

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

LA NUEVA TUBERCULOSIS

TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA:
LUIS ANGEL MALDONADO MANJARREZ



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

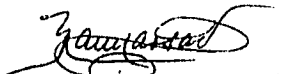
PRESIDENTE	PROF. ELDA PENICHE QUINTANA
VOCAL	PROF. MARÍA ELSA ESCUDERO GARCÍA
SECRETARIO	PROF. RAÚL GARZA VELASCO
1er. SUPLENTE	PROF. ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ
2o. SUPLENTE	PROF. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Y

DIVERSAS BIBLIOTECAS DE INVESTIGACIÓN


ASESOR: RAÚL GARZA VELASCO


SUSTENTANTE: LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

Dedicatorias:

Al Dr. Luis Ángel Maldonado Graniel, mi padre e investigador.

A mi madre, Dolores que en el nombre lleva la fama. Gracias por el apoyo y la confianza depositada.

A mi hermana, María Dolores por los inolvidables momentos juntos (se incluyen peleas).

A mis abuelos, Mama Carmen y Pacho uno de cada lado dicen más que toda la familia.

A Erika, por todas esas cosas que nos permiten continuar así. Paciencia, comprensión, ayuda, innumerables... (y la lista sigue creciendo).

A mi asesor, Raúl Garza Velasco, el profesor, el bacteriólogo, el amigo; ante todo por siempre dejarme la puerta abierta.

A toda la familia, por su espera, fe y constante interés. Hay una dedicatoria "especial" para aquellos que han podido dejar a un lado el rango familiar.

Al pasado, Ale (donde quiera que estés) gracias por los recuerdos. He preferido no romper aquellas promesas inconclusas.

Agradecimientos especiales:

Al Dr. Gabriel Siade Barquet, no sólo por “soportar” a la familia por tanto tiempo.

A mis profesores de la Facultad de Química, U.N.A.M.; en especial a la profesora Elda Peniche por permitirme asomar la nariz y navegar por el camino de la bacteriología.

Ante la posibilidad de olvidar a alguno(s) de todos los compañeros (existen también aquellos que se “convierten” en amigos) de este (y anteriores) pequeño(s) ciclo(s) prefiero dejar el sitio abierto y decirles que ocupan un lugar muy especial. Cada quien sabe si le aplica o si se busca en otra tesis.

Pero sobre todo, a todos aquellos investigadores que hicieron posible la realización de este trabajo.

" Infectious disease is one of the few genuine adventures left in the world. The dragons are all dead and the lance grows rusty in the chimney corner... About the only sporting proposition that remains unimpaired by the relentless domestication of a once free-living human species is the war against those ferocious little fellow creatures, which lurk in the dark corners, and stalk us in the bodies of rats, mice, and all kinds of domestic animals; which fly and crawl with the insects, and waylay us in our food and drink and even in our love."

Hans Zinsser, 1935

Creo que lo anterior citado perdería gran parte de su sentido si se traduce al castellano. He preferido dejarlo tal y como lo leyerá desde la primera vez...

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	
1. Principales especies	4
2. Composición química	5
3. Características microscópicas	6
4. Propiedades culturales	7
5. Pruebas bioquímicas	12
II. IMPORTANCIA CLÍNICA DE <i>M. tuberculosis</i>	
1. La primoinfección por bacterias de la TB y el origen de la enfermedad	23
2. Otros aspectos asociados a la TB	25
3. Epidemiología	33
III. LA NUEVA TB Y LA PROBLEMÁTICA DE LA MULTIRRESISTENCIA	
A LAS DROGAS ANTITUBERCULOSAS	
1. La "nueva tuberculosis"	36
2. Aspectos genéticos y resistencia en MNT y <i>M. tuberculosis</i>	40
3. Resistencia a isoniacida (INH)	44
4. Resistencia a rifampicina (RIF)	58
5. Resistencia a estreptomicina (Sm)	65
6. Resistencia a etambutol (EMB)	76
7. Resistencia a pirazinamida (PZA)	79
IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	
1. Muestras a analizar	82
2. Procesamiento de las muestras de expectoración: descontaminación, fluidificación y concentración	82
3. Baciloscopia	83
4. Aislamiento e identificación del agente causal	84
5. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	85
V. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LAS DROGAS ANTITUBERCULOSAS	
1. Aspectos generales	92
2. Método radiométrico	93
3. Método de las proporciones por elución en disco	95
CONCLUSIONES	98
BIBLIOGRAFÍA	100

INTRODUCCIÓN

Por definición, la tuberculosis (TB) es el padecimiento ocasionado por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye a las especies *M. tuberculosis* (también conocida como bacilo de Koch), *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. Sin embargo, es conveniente mencionar que otras especies del género *Mycobacterium*, conocidas comúnmente como "micobacterias no tuberculosas" (MNT) o *Mycobacterium other than tuberculosis* (MOTT), ocasionan numerosos cuadros patológicos que resultan clínicamente (con signos y síntomas) indiferenciables de la TB.

La TB se considera un padecimiento grave, cuyo tratamiento es prolongado y genera serias reacciones secundarias a los individuos, independientemente de que puede ser inefectivo, debido a que cada vez un mayor número de cepas micobacterianas manifiestan resistencia hacia las drogas antituberculosas clásicas; por esta razón, los esquemas terapéuticos deben establecerse con base en pruebas de susceptibilidad,

las cuales tradicionalmente requieren de siete a ocho semanas (tomando en cuenta el previo aislamiento del agente causal).

El presente trabajo describe algunos de los principales aspectos de la enfermedad y las características que han sustentado el término “nueva tuberculosis” (que refleja la alarma que el padecimiento ha generado en E.U.A.), así como los fundamentos y las técnicas relacionados en el diagnóstico de la TB y en las pruebas de susceptibilidad a las que se someten las cepas que afectan al paciente.

OBJETIVOS

- Describir los principales aspectos relacionados con la patología y con el diagnóstico de laboratorio de la “nueva tuberculosis”.
- Señalar los factores que han determinado el surgimiento de la “nueva tuberculosis”.
- Describir las bases moleculares de multirresistencia a los agentes antituberculosos de primera línea en *M. tuberculosis*.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO *Mycobacterium*

I. Principales especies

El género *Mycobacterium* se encuentra ubicado dentro del orden *Actinomycetales* (por tratarse de actinomicetos), precisamente en la familia *Mycobacteriaceae*; sus especies principales son: *M. tuberculosis* (el bacilo de Koch), causante de la tuberculosis (TB); *M. bovis*, productora de TB en bovinos y humanos (en estos últimos, por ingestión de leche proveniente de animales enfermos), *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare* y *M. fortuitum*, principales representantes de un grupo conocido como micobacterias no tuberculosas (MNT), atípicas o MOTT (*Mycobacterium other than tuberculosis*), cuyas integrantes provocan al humano una afección respiratoria indistinguible clínicamente de la TB pulmonar (a la cual la mayoría de los autores no acepta denominarla TB); *M. leprae* (el bacilo de

Hansen), que ocasiona la lepra (LA); y *M. smegmatis*, integrante regular de la flora habitual del tracto genital inferior en la mujer (63,69,76,92).

2. Composición química

Haciendo una específica referencia a su peso seco, se puede afirmar que aproximadamente el 40 % del bacilo y el 60 % de su pared celular se encuentran conformados por lípidos diversos, entre los que destacan los siguientes: las ceras "D" (ésteres provenientes de la previa reacción entre ácidos grasos y alcoholes), glucolípidos (denominados también micósidos), triglicéridos, sulfolípidos y lipoproteínas (69,92,93).

Evidentemente, dicha composición química tan peculiar determina que las micobacterias muestren algunas diferencias notables, en relación a la mayoría de las bacterias: son muy resistentes a la desecación, desarrollan muy lentamente, son altamente hidrofóbicas, resisten el poder bactericida o bacteriostático de álcalis, ácidos y oxidantes diluidos, no se tiñen fácilmente mediante tinciones simples, resisten la decoloración con alcohol ácido (97

partes de etanol al 96 % + 3 de HCl) y los medios adecuados para su crecimiento suelen contener ingredientes poco usuales (63,93).

3. Características microscópicas

El género *Mycobacterium* está integrado por bacterias pleomórficas (curvas y/o rectas), clasificadas como bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR); miden 0.2 a 0.8 μ de ancho por 2 a 7 de largo, no presentan una agrupación característica y son inmóviles, no capsuladas y no esporuladas (63,69).

