg463Leu, reportada en las bases de datos. Esta condición, presencia de mutación-cepa sensible, ya ha sido estudiada y se ha demostrado que esta mutación en especial, tiene poco efecto en la actividad enzimática, por lo que la activación de la isoniazida no está comprometida, resultando en cepas sensibles (Kelley y col., 1997).

El mayor número de cepas resistentes (7 cepas) a los medicamentos evaluados en este estudio fueron resistentes a rifampicina. El 85.7% de las cepas resistentes (6 de 7) presentaron la mutación más común reportada en la literatura: Ser531Leu en el gen *rpoB* (tabla 11). La cepa resistente 028 no presentó mutación en este gen, por lo que la resistencia en este caso está relacionada con otro mecanismo no evaluado en el presente trabajo. Por lo anterior es posible considerar que la presencia de la mutación Ser 531Leu del gen *rpoB*, puede ser un buen indicador de la resistencia a rifampicina en cepas del estado de Michoacán. Como se mencionó con anterioridad, el equipo Gene-Xpert MTB/RIF detecta mutaciones en la región RRDR del gen *rpoB*, incluyendo la mutación Ser531Leu. Con base en los resultados obtenidos, este puede considerarse como una buena herramienta para la detección de cepas resistentes a rifampicina.

El 9% de las cepas (3 de 33), fueron resistentes etambutol, aun cuando no presentaron mutaciones en el gen *embB* asociadas a dicha resistencia (tabla 11). Una posible explicación de la falta de relación entre las alteraciones en el gen *embB* y la resistencia al etambutol en las cepas analizadas en este trabajo, puede estar relacionada con un efecto acumulativo de múltiples mutaciones en el desarrollo de dicha resistencia (Bakula y col., 2013). En este sentido es necesario realizar estudios adicionales en las que se involucre la secuenciación de todo el

genoma para identificar genes que no han sido reconocidos todavía y que estén involucrados en resistencia a EMB (Safi y col., 2010).

Las tres cepas resistentes a este medicamento encontradas en este estudio presentan además resistencia a otros antibióticos. Así, la cepa 018 es resistente también a estreptomycin, y las cepas 024 y 040, son cepas MDR-Tb, es decir resistentes a isoniazida y rifampicina. Telenti y colaboradores (1997) ya habían observado este fenómeno en el que la mayoría de las cepas resistentes a etambutol, presentaban al menos resistencia a otro medicamento. Estudios posteriores demostraron que mutaciones en *embB* pueden proveer a *M. tuberculosis* de una ventaja que la hace propensa a desarrollar resistencia a INH o RIF y a disminuir su sensibilidad a los efectos de antibióticos combinados (Safi y col., 2008).

De manera interesante, en el desarrollo del presente trabajo se encontraron cepas con diferentes mutaciones en el gen *embB*. La cepa 015 presentó la mutación Val369Ala, reportada en las bases de datos; la cepa 027 con la mutación Glu378Ala, también reportada en las bases de datos y la cepa 051 con la mutación Ala457Gly, que no estaba reportada previamente. La presencia de diversidad e mutaciones en el gen *embB* ya se ha reportado previamente en otros países. Por ejemplo, en China, Shi y colaboradores (2007) encontraron que el 56% (24/43) de cepas sensibles a etambutol presentaban distintas mutaciones en el gen *embB*. Esto se atribuye a que estas mutaciones por sí solas no son suficientes para generar resistencia a EMB, a menos que vayan acompañadas de alteraciones en otros genes, ya que la adquisición de resistencia a este medicamento es un proceso de múltiples pasos (Bakula y col., 2013).

Con respecto a la resistencia a pirazinamida, en este trabajo se encontraron cepas hay reportes de que el 70% de los aislados fenotípicamente resistentes a PZA no presentan mutaciones en el análisis genotípico del gen *pncA* (Therese y col., 2002). Se sugiere la presencia de algún mecanismo alternativo de resistencia a PZA relacionado con alguna bomba de eflujo que este provocando la resistencia en estas cepas (Therese y col., 2002). También se ha propuesto la presencia de

mutaciones en algún otro gen que puedan afectar la expresión del gen *pncA* (Cheng y col., 2000). Por último, ninguna de las cepas sensibles a pirazinamida presentó mutaciones en el gen *pncA*.