Cabe mencionar que algunos pocos autores afirman que estos microorganismos son Gram positivos, porque en ocasiones llegan a tomar el cristal violeta y no se decoloran con alcohol acetona. Sin embargo, dicho planteamiento resulta incuestionablemente erróneo, porque: a) los tiempos que emplean para la acción del colorante de Gram fluctúan alrededor de 24 h (haciendo caso omiso de que la técnica correspondiente establece 1 minuto); y b) la particular composición de la pared celular micobacteriana

difiere notablemente de la correspondiente a los microorganismos Gram positivos (63).

4. Propiedades culturales

4.1. Medios de cultivo

Los medios más adecuados para obtener el desarrollo de las micobacterias son los siguientes: Lowenstein Jensen (que contiene verde de malaquita y cuya presentación es en "pico de flauta"), el ATS (American Toraxie Society), el Petragnani, el Petroff, el Cohen Middlebrook 7H10 y el 7H11; cabe señalar que los dos últimos se emplean en placa, para realizar pruebas de sensibilidad a los diversos fármacos antituberculosos (63,69).

Los componentes más frecuentes en dichos medios son: huevo completo coagulado o yema coagulada, glicerol, ácidos grasos (destacando el oleico), albúmina, hidrolizados de caseína, harina de papa, leche, etc (63,69).

Cuando los medios antes mencionados contienen algún colorante se consideran ligeramente selectivos; no obstante, si se desea incrementar su selectividad, se les pueden adicionar algunas combinaciones de los siguientes agentes inhibitorios, a los cuales *Mycobacterium* es resistente: penicilina, polimixina, lincomicina y ácido nalidixico (los cuales son antibacterianos), e inclusive, cicloheximida o anfotericina (antifúngicos) (63).

4.2. Condiciones de incubación

Dado que las micobacterias son aerobias estrictas y que durante su crecimiento deben sintetizar grandes cantidades de lípidos, su incubación adecuada incluye la necesidad de proporcionarles ambientes húmedos con 5 a 10 % de CO₂. Asimismo, su temperatura óptima es de 35°C y el tiempo que requieren para desarrollar varía entre los quince y veinticinco días (63,69).

4.3. Características macroscópicas

En general, se acepta que las colonias micobacterianas son grandes, de 2 a 5 mm de diámetro, de color amarillo claro mate, con bordes irregulares y aspecto granular. Sin embargo, es conveniente tomar en cuenta dos excepciones muy importantes: (63,69,93)

- *Mycobacterium leprae* no desarrolla *in vitro* y, de hecho, sólo se le ha logrado cultivar en el armadillo y en el cojinete plantar del ratón.
- Muchas de las cepas clasificadas como MNT o MOTT manifiestan una coloración diferente, relacionada precisamente con lo descrito en el inciso siguiente (“d”).

4.4. Clasificación de Runyon

Este autor diseñó un método sencillo para subdividir a las MNT, micobacterias atípicas o MOTT, mismo que se basa en la capacidad de

algunas de ellas para sintetizar un pigmento no hidrosoluble, de color amarillo-anaranjado brillante (que en algunas cepas alcanza tonos francamente rojos), dependiendo de si se incuban en presencia o ausencia de luz (63,69,76).

Los 4 grupos de Runyon son los siguientes:

GRUPO I: FOTOCROMÓGENOS. A este grupo pertenecen las MNT cuyas colonias manifiestan el pigmento mencionado, cuando se les ha incubado en presencia de luz. Su principal especie es *M. kansasii*, cuya frecuencia en la enfermedad suele igualar o superar a la de *M. tuberculosis* en algunas zonas geográficas.

GRUPO II: ESCOTOCROMÓGENOS. Se encuentra integrado por las micobacterias que producen dicho pigmento, tanto en presencia como en ausencia de luz. Su especie más relevante es *M. scrofulaceum*.

GRUPO III: NO FOTOCROMÓGENOS o NO CROMÓGENOS. Incluye a las MNT que no sintetizan el pigmento en cuestión bajo ninguna circunstancia. Su especie más interesante es *M. intracellulare*.

GRUPO IV: DE CRECIMIENTO RÁPIDO. Agrupa a las micobacterias cuyas colonias aparecen dentro de los siete primeros días de incubación. Su representante de mayor relevancia en salud pública es *M. fortuitum*.

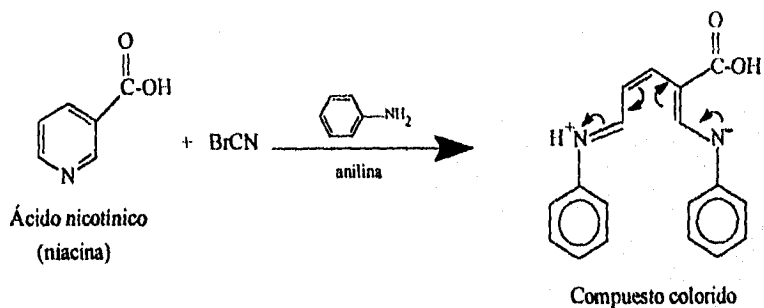
Cabe precisar que la incubación en condiciones de oscuridad se logra envolviendo el tubo de Lowenstein Jensen con papel aluminio. En este sentido, se acostumbra sembrar al microorganismo (o a la muestra que lo contiene) en dos tubos, uno de los cuales se cubre con el tipo de papel antes indicado.

5. Pruebas bioquímicas

5.1. Acumulación de niacina

La niacina es un producto del metabolismo de todo el género *Mycobacterium*; sin embargo, algunas especies (entre ellas *M. tuberculosis* y algunas cepas de *M. bovis*) carecen de la enzima responsable de degradar este compuesto hasta el complejo ribonucleótido-niacina, por lo que lo acumulan en el medio de cultivo como un compuesto soluble en agua (63).

De acuerdo con el procedimiento descrito por Runyon, el ácido nicotínico reacciona con bromuro de cianógeno, en presencia de una amina primaria, formando un compuesto de color amarillo (63,69).



A partir de un cultivo sólido de *Mycobacterium*, se agrega un volumen de agua que cubra la superficie del medio, preferentemente en donde no exista crecimiento de colonias. Se deja reposar el tubo durante 15 a 30 minutos, y se procede a recobrar una parte del agua agregada (aproximadamente 0.5 ml), la cual se hace reaccionar con la misma cantidad de anilina al 4 % y de bromuro de cianógeno al 10 %. Si el cultivo contenía niacina, se observará la formación de un color amarillo en los siguiente minutos (63).

Una variante a la metodología anterior consiste en utilizar tiras de papel filtro impregnadas con los reactivos, por lo cual, una vez que se dejan pasar los 15 a 30 minutos, se coloca la tira de papel en contacto con la solución, liberándose cloruro de cianógeno gaseoso que reaccionará con la niacina de la solución generando el color. Debe tenerse cuidado de tapar los tubos para evitar el escape del gas y que ocurra un falso negativo (63,69).

M. tuberculosis es una especie que da positiva la prueba y *M. intracellulare* una que la da negativa (63).

5.2. Reducción de nitratos a nitritos

M. tuberculosis y otras especies del género (*M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. szulgai*, entre otras) presentan la enzima nitroreductasa responsable de la reducción de nitratos a nitritos; ello permite su identificación bioquímica cuando se realiza la prueba correspondiente (63,69,76).

La reacción química involucrada es la siguiente:



Los nitritos presentes en el medio se detectan al agregar sulfanilamida y α -naftiletiléndiamina a pH ácido, ya que ocurre la formación de una sal de diazonio color rojo (63,69).

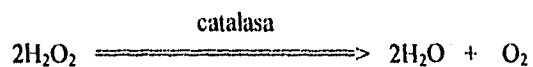
El procedimiento contempla la recolección de una asada del cultivo viable de micobacterias, misma que se coloca en un tubo con unas gotas de agua destilada. Una vez que se ha dejado incubar el tubo por 2 h a 37°C y en presencia de solución de nitratos, se acidifica el medio. Se agregan unas

gotas de solución de sulfonamida al 0.2 % y de solución de dihidrocloruro de n-nafiletiléndiamina al 0.1 %. Finalmente, se agita suavemente hasta observar la formación de un color rosa-rojo en el tubo, lo cual indicará una prueba positiva (63,69).

5.3. Actividad de catalasa

La enzima catalasa es producida por la mayoría de las especies del género *Mycobacterium* variando solamente la cantidad de enzima producida. Para la caracterización bioquímica de las especies del género, se utiliza la estabilidad de esta enzima a 68°C a pH neutro, por un método semicuantitativo (63,69).

La enzima cataliza la siguiente reacción química:



La prueba se considera positiva al observarse la formación de burbujas sobre las colonias del medio de cultivo (63,69).

Para el género *Mycobacterium*, se utiliza una mayor concentración de H₂O₂ en relación a la que se utiliza para determinar la actividad de catalasa de otras bacterias (69).

La prueba se realiza colocando sobre el cultivo (con crecimiento visible de colonias micobacterianas) una solución de H₂O₂ al 30 % en Tween 80 (detergente no iónico que evita la formación de grumos entre las colonias) y se observa por espacio de 3 a 5 minutos. La aparición de burbujas sobre las colonias (casi de inmediato) indica un fuerte positivo (*M. kansasii*); si las burbujas aparecen entre los 7 a 10 minutos, se considera un débil positivo (*M. tuberculosis*) y la ausencia de aquellas indica un negativo para la actividad de catalasa (*M. tuberculosis* resistente a isoniacida -INH-) (63,69).

La prueba es particularmente útil en la identificación de algunas cepas de *M. tuberculosis* INH resistentes, ya que se conoce que una delección del gen responsable de la catalasa (*katG*) suele implicar la adquisición de resistencia a éste antifímico de primera línea (63,69,116).

Para la determinación de la estabilidad de la enzima a los 68°C, se procede a tomar un inóculo del cultivo micobacteriano, emulsificándolo en amortiguador de fosfatos y colocándolo a dicha temperatura por 20 minutos. Una vez pasado ese tiempo, se agregan unas gotas de la solución de H₂O₂ al tubo con el cultivo y se observa la formación o ausencia de burbujas. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. gastri* y algunas cepas de *M. avium* son catalasa sensible a 68°C, mientras que las especies no formadoras de pigmento son catalasa estable a dicha temperatura (63,69).

5.4. Inhibición del crecimiento por la hidracida del ácido Tiofén-2-carboxílico (T₂H)

Esta prueba es útil para distinguir entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*, ya que algunas especies del primero pueden resultar niacina positiva, dificultando la identificación bioquímica (63,69,76).

El T₂H es un compuesto que inhibe el crecimiento de *M. bovis* sin afectar el crecimiento de *M. tuberculosis* a bajas concentraciones (1 a 5 µg por cada ml

del medio de cultivo) permitiendo la diferenciación de las dos especies (63,69).

El T₂H es incorporado al medio de cultivo en una concentración de 1 y 5 µg/ml y posteriormente se inocula al microorganismo "problema", considerando además una caja extra en la que no se haya adicionado el reactivo. Después de un período de incubación de 14 a 21 días, los cultivos que presenten crecimiento corresponderán a cepas de *M. tuberculosis*; y si solamente existe crecimiento en la placa donde no se adicionó T₂H, se tratará de *M. bovis* (63,69).

5.5. Hidrólisis del Tween 80

Ciertas especies del género *Mycobacterium* producen lipasas capaces de degradar al detergente polioxicetilén sorbitol mono-oleato (Tween 80). La prueba correspondiente permite diferenciar especies de lento crecimiento saprofitas (que la dan positivas) de las potencialmente patogénicas (negativas) (63,69,76).

Las lipasas descomponen al Tween 80 en ácido oleico y sorbitol polioxietileno: el Tween 80 se une al indicador rojo neutro a pH=7 confiriéndole un color rosa claro al medio, por lo cual, la degradación de dicho detergente por la lipasa liberará al colorante, produciéndose un color rosa oscuro (que indicará una reacción positiva) debido a la presencia del ácido oleico (69).

Una asada de micobacterias se coloca en el tubo que contenga la solución de Tween 80 y se incuba por 10 días a 35-37°C. El cambio de color se observará a partir de los 3 días, excepto cuando se trata de *M. kansasii* que da positivo entre las 3 y las 6 h. Por su parte, *M. gastri* da un resultado lento positivo y *M. scrofulaceum* es negativo (63,69).

5.6. Prueba de la arilsulfatasa

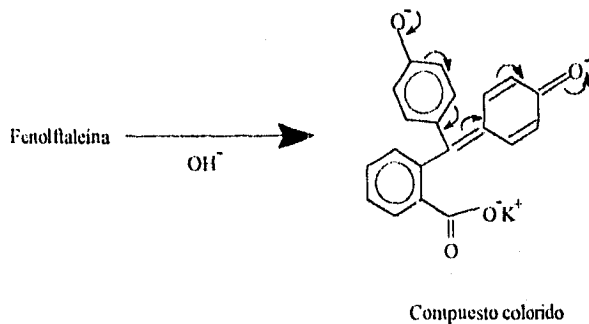
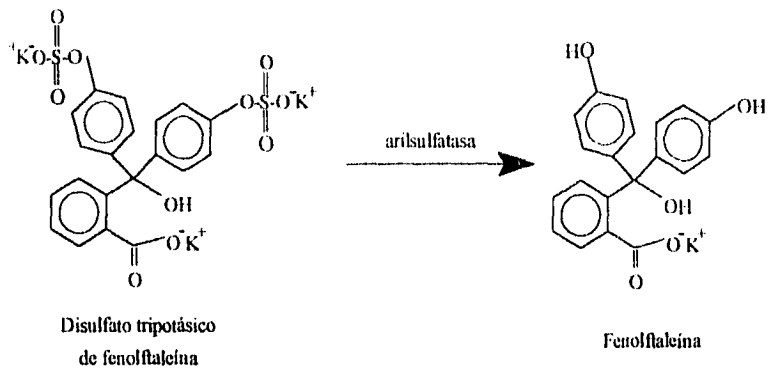
La arilsulfatasa es una enzima producida por ciertas especies de micobacterias, que permite realizar la identificación del complejo *M. fortuitum-chelonei* (63,69).

Dicha enzima provoca que se libere fenolftaleína al romper el enlace existente entre el grupo sulfato y el anillo aromático del disulfato tripotásico de fenolftaleína. La presencia de la fenolftaleína libre se revela mediante la adición de una base al medio de cultivo, lo cual origina el desarrollo de un color rosa intenso (propio del colorante en cuestión a pH alcalino) (63,69).

El disulfato tripotásico de fenolftaleína se adiciona al agar ácido oleico (agar Dubos) y se procede a inocular con las micobacterias “problema”. Transcurridos 3 o 4 días de incubación, se agrega una base débil y se busca la coloración antes mencionada (69).

M. fortuitum, *M. chelonae*, *M. abscessus* dan positiva esta prueba y *M. tuberculosis* puede incluirse como control negativo (63,69).

La reacción química que se lleva a cabo es la siguiente:



Los resultados de las pruebas bioquímicas relacionadas con la identificación de las principales especies de *Mycobacterium* de importancia clínica se resumen en la tabla 1 (63,69,76).

Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas de las especies del género *Mycobacterium*.

Especies de <i>Mycobacteria</i>	Prueba bioquímica					
	Acumulación de niacina	Crecimiento en T ₂ H (10µg/mL)	Reducción de nitratos	Actividad de catalasa (68 °C)	Hidrólisis del Tween 80	Prueba de la arilsulfatasa
<i>M. tuberculosis</i>	+ (95)	+	+ (97)	-	V	-
<i>M. africanum</i>	-	V	-	-	-	-
<i>M. bovis</i>	-(4)	-	-	-	-(21)	-
<i>M. avium</i>	-	+	-	V	-	V
<i>M. intracellulare</i>	-	+	-	+	-	+
<i>M. kansasii</i>	-(4)	+	+(99)	+(91)	+(99)	-
<i>M. scrofulaceum</i>	-	+	-(5)	+(94)	-(2)	V
<i>M. xenopi</i>	-	+	-(7)	+/- (31)	-(12)	+/- (36)
<i>M. szulgai</i>	-	+	+(100)	+(93)	-/+ (49)	V
<i>M. mageritense</i>	-	+	-(1)	+/- (66)	+(99)	-
<i>M. simiae</i>	+/- (63)	+	-(28)	+(95)	-(9)	-
<i>M. genavense</i>	-	+	-	+	+	-
<i>M. marinum</i>	-/+ (21)	+	-	-(30)	+(97)	-/+ (41)
<i>M. ulcerans</i>	-	+	-	+	-	-
<i>M. haemophilum</i>	-	+	-	-	-	-
<i>M. shimoidei</i>	-	+	-	-	+	-
<i>M. asiaticum</i>	-	+	-(5)	+(95)	+(95)	-
<i>M. celatum</i>	-	+	-	+(100)	-	+(100)
<i>M. fortuitum</i>	-/+	+	+(100)	+(90)	-/+ (43)	+(97)
<i>M. chelonae</i>	-/+	+	-(1)	+/- (53)	-/+ (39)	+(95)

Nota: Solamente en las especies del complejo *M. avium-intracellulare* (MAC), donde la identificación bioquímica puede llegar a ser complicada, se ha utilizado la serotipificación y, más recientemente, el uso de sondas de DNA específicas para cada especie (*M. avium* y *M. intracellulare*). Los números entre paréntesis corresponden al porcentaje (aproximado) de cepas que dan los resultados de la prueba.