Ninguna de las cepas presentó mutaciones en el gen *rrs*, el otro gen relacionado con resistencia a estreptomicina. Ese dato concuerda con lo reportado en la literatura, donde se menciona que es muy raro encontrar cepas que presenten mutaciones en ambos genes (*rrs* y *rpsL*); esto puede sugerir que las mutaciones en uno de estos genes, pueden mitigar la necesidad de modificar el otro gen (Jagielski y col., 2014).

Con respecto a las cepas meníngeas que se analizaron, observamos que la 024 (Tabla 8) es resistente a PZA, sin presentar mutación en el gen *pncA*. Como se mencionó con anterioridad, se sugiere la presencia de algún mecanismo alternativo de resistencia a PZA relacionado con alguna bomba de eflujo (Therese y col., 2002), o presencia de mutaciones en algún otro gen que puedan afectar la expresión del gen *pncA* (Cheng y col., 2000).

La resistencia a PZA en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* causantes de tuberculosis meníngea, no es rara. Therese y colaboradores (2002), incluyeron en su estudio 6 cepas meníngeas, de las cuales 3 presentaron resistencia a PZA.

La ausencia de resistencia en las cepas meníngeas aquí analizadas podría explicarse debido a la hipótesis sugerida de que la resistencia a medicamentos implica un costo. Esto es, un determinante de droga resistencia provee una ventaja en presencia del medicamento, pero, en ausencia del mismo, este determinante está asociado a una carga en el metabolismo. Experimentalmente se ha demostrado que se pueden producir mutaciones compensatorias que contrarrestan la carga física asociada a un determinante de resistencia primaria. Se ha sugerido que estas mutaciones compensatorias ayudan a mantener la propagación de la resistencia, incluso en ausencia de antibióticos (Böttger y col., 2007). En estas cepas meníngeas, se puede observar como poco a poco se van estabilizando las mutaciones que confieren resistencia, mutaciones compensatorias y factores de patogenicidad, en *Mycobacterium tuberculosis*.

Las cepas meníngeas aquí analizadas poseen distintos fondos genéticos, una es de la familia T1, otra de la familia Beijing, otra pertenece a la familia EAI5 y la última es de la familia S (tabla 8). Lo anterior sugiere que los factores de patogenicidad que pueden estar compartiendo estas cepas, no están relacionadas con ninguna familia en particular. No obstante, el número de cepas meníngeas aquí analizadas fue reducido, por lo que sería necesario ampliar el análisis de este tipo de cepas para establecer posibles relaciones entre cepas de tuberculosis meníngea y determinantes genéticos que influyan en patogenicidad.

En el caso del promotor *mabA* y de los genes *embB* y *rrs*, la correspondencia entre resistencia al medicamento y presencia de mutaciones encontrada en este trabajo fue del 0%, mientras que en otras regiones se han reportado porcentajes de frecuencias del 20 al 50%. Esto puede deberse a que la cantidad de cepas resistentes aquí reportadas es baja (6, 3, 2), por lo que sería conveniente ampliar la cantidad cepas resistentes analizadas. En el caso del gen *pncA*, se encontró un 33% de frecuencia de mutaciones en cepas resistentes, mientras que en el estudio realizado en México, DF., la frecuencia fue mucho más elevada: 80%.

El hecho de que no se encontrara relación entre resistencia y familias o linajes, coincide con lo reportado en la literatura. No se ha encontrado asociación significativa entre resistencia a medicamentos y familias o linajes de *M. tuberculosis* en estudios realizados en diversas partes del mundo (Lukoye y col., 2014). La única relación significativa que se ha observado, es que en países como India, Rusia y Estonia, un alto porcentaje de cepas MDR-Tb pertenecen al linaje Beijing (Bocanegra-García y col., 2014). Ford y colaboradores (2014) concluyeron que cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes al linaje Este de Asia (incluyendo la familia Beijing) adquieren droga resistencia *in vitro* más rápidamente que cepas pertenecientes al linaje Euro-Americano. Ellos atribuyen esto a que el contexto genético de una cepa determinada de *M. tuberculosis* puede afectar la gama de mutaciones observadas que confieren tasas de resistencia a medicamentos. Con esto, demostraron que, efectivamente, la familia Beijing es la única que se ha

podido relacionar con tendencia a presentar este tipo de mutaciones que confieren resistencia (Ford y col., 2014).