II. IMPORTANCIA CLÍNICA DE *M. tuberculosis*

1. La primoinfección por bacterias de la TB y el origen de la enfermedad

La TB es una enfermedad infecciosa que se transmite por diversas vías, pudiendo involucrar prácticamente a cualquier tejido del organismo humano; no obstante, la TB pulmonar es la forma más frecuente de TB y se asocia a la inhalación de los agentes causales provenientes de individuos afectados, quienes comúnmente los liberan al ambiente a través del estornudo y de sus numerosos accesos tusígenos (63,93).

Una vez que el microorganismo se establece en los pulmones de una persona aparentemente sana, aquél se reproduce muy lentamente (lo cual es característico de las micobacterias), aunque sin impedimentos, ante la ineficacia antimicobacteriana de los leucocitos polimorfonucleares (LPMN), que suelen ser -independientemente del agente causal- las primeras células de

defensa que llegan a los tejidos afectados; es decir, no es sino hasta que el organismo del individuo produce suficientes linfocitos sensibilizados (que poseen la información genética para reaccionar específicamente con el invasor), cuando los microorganismos de la TB son rodeados por cuatro capas celulares [células epitelioides, células gigantes, linfocitos (sensibilizados) y fibroblastos], para impedir que continúen su multiplicación. A esta respuesta del hospedador se le conoce como primoinfección o lesión granulomatosa y representa la única herramienta del organismo para “controlar a las micobacterias” (ante su imposibilidad de erradicarlas). De esta manera, cuando los mecanismos de defensa del individuo se encuentran en condiciones adecuadas, limitan al mínimo el desarrollo de las bacterias de la TB, pero éstas permanecen vivas “en forma latente”, ya sea durante toda la vida de la persona, o bien, hasta que ésta experimenta alguna depresión inmunológica que permite a dichos microorganismos reanudar su crecimiento y, ahora sí, provocar la enfermedad (93).

De la consulta a los diagramas 1 y 2 se pueden deducir algunas diferencias entre una primoinfección por microorganismos de la TB y el padecimiento conocido como TB.

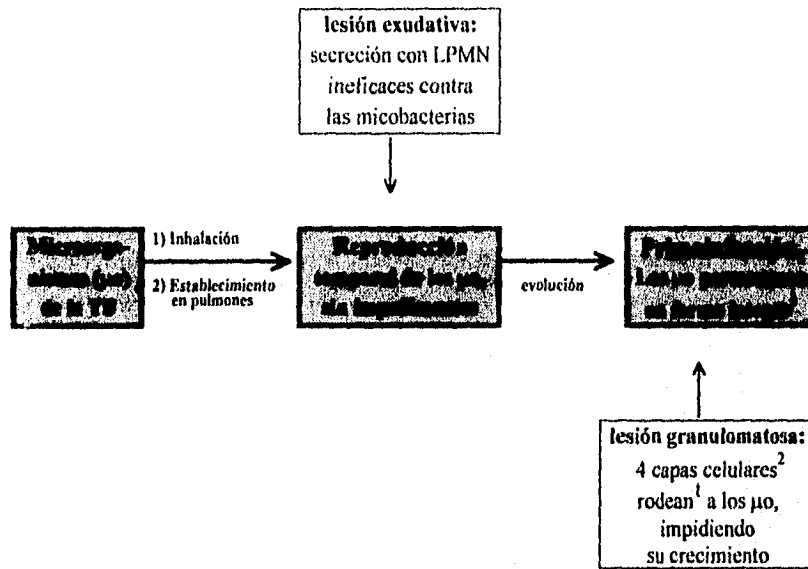
Finalmente, aunque el cuadro clínico de la TB pulmonar puede variar, los síntomas más regulares suelen ser: fiebre, astenia (pérdida de fuerza), hemoptisis (accesos tusígenos a través de los cuales el individuo emite fragmentos de expectoración sanguinolenta), pérdida de peso y disnea (dificultad para respirar) (63,93).

2. Otros aspectos asociados a la TB

2.1. Fenómeno de Koch

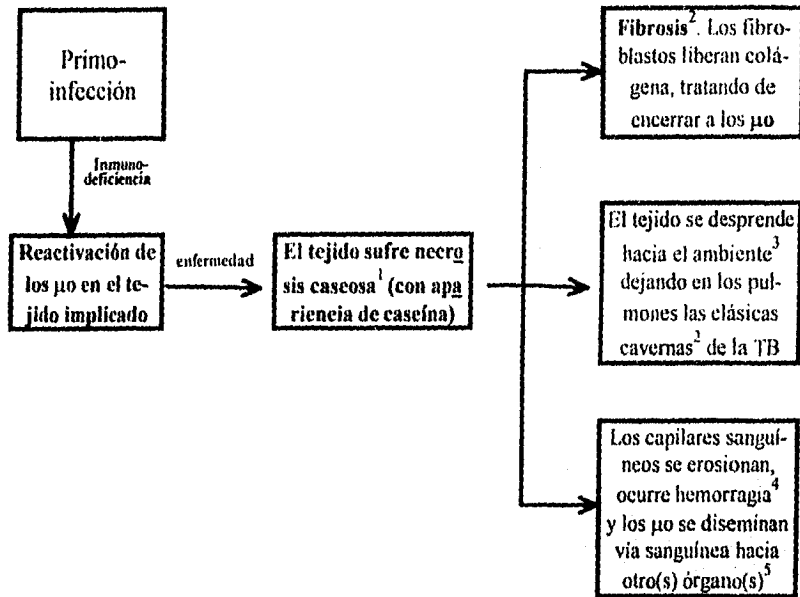
Se realizó inoculando a *M. tuberculosis* en cobayos, por vía intradérmica; diez a catorce días más tarde, el tejido involucrado evidenciaba una clásica induración-ulceración y los nódulos linfáticos cercanos manifestaban necrosis

Diagrama 1. Adquisición de la primoinfección con microorganismos de la TB



CLAVE: ¹ = Sólo cuando son adecuadas las condiciones de los mecanismos de defensa del individuo; ² = Células epitelioides, células gigantes, linfocitos y fibroblastos.

Diagrama 2. Aparición de la TB en individuos que han adquirido previamente la primoinfección.



CLAVES: ¹ = Este evento puede ocurrir directamente después de la lesión exudativa (diagrama 1), en los individuos con deficiencias inmunológicas (por desnutrición, silicosis, leucemia, SIDA, etc.); ² = detectable(s) mediante rayos X; ³ = al toser el enfermo, pudiendo ser inhalado por otras personas; ⁴ = reitera el clásico signo conocido como "hemoptisis" (tos con sangre); ⁵ = la TB puede afectar prácticamente a cualquier órgano o tejido y se denomina "TB miliar" cuando se presenta en varias regiones anatómicas.

caseosa. Cuando seis semanas después, en el mismo animal aunque en diferente sitio, se practicaba una segunda inoculación intradérmica del bacilo de Koch la respuesta, en esta ocasión, aparecía más rápidamente y se resolvía con singular eficacia: sólo dos días después de la inoculación ocurría la induración-ulceración del tejido implicado, pero su cicatrización iniciaba en algunas horas; además, los nódulos linfáticos no alcanzaban a ser afectados (69,93).

Estas observaciones permitieron establecer las claras diferencias entre una infección y la reinfección por *M. tuberculosis*, lo cual a la postre condujo a la elaboración de la vacuna antituberculosa: se pensó que podría provocarse una infección controlada en el humano, para que éste, posteriormente, cuando entrara en contacto con alguna cepa virulenta, se comportara como el cobayo durante la reinfección (69,93).

2.2. La vacuna BCG (bacilo de Calmette y Guèrin)

Calmette y Guèrin, ambos investigadores del Instituto Pasteur, diseñaron la vacuna antituberculosa vigente, atenuando una cepa de *M. bovis* (que es estructural e inmunológicamente parecida a las especies que integran el complejo *M. tuberculosis*), proceso que les llevó aproximadamente trece años, porque la mencionada atenuación requirió de que el microorganismo se subcultivara en doscientos treinta y una ocasiones (69,93).

De modo que la vacuna BCG está constituida por bacterias vivas, aunque atenuadas: se aplica intradérmicamente o por multipuntura cutánea, alrededor de cuatro semanas después da lugar a una ulceración en el sitio de inoculación y cerca de las ocho semanas totales, el proceso se resuelve dejando una cicatriz queloide en el tejido implicado (69,93).

2.3. Prueba de la tuberculina (Mantoux o PPD)

2.3.1. Obtención del antígeno

Varias colonias de *M tuberculosis* (obtenidas en Lowenstein Jensen) se depositan en un recipiente con solución salina isotónica estéril y se destruyen con calor; el contenido del recipiente se filtra y el filtrado se trata con sulfato de amonio para precipitar las tuberculinoproteínas, también conocidas como “derivado proteico purificado” (PPD). Evidentemente este producto se distribuye comercialmente y es el antígeno que se emplea para realizar la prueba de la tuberculina (69,93).

2.3.2. Metodología

La prueba se realiza inoculando 2 U de PPD por vía subcutánea (en un antebrazo), considerándose como positiva, si 48 h después aparece una zona de induración de por lo menos 5 mm de diámetro en el sitio de inoculación (69,93).

2.3.3. Objetivo

La prueba de la tuberculina puede resultar de utilidad en los siguientes casos:

- Para establecer si una vacunación (realizada por lo menos ocho semanas antes) cumplió con su finalidad de inducir la respuesta inmune; en este sentido, la positividad de la tuberculina no garantizará que dicha respuesta haya alcanzado niveles protectores.
- Para detectar si un individuo no vacunado con la BCG ha adquirido la primoinfección.

Evidentemente, la prueba en cuestión no es útil para establecer el diagnóstico de la enfermedad (ya que el paciente puede haber recibido la BCG o haber adquirido la primoinfección y, en realidad, estar padeciendo alguna otra afección), excepto cuando se trata de niños pequeños (93).

2.4. Patogenia

Los bacilos de la TB son parásitos intracelulares facultativos (desarrollan dentro y fuera de las células del hospedador) que se transmiten principalmente por las vías inhalatoria (+++), oral (++) -sobre todo en los niños que ingieren leche de bovinos enfermos-, cutánea (+) y oftálmica (+). Se considera que el microorganismo no produce toxinas, si bien se ha comprobado cierta capacidad leucotóxica en algunos de sus componentes estructurales (93).

En este sentido, los factores de patogenicidad detectados hasta ahora en el complejo *M. tuberculosis* se mencionan a continuación:(93)

2.4.1. El factor cordón o factor serpiente, que corresponde al micósido (glucolípid) 6,6'-dimicoliltrehalosa y que, además de ser el responsable de la disposición micobacteriana en paralelo y cadenas (*in vitro*), es altamente tóxico para los leucocitos: les inhibe la acción de la succinato deshidrogenasa, provoca el hinchamiento de sus

mitocondrias y separa a los ribosomas del reticulo endoplásmico rugoso.

2.4.2. Los sulfolípidos, que actúan como fagolisosomasa (impidiendo la fusión lisosoma-fagosoma en los fagocitos) y potencian la capacidad del factor cordón.

2.4.3. El complejo superóxido dismutasa (SOD)/catalasa, que neutraliza el poder oxidante de los iones superóxido (O_2^-) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), presentes en los lisosomas de los fagocitos.

3. Epidemiología

En la actualidad ocurren aproximadamente ocho millones de casos nuevos de TB, de los cuales tres millones derivan en la muerte del paciente; dichas cifras, por sí mismas, reflejan el motivo de que esta enfermedad sea considerada como una de las principales causas de mortalidad asociada a un solo agente etiológico (7,63,82,93).

En 1989 y 1990, la Unidad de TB de la Organización Mundial de la Salud (OMS) emprendió un estudio para determinar la naturaleza y magnitud del problema mundial, encontrando que más de 1,700 millones de personas, cantidad equivalente a la tercera parte de la población mundial, estaban infectadas¹ por alguna especie perteneciente al complejo *M. tuberculosis* y que, en las naciones industrializadas, la proporción de individuos enfermos - en relación con los no afectados- mostraba una clara tendencia a alcanzar las cifras procedentes de los países en vías de desarrollo (63,82).

De hecho, de 1985 a 1991, la frecuencia de TB en E.U.A. se incrementó en más de 18 %, y aún continúa creciendo, considerándose, entre las razones más trascendentes vinculadas a dicho país, al aumento de la inmigración proveniente de áreas endémicas y al deterioro del sistema nacional de salud pero, sobre todo, a la muy progresiva frecuencia de la enfermedad en los individuos que padecen SIDA y a la cada vez más alarmante cantidad de cepas multirresistentes a los fármacos antituberculosos tradicionales (7,26).

¹ De acuerdo con los diagramas 1 y 2, así como con otros conceptos manejados en Infectología, infección no siempre implica enfermedad; como se recordará, existen numerosos individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que no muestran signo o síntoma alguno de SIDA.

Por lo que respecta a México, la tasa de morbilidad (el número de nuevos enfermos anuales por cada 100,000 habitantes) asociada al padecimiento ha permanecido estable desde hace aproximadamente 20 años; sin embargo, aquí ocurren el 7 % de los casos mundiales de TB, la afección es la décimoquinta causa de muerte (con más de 5,300 decesos al año) y sus principales formas clínicas son la TB pulmonar (83 %) y la meningea (1.2 %); por otra parte, los individuos menos afectados son los menores de 15 años de edad y la incidencia en el sexo masculino es mayor en proporción de 1.3:1 (29).

Finalmente, en nuestro medio también se ha manifestado una muy clara relación entre la TB y el SIDA: las patologías oportunistas que más afectan a los pacientes que padecen esta última enfermedad son: candidiasis (37.6 %), neumonía por *Pneumocystis carinii* (12.2 %) y TB, tanto pulmonar como diseminada (11.5 %); en respuesta, se ha observado que en los enfermos de TB existe cierta predisposición a la adquisición de infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), si bien es indispensable que éste sea adquirido mediante las vías de transmisión relacionadas con dicho riesgo (29).

III. LA NUEVA TB Y LA PROBLEMÁTICA DE LA MULTIRRESISTENCIA A LAS DROGAS ANTITUBERCULOSAS

1. La "nueva tuberculosis"

En E.U.A., el actual fenómeno epidemiológico asociado a esta enfermedad ha dado lugar al surgimiento del término "la nueva tuberculosis", por cuanto que ha sido necesario realizar algunos ajustes a los conceptos que se venían manejando acerca de la TB y del SIDA. En este sentido: **a)** se ha comprobado que los enfermos de SIDA pueden fungir como importantes incubadores y diseminadores de la TB, lo cual hace factible que finalmente si se decida aislarles del resto de la población (en cuanto les sean detectados los signos y síntomas correspondientes); **b)** buena parte de los casos actuales de TB no se deben a la reactivación del microorganismo que colonizaba desde tiempo atrás al individuo (en forma de primoinfección latente), sino a otra(s) cepa(s) adquirida(s) recientemente [la(s) cual(es) suele(n) mostrar cierta multirresistencia a los antimicrobianos]; **c)** la notable propagación de

numerosas cepas multirresistentes¹ a las drogas antituberculosas está disminuyendo seriamente la efectividad de los regímenes preventivos y terapéuticos dirigidos contra la TB (26,31,43,75,80,81).

Sin lugar a dudas, lo mencionado en los incisos "a" y "b" lleva consigo graves implicaciones, tales como el probable incremento de las penosas discriminaciones a que son sometidos los enfermos de SIDA y la infortunada posibilidad de que las cepas actuales del complejo *M. tuberculosis* posean una mayor virulencia, capaz de superar los mecanismos de defensa de un mayor número de individuos; no obstante, la multirresistencia a los fármacos antituberculosos también representa un motivo de alerta mundial: hoy en día, dependiendo de la región geográfica en estudio, 15 a 33 % de los aislamientos clínicos son resistentes al menos a una droga antituberculosa de primera línea² y 3.3 a 19 % lo son tanto a la isoniacida (INH) como a la

¹ El complejo *M. tuberculosis* sólo adquiere la multirresistencia a través de mutaciones cromosomales espontáneas y no, como ocurre de manera adicional en muchas otras bacterias, por conjugación de plásmidos R (de resistencia) o por transducción asociada a bacteriófagos temperados.