En el presente trabajo, las cepas 004 y la 046 de la familia Beijing, son sensibles a los cinco medicamentos de la primera línea (tabla 9). Cabe mencionar que la frecuencia de esta familia en América Latina, es muy baja, lo que coincide con la frecuencia de 6.2% (2/32 cepas) encontrada en este trabajo.

Todas las cepas MDR-Tb aquí estudiadas pertenecen a familias diferentes, por lo que no se puede establecer ninguna relación entre familia y resistencia (tabla 10).

En Tamaulipas, Bocanegra-García y colaboradores (2014) hicieron la tipificación y búsqueda de resistencia en 72 cepas de *M. tuberculosis* circulantes en ese estado. Ellos encontraron espoligotipos (n= 4) que no estaban reportados con anterioridad, al igual que nuestro grupo de trabajo (n=9). En Tamaulipas el porcentaje de cepas Beijing es de 5.5%, mientras que en Michoacán es de 6.2%. Además, en el estudio de Tamaulipas se describieron 3 cepas MDR-Tb que pertenecían a las familias 34, LAM9 y T1, mientras que en las cepas de Michoacán aquí analizadas, se encontró que en aquellas MDR-Tb una pertenecía a la familia LAMP9 (025) y otra a la T1 (017), entre otras. Esto puede ser por que las familias LAM y T, son las reportadas más frecuentemente en Latinoamérica (Bocanegra-García y col., 2014).

Por último, las cepas Beijing (5) y Harlem (12) del estudio de Tamaulipas fueron sensibles a los medicamentos de primera línea, lo que coincide con los resultados aquí presentados en los que las dos cepas Beijing (004 y 046) y la única Harlem (051), también mostraron sensibilidad a los medicamentos de primer línea.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

- I. El 30.3% de las cepas analizadas (10/33) presentaron resistencia al menos a uno de los medicamentos de la primera línea (INH, RIF, EMB, PZA, SM).
- II. El 15.1% de las cepas (5/33) fueron MDR-Tb.
- III. Se encontró una cepa (024) que presentó resistencia a los cinco medicamentos de la primera línea.
- IV. El mayor porcentaje de resistencia fue a la rifampicina (21.2%) y el menor fue a la estreptomina (6.8%).
- V. El gen que presentó el mayor número de mutaciones tanto en cepas sensibles como resistentes, fue el *katG* con 30.3%.
- VI. El gen que presentó mayor número de mutaciones en cepas resistentes fue el gen *rpoB*, siendo la mutación más frecuente la Ser531Leu, mutación reportada previamente, que se presentó en 6 de 7 cepas resistentes. Esta mutación se encuentra en la región RRDR, región que utiliza el equipo GENE-XPERT MTB/RIF para detectar resistencia a RIF. Se puede concluir que el uso de este equipo sí tiene aplicación de acuerdo a las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que están circulando en el estado de Michoacán.
- VII. Se encontraron 5 mutaciones no reportadas previamente, en los genes: *katG* (Tyr413Cis), *pncA* (Thr177Pro, Ala178Pro, Ser179Pro) y *rpsL* (Gln29Hys).
- VIII. En el promotor *mabA* no se encontró mutación en ninguna de las 33 cepas.
- IX. El linaje predominante es el Euro-Americano (22/27), y la familia con mayor número de cepas fue la LAM (7/32). En 9 de las cepas analizadas se encontró un espoligotipo no reportado previamente. No se observó ninguna relación entre el fenotipo y genotipo de resistencia y las familias o linajes de las cepas. Con este estudio se aportan los primeros datos sobre los patrones de sensibilidad y la presencia de mutaciones que confieren resistencia en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en el estado de Michoacán. Sin embargo, es necesario aumentar la cantidad de cepas analizadas, con el fin de captar poder ampliar el conocimiento sobre las mutaciones que están presentes asociadas a resistencia.