² Las principales drogas antituberculosas de primera línea son isoniacida, rifamicina, estreptomina, etambutol, y pirazinamida, y representan los agentes terapéuticos de primera elección contra la TB; los fármacos de segunda línea son el ácido p-aminosalicílico, cicloserina, capreomicina y etionamida, y son más tóxicas y menos eficaces.

rifampicina (RIF), consideradas las más eficaces en la terapéutica de la TB (26,31,63,75,81,90).

Es conveniente mencionar que, tradicionalmente, el tratamiento de la TB se ha basado en el empleo de más de una droga antituberculosa -en el mismo paciente-, previendo que la cepa implicada pueda resultar resistente a alguna de ellas; sin embargo, la problemática ha alcanzado tales niveles, que en la actualidad se viene trabajando intensamente -hasta ahora sin mayor éxito- en la búsqueda de nuevos esquemas terapéuticos dirigidos contra la TB pero, sobre todo, se ha estado difundiendo la recomendación de establecer el tratamiento -para cada enfermo-, con base en el aislamiento de la cepa correspondiente, a fin de someterla a las pruebas de susceptibilidad que revelen su eventual resistencia a uno o más de los agentes antituberculosos (14,26,35,42,63,80,83).

En cuanto al estudio de nuevos esquemas antimicobacterianos, los analizados hasta ahora incluyen fármacos que venían siendo utilizados contra otra clase de microorganismos; por ejemplo: clofazimina, azitromicina, claritromicina, rifabutina, doxiciclina, minociclina, trimetoprim-

sulfametoxazol, etc. Sin embargo, su eficacia contra el complejo *M. tuberculosis* ha resultado prácticamente nula (lo cual difiere de lo observado en diversas MNT) (14,42,43,63).

Luego entonces, a condición de que sean seleccionadas previamente mediante pruebas de susceptibilidad, las drogas antituberculosas clásicas, de primera línea, continúan representando la mejor opción para el tratamiento de la TB; de hecho, el único avance logrado hasta ahora radica en el lapso de dosificación de dichos fármacos; de acuerdo con el Center for Diseases Control (CDC) y la American Thoracic Society (ATS) norteamericanos, en los pacientes con TB pulmonar, los tradicionales regímenes de 18 a 24 meses de duración se deben reemplazar por esquemas de sólo 6 meses³, a base de INH y RIF, siempre que el paciente no padezca de SIDA (en cuyo caso es necesario extenderse hasta los 9 meses) y que la cepa no manifieste *in vitro* resistencia hacia una o ambas drogas (14,42,43,50).

³ Incuestionablemente, los periodos tan prolongados de dosificación representan una de las principales causas de abandono de los regímenes terapéuticos por parte de numerosos pacientes, lo cual conduce a graves recaídas, mayores índices de contagio y cuantosas pérdidas económicas asociadas al consumo de medicamentos.

2. Aspectos genéticos y resistencia en MNT y *M. tuberculosis*

En Infectología, siempre ha existido un interés especial por estudiar los fenómenos asociados a la adquisición bacteriana de resistencia a un fármaco específico, fenómeno que frecuentemente se lleva a cabo mediante la donación-recepción de plásmidos. Un plásmido se define como material genético independiente del genoma bacteriano, que contiene información genética necesaria para regular su expresión de forma autónoma y que confiere alguna ventaja al microorganismo que lo porta, independientemente de que puede transferirse de una especie a otra -del mismo o distinto género- mediante conjugación o transducción (12,47).

Las especies de *Mycobacterium* en las que se han buscado plásmidos incluyen cepas patógenas y también de vida libre. Debido al riesgo de trabajar con *M. tuberculosis*, los estudios asociados a la búsqueda de plásmidos micobacterianos se han realizado principalmente en los complejos *avium* y *fortuitum* y en *M. scrofulaceum*. Adicionalmente, en *M. tuberculosis*, no se ha detectado la presencia de plásmidos y/o de transposones que acarrean genes de resistencia, debido probablemente a que

se trata de un parásito intracelular facultativo, lo cual origina que se exponga muy poco al microambiente extracelular y, por lo tanto, que no interactúe con otras especies (16,18,27,97).

En concreto, el único reporte ligado a la existencia de un elemento de transposición responsable de la resistencia micobacteriana a algún antibiótico se asocia a *M. fortuitum*; dicho gen codifica para resistencia a las sulfonamidas (gen *sul3*) y no se ha detectado en especies de lento crecimiento; de hecho, diversos estudios sugieren que esta micobacteria lo recibió a partir de especies ambientales del género *Flavobacterium* y no de alguna otra especie de *Mycobacterium* (51,54).

Evidentemente, en microorganismos ambientales, los plásmidos suelen contener gen(es) que confieren alguna(s) ventaja(s) selectiva(s) a la cepa que los posee, incluyendo resistencia a compuestos tóxicos (iones pesados tales como mercurio o cobre) o la posibilidad de utilizar alguna fuente de carbono poco usual (18,27).

En cuanto a las MNT mencionadas (complejos *avium* -MAC- y *fortuitum*), es muy posible que los plásmidos lleven los genes relacionados con numerosos factores de virulencia, tales como toxinas, hemolisinas y proteasas, aunque esto aún se encuentra bajo discusión (27).

En dichas MNT, esta clase de plásmidos se ha detectado tanto en cepas aisladas a partir de pacientes con infecciones pulmonares como en otros que padecían infecciones diseminadas (18,27).

Por ejemplo, en MAC se han encontrado dos grupos de plásmidos, cada uno de los cuales presenta un plásmido tipo, con el cual se comparan los de nuevo descubrimiento, a fin de establecer la clasificación de estos últimos en cuanto se les detecta. El plásmido pVT2 es el plásmido tipo del grupo 1, mientras el pLR7 es el del grupo 2 (18,27).

Diversos autores sugieren que ambos plásmidos se encuentren relacionados con la actividad de catalasa en las cepas y con algunos aspectos de virulencia (18,27).

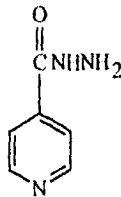
Sin embargo, es claro que no existe evidencia alguna acerca de la presencia de plásmidos en *M. tuberculosis* y, por lo tanto, se están buscando otros mecanismos que confieran resistencia a los antifímicos de primera línea; en este contexto, se ha demostrado que en dicho microorganismo el fenómeno aparece al ocurrir alteraciones en los genes cromosómicos que codifican para la síntesis de los "blancos" de los fármacos involucrados (96,97).

En otras palabras, en el género *Mycobacterium* la multirresistencia parece tener su origen en la acumulación de mutaciones que ocurren en el genoma de la cepa correspondiente y, muy probablemente, cada mutación se asocia a la falta de sensibilidad a algún antifímico determinado (16,37,96).

3. Resistencia a isoniacida (INH)

Desde su introducción (1952), la INH (hidracida del ácido nicotínico) se ha considerado como el fármaco de mayor elección para el tratamiento de la TB (1).

Figura 1. Estructura química de la Isoniacida.



La INH es bacteriostática para los bacilos tuberculosos en reposo, pero bactericida para los que se encuentran en división; diversos estudios *in vitro* han mostrado que uno de cada 10^6 bacilos se vuelve resistente a este fármaco cuando es administrado exclusivamente. Ello resulta trascendental si se considera que una caverna tuberculosa típica puede contener de 10^7 a 10^{10} microorganismos; muy probablemente la alta especificidad de la INH contra el género *Mycobacterium*, haya determinado que aquélla sea el fármaco de elección para llevar a cabo el tratamiento de la TB; no obstante,

es importante tomar en cuenta que su efectividad varía en función de la especie micobacteriana en turno (1,50).

De hecho, *M. tuberculosis* es muy susceptible a la INH, a concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) muy bajas (de 0.02 a 0.06 µg/mL); en tanto que las MICs relacionadas con otros miembros del complejo *M. tuberculosis* son notablemente más elevadas (16,101).

Si bien el mecanismo de acción de la INH aún no se ha logrado describir de manera convincente, existen varias hipótesis involucradas que, en resumen, establecen que el fármaco podría actuar a diversos niveles de la célula micobacteriana: promoviendo la formación de oxígeno reactivo que oxida diversas macromoléculas intracelulares y/u otros componentes, o bien, inhibiendo algunas rutas metabólicas exclusivas del género. No obstante, la teoría más aceptada es la que sugiere que la INH inhibe la síntesis de ácido micólico, al producirse un compuesto tóxico mediado por la enzima catalasa-peroxidasa (junto con la acción de la superóxido-dismutasa) y que conduciría a la pérdida de la integridad de la pared celular con la consecuente muerte celular (1,16,50,77,78,101).

Adicionalmente, cabe subrayar la posibilidad de que existan otros mecanismos o “blancos” de la INH, ya que ésta puede originar la producción de radicales libres superóxido e hidroxilo, e incluso, afecta el metabolismo del NAD⁺ al formarse un complejo tóxico INH-NAD que alteraría la síntesis de ácidos micólicos y de otros componentes estructurales y/o funcionales (16,42,101).

Entre las hipótesis acerca de la alta especificidad de la INH hacia el complejo *M. tuberculosis* destaca una reciente que involucra la participación de varios genes. En enterobacterias, se ha descrito la presencia de ciertos genes cuya función consiste exclusivamente en regular la expresión de otros; es decir, un gen regulador es aquél que da origen a un producto implicado en la regulación de la expresión de otro gen; por ejemplo, el gen que codifica para la síntesis de una proteína represora que evita la lectura de otro al unirse a una porción del DNA denominada región operadora (8,47).

Los genes reguladores, se pueden expresar bajo ciertas condiciones de estrés para la célula; exposición a radiaciones ultravioleta (u.v.), o a agentes oxidantes, a ciertas temperaturas, a concentraciones elevadas de ciertos metabolitos, etc. En *E. coli* y *S. typhimurium* (enterobacterias resistentes a

INH), se ha comprobado ampliamente la presencia de un gen regulador denominado *oxyR* el cual muestra trascendencia en la sobre expresión del gen *ahpC* (que codifica para la parte pequeña de la enzima hidroperóxido alquil-reductasa), del *katG* (que codifica para la catalasa-peroxidasa) y del *gorA* (que codifica para la glutatión reductasa). En este sentido, cabe subrayar que mutaciones en el gen *oxyR* conducen a estas bacterias a manifestar susceptibilidad a la INH (8,22,71).

Por su parte, el producto del gen *ahpC* parece formar parte de un sistema de destoxificación del microorganismo en contra de ciertas moléculas, por lo que la forma tóxica de la INH pudiera resultar eliminada de esta manera; así las cosas, bajo condiciones de estrés asociadas a algún exceso en la concentración de INH intracelular, ocurriría la sobre expresión del *ahpC* evitando la muerte celular. Es importante hacer notar que dicho gen alcanza una homología superior al 90 % en *M. avium*, *M. leprae* y *M. tuberculosis*, por lo que se considera que se trata de un gen altamente conservado entre las especies del género (22).

A este respecto, el gen *oxyR* sólo se encuentra altamente conservado entre especies MNT, pues en el complejo *M. tuberculosis* (tanto los aislamientos

clínicos como el BCG que se emplea en distintas partes del mundo), presenta numerosas mutaciones, lo cual sugiere un producto sin función; por consecuencia, en el complejo *M. tuberculosis*, no existe una regulación en base al gen *oxyR* de ninguno de los genes mencionados, es decir, del *ahpC*, del *katG* ni del *gorA*. Lo anterior indica entonces que la expresión de estos genes es siempre constante, sin existir sobre-expresión. En base a esto, si *M. tuberculosis* es expuesto a concentraciones de INH que sobrepasen el nivel normal detoxificador de proteína AhpC, entonces el microorganismo morirá, lo que explica de manera convincente la alta especificidad hacia todo el complejo *M. tuberculosis* (22).

Por otro lado, la actividad antifúngica de la INH depende de la producción de un compuesto reactivo mediado por la catalasa-peroxidasa (también conocida como hidropoxidasa I o HPI); sin embargo, existe la presencia de dos genes distintos que codifican para dos catalasas diferentes. La segunda catalasa, denominada HPII y codificada por el gen *katE*, regula la actividad de la HPI evitando la conversión de la INH a su forma tóxica. En especies resistentes a INH, el gen *katE* muestra una alta actividad mientras en el complejo *M. tuberculosis* dicho gen no existe (16,36).

De esta forma, la alta especificidad de la INH en contra de *M. tuberculosis* se basa en dos aspectos (16,22,36,38).

- 1) Ausencia del gen regulador (*oxyR*) que regule la expresión de genes relacionados con un sistema intracelular de detoxificación (*ahpC*).
- 2) Ausencia de la enzima HPII la cual, en otras especies bacterianas, regula la actividad de la HPI o catalasa-peroxidasa.

Por otra parte, en cuanto a los mecanismos descritos para la adquisición de resistencia a INH se han encontrado alteraciones en dos genes (38,60).

- A) El gen de la catalasa-peroxidasa (*katG*)
- B) El gen de la sintasa de ácidos grasos (*inhA*)

Actualmente se han reportado numerosas mutaciones en estos genes que llevan a la adquisición de resistencia, e incluso existen cepas en las cuales se han demostrado alteraciones en ambos genes. Sin embargo, solamente un 70 % de los aislamientos micobacterianos caen dentro de estos dos mecanismos de resistencia, lo cual si bien es un alto porcentaje, apoya la hipótesis de suponer la presencia de otro(s) mecanismo(s) de resistencia para cepas en donde no hay alteraciones en estos genes pero son resistentes a INH (22,38,65).

En base a la pérdida de la actividad de catalasa observada en cepas resistentes a la INH, y al análisis de la secuencia del gen *katG* se han encontrado diversas alteraciones las cuales parecen explicar la aparición de resistencia. Entre éstas se encuentran mutaciones puntuales, delección e inserción de marco de lectura y mutaciones sin sentido (3,15,60,65).

De algunos aislamientos clínicos, se ha reportado la delección completa del gen; lo cual representa un mecanismo de adquisición de resistencia inusual en bacterias y, aunque inicialmente fue propuesto como único, se ha demostrado que sólo se presenta en una pequeña proporción sin estar asociado a la concentración a la cual el bacilo es susceptible (3,99,102).

En un inicio se consideró que, a mayor desarrollo de resistencia (mayor dosis a la cual el bacilo es susceptible) mayor posibilidad de delección del gen, pero esta posibilidad se eliminó al encontrarse diversos aislamientos susceptibles a altas dosis de INH y con actividad de catalasa-peroxidasa. Dicha actividad se puede presentar en forma normal o disminuida, por lo que en estos aislamientos existe expresión de la enzima y se descarta la delección del gen como único mecanismo de resistencia aunque probablemente sea el que ofrece el mejor grado de resistencia (28,65,85,99).

El gen *katG* contiene 735 aminoácidos que codifican para la catalasa-peroxidasa con un peso molecular de 800 KDa. La enzima consta de 2 subunidades idénticas y su función es la de eliminar el H₂O₂ acumulable del metabolismo de la respiración oxidativa, aunque en *M. tuberculosis* se considera que esta función no es la única. La enzima muestra un 53.3 % de homología con su equivalente enterobacteriana (HPI en *E. coli*) y un 45.7 % con la de *B. stearothermophilus*. La enzima es lábil a la temperatura al igual que la de *E. coli* (36,85,102).

Como se mencionó anteriormente, se han encontrado diversas alteraciones en la secuencia del gen (*katG*); las más frecuentemente reportadas se resumen en la tabla 2 (15,38,60,65,72).

Tabla 2. Principales mutaciones relacionadas con resistencia a INH en el gen *katG*.

Posición	Aminoácido sustituido ⁴
463	Arginina por leucina
315	Serina por treonina
108	Histidina por ác.glutámico
275	Treonina por prolina
125 y 126	Inserción de isoleucina
262	Treonina por arginina
335	Isoleucina por treonina
350	Alanina por serina

⁴ Cada aminoácido (a.a.) es codificado por una secuencia específica de tres nucleótidos (triplete); por ejemplo, el triplete CGU codifica para el a.a. arginina. Si por una mutación la secuencia anterior resulta en CUU, entonces el a.a. codificado sería leucina.

Por estudios de comparación con la estructura de la peroxidasa del citocromo c en *S. cerevisiae* (de la cual se conoce su estructura cristalina) se han podido describir los mecanismos de resistencia de *M. tuberculosis* a la INH (36,38).

En base a estudios de cristalografía de rayos X, se ha determinado que la estructura de la enzima consta de 10 hélices (designadas de la A a la J) con un grupo hem IX prostético. Probablemente sólo un dominio N-terminal contiene al sitio activo, característica de las enzimas peroxidadas. De las mutaciones reportadas en el gen *katG*, todas parecen afectar el sitio activo, con excepción de la más frecuentemente encontrada (Arg (463)) al final de la hélice A (36,38).