10. CONCLUSIÓN

La hipótesis planteada se acepta: “Las cepas de *M. tuberculosis* obtenidas de casos clínicos del estado de Michoacán presentan tanto las mutaciones previamente reportadas que confieren resistencia a fármacos de primera línea como nuevas variantes genéticas relacionadas con dicho fenotipo”.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Almeida Da Silva P and Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. J. Antimicrob. Chemother (Brazil). 2011; doi: 10.1093/jac/dkr173. Disponible: <http://jac.oxfordjournals.org/content/early/2011/05/09/jac.dkr173.full.pdf+html>
- 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=S0034-98872011000400008&lng=es.
- Bakula Z, Napiórkowska A, Bielecki J, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z and Jagielski T. Mutations in the embB Gene and Their Association with Ethambutol Resistance in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates from Poland. Biomed Res Int. 2013; 2013: 167954. Doi: 10.1155/2013/167954. PMID: PMC3874334
- Bing-Shao C, Lanzas F, Rifat D, Herrera A, Kim EY, Sailer C, Torres-Chavolla E, Narayanaswamy P, Einarsson V, Bravo J, Pascale J.M, Loerger TR, Sacchettini JC, and Karakousis PC. Use of Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) to Detect Multidrug-Resistant Tuberculosis in Panama. Public Library of Science PLoS One. 2012; 7(7): e40456. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3391257/>
- Bhujju S, Fonseca L de S, Marsico AG, de Oliveira Vieira GB, Sobral LF, Stehr M and Singh M Saad MH. *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Rio de Janeiro reveal unusually low correlation between pyrazinamide resistance and mutations in the *pncA* gene. Infect Genet Evol. 2013 Oct; 19:1-6. doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.008.
- 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.

- Bolado-Martinez E, Pérez-Mendoza A, Alegría-Morquechol FM, Candia-Plata MC, Aguayo-Verdugo MR y Álvarez-Hernández G. Mutaciones asociadas con resistencia a rifampicina o isoniazida en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de Sonora, México. *Salud pública Méx*. 2012; vol.54, n. 2, 167-170. Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342012000200013
- 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/>
- Böttger EC and Springer B. Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. *Eur J Pediatr*. 2008; 167:141–148. Doi: 10.1007/s00431-007-0606-9.
- CENAVE: Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Fuente: Plataforma Única de Información/SUIVE./ Secretaría de Salud. Actualizada: 15 julio 2010; disponible:
<http://cenave.gob.mx/tuberculosis/>
- Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L and Zhang Y. *pncA* Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(3): 528–532.
- 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>
- Cuevas-Córdoba B, Xochihua-González SO, Cuellar A, Fuentes-Domínguez J and Zenteno-Cuevas R. Characterization of *pncA* gene mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Mexico. Infect Genet Evol. 2013; 19: 330-4. Doi: 10.1016/j.meegid.2012.12.013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23321280>
 - De Rossi E, Aínsa J and Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. FEMS Microbiology Reviews. 2006; volume 30, Issue 1, 36–52. Doi: 10.1111/j.1574-6976.2005.00002.x Disponible: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2005.00002.x/full>.
 - Feuerriegel S, Oberhauser B, George AG, Dafaie F, Richter E, Rüscher S, and Niemann S. Sequence analysis for detection of first-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from a high-incidence setting. BMC Microbiol. 2012; 12: 90. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3404943/>
 - Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, Johnston JC, Gardy J, Lipsitch M and Fortune SM. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug resistant tuberculosis. Nat Genet. 2013; 45(7): 784–790. Published online Jun 9, 2013. Doi: 10.1038/ng.2656. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3777616/>
 - Guillén-Nepita A, Vázquez-Garcidueñas M and Vázquez-Marrufo G. *Mycobacterium tuberculosis*: Evolutionary and epidemiological insights as revealed by molecular genetic analysis. En: Bacterial Populations: Basic and Applied Aspects of Their Structure and Evolution, 2010: 79-95 ISBN: 978-81-7895-486-8 Editor: Anibal Lodeiro. p. 79-95.

- Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D and Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. J Clin Microbiol. 2003; 41(4):1637-1650. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682155>
- Imperiale BR, Zumárraga MJ, Di Giulio AB, Cataldi AA and Morcillo NS. Molecular and phenotypic characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to anti-tuberculosis drugs. Int J Tuberc Lung Dis. 2013; 17(8):1088-93. doi: 10.5588/ijtld.12.0949.
- 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. PMID: PMC4061058
- Kai Johnsson K, Froland WA and Schultz PG. Overexpression, Purification, and Characterization of the Catalase-peroxidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biol Chem. 1997; 272, 2834-2840. Doi: 10.1074/jbc.272.5.2834
- Karakousis PC and Mayers D. Mechanisms of Action and Resistance of Antimycobacterial Agents. Antimicrobial Drug Resistance. New York: Human Press. 2009; p. 271–291. Disponible: http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-59745-180-2_24
- Kelley CI, Rouse DA and Morris SI. Analysis of *ahpC* Gene Mutations in Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. American Society for Microbiology. 1997; p. 2057–2058 Vol. 41, No. 9.
- Köser CU, Feuerriegel S, Summers DK, Archer JA and Niemann S. Importance of the genetic diversity within the *Mycobacterium tuberculosis* complex for the development of novel antibiotics and diagnostic tests of drug resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(12):6080-7. doi: 10.1128/AAC.01641-12.

- Lazzarini LC, Huard RC, Boechat NL, Gomes HM, Oelemann MC, Kurepina N, Shashkina E, Mello F, Gibson AL, Virginio MJ, Marsico AG, Butler WR, Kreiswirth BN, Suffys PN, Silva JR and Ho JL. Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol. 2007; 45(12):3891-3902. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168543/>
- Lemus-Molina D, Montoro-Cardoso E y Palomino JC. Métodos rápidos para la detección de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*: Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud. Cuba, 2007. Instituto de medicina tropical “Pedro Kouri”. Departamento de Bacteriología-Micología. Laboratorio Nacional de Referencia e Investigaciones en tuberculosis y micobacterias. Disponible: http://tesis.repo.sld.cu/15/1/dihadenys_lemus.pdf
- Lukoye D, Katabazi FA, Musisi K, Kateete DP, Asiimwe BB, Okee M, Joloba ML and Cobelens FG. The T2 *Mycobacterium tuberculosis* Genotype, Predominant in Kampala, Uganda, Shows Negative Correlation with Antituberculosis Drug Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(7):3853-3859.
- Mouafo-Tekwu E, Kamgue-Sidze L, Assam-Assam JP, Tedom JC, Tchatchouang S, Guiewi-Makafe G, Tchokote-Wetewale AL, Kuaban C, Eyangoh S, Ntoumi F, Penlap Beng VN and Frank M. Sequence analysis for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from the Central Region of Cameroon. BMC Microbiol. 2014; 14: 113. Doi: 10.1186/1471-2180-14-113. PMCID: PMC4017682.
- NCBI: National Center for Biotechnology. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- NCCLS NCfCLS. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia*, and other aerobic actinomycetes; tentative standard – second edition. NCCLS document M24-T2. 2000. Disponible: <http://cid.oxfordjournals.org/content/31/5/1209.full>

- Nhu NT, Lan NT, Phuong NT, Chau Nv, Farrar J and Caws M. Association of streptomycin resistance mutations with level of drug resistance and *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. Int J Tuberc Lung Dis. 2012; 16(4):527-31. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22640514#>
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud. Disponible: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/006ssa23.html>
- Palomino JC, Leao SC and Ritacco V. Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care. First Edit. Bourcillier Kamps.com; 2007. p 97-646. Disponible en: www.TuberculosisTextbook.com
- Pere Coll. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Formación Médica Continuada. Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. España. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21(6):299-308 299.
- Pérez-Osorio A, Boyle D, Ingham Z, Ostash A, Gautom R, Colombel C, Houzen Y, and Leadera B. Rapid Identification of Mycobacteria and Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Use of a Single Multiplex PCR and DNA Sequencing. J Clin Microbiol. 2012; 50(2): 326–336. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3264146/>
- Ramaswamy SV, Dou SJ, Rendon A, Yang Z, Cave MD and Graviss EA. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Monterrey, Mexico. Source: J Med Microbiol. 2004; 53(Pt 2):107-113. Houston Tuberculosis Initiative, Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA.
- Raviglione M and O'Brien R. Enfermedades por Mycobacterias. En Harrison Principios de Medicina Interna, McGraw-Hill, México 2008, 17ª. Ed. pp 1012-1019.
- Safi H, Sayers B, Hazbón MH and Alland D. Transfer of embB Codon 306 Mutations into Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Strains Alters

- Susceptibility to Ethambutol, Isoniazid, and Rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(6): 2027–2034. PMID: PMC2415778
- Safi H, Fleischmann RD, Peterson SN, Jones MB, Jarrahi B and Alland D. Allelic Exchange and Mutant Selection Demonstrate that Common Clinical *embCAB* Gene Mutations Only Modestly Increase Resistance to Ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1): 103–108. Doi: 10.1128/AAC.01288-09. PMID: PMC2798522.
 - Sambrook J and Russell David. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2001. 3 ed. Vol.II, Chap. 8, protocol 1.
 - Sandgren A, Michael Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM and Murray MB. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database Published: February 10, 2009. Doi: 10.1371/journal.pmed.1000002
 - 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. Detection of Multidrug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2007; 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. Lack of Correlation between *embB* Mutation and Ethambutol MIC in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(12): 4515–4517. Doi: 10.1128/AAC.00416-07. PMID: PMC2167975
 - Smith T, Wolff K and Nguyen L. Molecular Biology of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis and its Interaction with the Host Organism Current Topics in Microbiology and Immunology Volume 374*, 2013, pp 53-80.
 - Spies F, Ribeiro A, Ramos D, Ribeiro M, Martin A, Palomino JC, Rossetti M, da Silva P, and Zaha A. Streptomycin Resistance and Lineage-Specific Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis gidB* Gene. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(7): 2625–2630. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147840/>

- Stucki D and Gagneux S. Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. Tuberculosis Volume 93, Issue 1 , Pages 30-39, January 2013 Disponible: [http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792\(12\)00202-8/fulltext](http://www.tuberculosisjournal.com/article/S1472-9792(12)00202-8/fulltext)
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K and Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993; 341 (8846):647-50. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8095569>
- Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musser JM and Jacobs WR. The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. Nat Med. 1997; 3 (5):567-70. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142129>
- Therese KL, Gayathri R, Balasubramanian S, Natrajan S and Madhavan HN. Phenotypic and genotypic characteristics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pediatric population of Chennai, India. Indian J Med Microbiol. 2012; 30:411-7.
- Van-Soolingen D, Qian L, Haas P, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P and Embden J. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. J Clin Microb. 1995; p. 3234–3238 Vol. 33, No. 12. 0095-1137/95/\$04.0010
- Velayati A, Farnia P and Masjedi M. The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). Int J Clin Exp Med. 2013; 6(4): 307–309. PMID: PMC3631557. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/?term=PMC3631557>.
- Wang F, Hu SY, Gui J, Cui YY, Liu XL and Li QG. A rapid screening program on the resistance to streptomycin and ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by PCR melting curve analysis. 2012; 33(5):525-8. PMID: PMC22883184. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22883184>.
- Wong P, Puray M, Gonzales A and Sevilla CR. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú. Rev Perú Epidemiol. 2011; 15 (1) [11 pp.]

- WHO: 2011 Global Report on Surveillance and Response. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). Disponible: http://www.who.int/tb/publications/mdr_surveillance/en/
- WHO: Global Tuberculosis Control 2010. Disponible: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2010/en/
- WHO: Global Tuberculosis Control 2011. Disponible: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html
- WHO: Global Tuberculosis Control 2012. Disponible: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
- Zenteno-Cuevas R, Zenteno JC, Cuellar A, Cuevas B, Sampieri CL, Riviera JE and Parissi A. Mutations in *rpoB* and *katG* genes in *Mycobacterium* isolates from the Southeast of Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]. 2009, vol.104, n.3, pp. 468-472. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19547874>