De aquellas reportadas, la inserción de isoleucina (posición 125 y 126), afecta una región rica en glicina la cual conecta las hélices B y C. La hélice B contiene 2 sitios críticos de actividad catalítica, Arg (104) e His (108). En este último, se han reportado alteraciones. Así pues, es de esperar que alteraciones en otros sitios críticos (Tre (262), Ile (335) y Ala (350)) afecten directamente la actividad de la enzima lo que se refleja en una disminución de dicha actividad además de conferir la resistencia (36,38,60,72).

También relacionadas con la actividad enzimática son las mutaciones en Tre (275) y Ser (315). Estas posiciones corresponden a péptidos cortos que conectan las hélices F y G, y que juntas se conectan con el grupo hem. Dichos aminoácidos están relacionados con la formación de enlaces y liberación de radicales libres (15,36,38,60,65).

Por su parte, la mutación más frecuentemente hallada, representa un mecanismo interesante al no existir asociación con la actividad enzimática. Lo más probable indica que este residuo intervenga en la unión de la enzima con su sustrato. En el equivalente a esta enzima en enterobacterias (gen *HPI*), existe un residuo hidrofóbico que generalmente corresponde o a Ala o a Leu siendo éste último por el cual se da la mutación. En particular este aminoácido Leu, se ha encontrado en *M. intracellulare* y BCG, cepas menos susceptibles al fármaco (15,38,60,65,72).

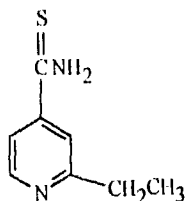
Luego entonces, no existe alteración en sitios de actividad enzimática, y al alterar el sitio de unión del fármaco, se presenta el fenotipo resistente con niveles de actividad de catalasa normales (38).

Las alteraciones mencionadas, describen porque cepas resistentes disminuyen su actividad de catalasa, mediante la síntesis de una enzima "modificada" pero funcional. En cepas donde la actividad ni siquiera se ve disminuida, la pérdida de ésta probablemente le quita al parásito alguna capacidad selectiva, ventajosa y que contribuya directamente a su virulencia (36,38,95).

Por último, es probable que otras enzimas también puedan co-participar en la activación de la INH, por ejemplo la superóxido-dismutasa (SOD) o antígeno de 23kda; ya sea por que su sustrato sea algún producto de la catalasa-peroxidasa o bien por liberar algún producto sustrato de ella. No se pueden descartar alteraciones en el gen *SOD* como otro posible mecanismo de resistencia (78,79,98,100).

Por su parte, en el gen *inhA* también se han encontrado mutaciones sin sentido que confieren resistencia a INH y a la Etionamida (ETH); éste último, un antifímico de segunda línea de estructura química común con la INH (6,23,44).

Figura 2. Estructura química de la Etionamida



La identificación del gen *inhA* permitió encontrar la relación entre resistencia a INH (independiente del gen *katG*) y la síntesis de ácidos micólicos. Los primeros estudios sobre la existencia de otros genes responsables en la adquisición de resistencia a INH surgieron al encontrar cepas resistentes con actividad de catalasa y resistencia cruzada a INH y ETH, lo que hizo suponer que ambos fármacos comparten el mismo blanco (6,16,44).

El gen *inhA* codifica para una enzima involucrada en la síntesis de ácidos micólicos (enoil-ACP reductasa) siendo además el blanco primario de la INH y de la ETH. Se ha demostrado que ni la INH ni la ETH son capaces de unirse a esta proteína, por lo que la acción de la catalasa sobre la INH (y probablemente también sobre la ETH) forma el compuesto de actividad antituberculosa (6,16,23).

El producto del gen muestra homología con la proteína EnvM de enterobacterias (proteína que participa en la síntesis de ácidos grasos) en aproximadamente un 40 %. De manera similar a la EnvM, la InhA debe participar en la contraparte metabólica del género *Mycobacterium*, es decir, en la síntesis de ácidos micólicos. La enzima puede utilizar como cofactores nicotinamida (NADH) o nucleótidos de flavina (FADH), con sitios específicos de unión para estas moléculas (16,66,23).

La enzima cataliza la reducción específica del NADH de la proteína acarreadora 2-trans-enoil-acil, paso esencial en la elongación de los ácidos micólicos. En cepas resistentes con mutaciones en el gen *inhA*, se observa una disminución en la afinidad de la enzima por el NADH, molécula a la cual la forma activa de la INH se une formando un complejo iso-NADH (16,66,23).

Las mutaciones más frecuentemente encontradas en este gen se resumen en la tabla 3 (6.23,60,68).

Tabla 3. Principales mutaciones relacionadas con resistencia a INH en el gen *mhA*

Posición	Aminoácido sustituido
16	Isoleucina por treonina
94	Serina por alanina
95	Isoleucina por prolina
	ALTERACIONES EN ZONAS REGULADORAS DEL GEN

En el sitio de unión del cofactor, el nucleótido forma enlaces tipo puente de hidrógeno con 7 aminoácidos y 6 moléculas de H₂O. En cepas normales, una de las moléculas de H₂O se “acomoda” correctamente formando los enlaces con los aminoácidos Ser (94), Gli (14) y Ala (22). En cepas con la mutación Ser (94), la estructura tridimensional se ve alterada, por lo que la molécula no se puede “acomodar” en ese mismo sitio, disminuyendo la afinidad de la enzima por el cofactor. De esta forma, la enzima no pierde su actividad al utilizar alternativamente FADH continuando la síntesis de ácidos micólicos (23).

De estudios recientes, se ha reportado la mutación Ile (95), la cual posiblemente también esté participando en la unión entre el cofactor y la enzima (68).

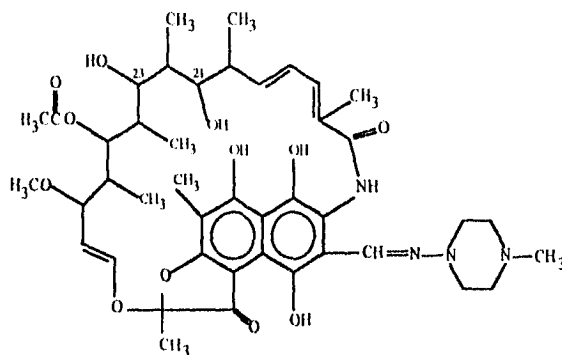
De manera adicional, es posible que existan otras mutaciones que causen la sobre expresión del gen *inhA* (por ejemplo en un gen regulador), y que lleven a la adquisición de resistencia. A mayor expresión del gen, existirá mayor producción de proteína InhA y por lo tanto menor susceptibilidad a la INH, sin alterarse la ruta metabólica “blanco” (6,60,72).

Por otra parte, en aquellas cepas donde no hay alteraciones ni en el gen *katG* ni en el *inhA* pero resistencia al antifímico, deberán existir otros mecanismos alternos. La identificación de nuevas mutaciones en otro(s) gen(es) permitirá en un futuro el diagnóstico molecular de las cepas resistentes contribuyendo con los datos del laboratorio micobacteriológico. Finalmente, el desconocer el modo de acción de la INH sólo permite explicar parcialmente la forma en que las cepas resistentes a INH pueden adquirir esta resistencia (6,66,72).

4. Resistencia a rifampicina (RIF)

Las rifamicinas son un grupo de antibióticos macrocíclicos semejantes producidos por la especie *Streptomyces mediterranei*. La RIF es un derivado semisintético de una rifamicina, la rifamicina B (4).

Figura 3. Estructura química de la Rifampicina.



Introducida en 1967, la RIF constituye junto con la INH los fármacos más efectivos para el tratamiento de la TB. Al igual que la INH, no se debe administrar en regímenes monoterapéuticos ya que el número de microorganismos que adquieren resistencia es de uno por cada 10^7 - 10^8 . Este índice, más elevado en comparación con la INH, es el más alto entre los antifímicos de primera línea, por lo que se le puede considerar como un marcador de la presencia de cepas multirresistentes. Muy posiblemente, si existe resistencia a RIF, el(los) microorganismo(s) presentes ya han desarrollado también resistencia a los otros antifímicos (1,50).

A diferencia de la INH, la RIF es un antibiótico de amplio espectro, con alta actividad bactericida en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas; no es específico para *M. tuberculosis* ni para el género *Mycobacterium* y, su actividad es en contra de bacilos intra y extracelulares con un MIC de 0.005 a 0.2 µg/ml. (1,16,50).

La RIF se difunde rápidamente a través de la pared micobacteriana por su alta liposolubilidad y actúa al unirse a la enzima RNA polimerasa dependiente de DNA (RNA pol) bloqueando la transcripción, es decir, la síntesis de RNA. No presenta actividad en contra de la RNA polimerasa de mamíferos lo que explica su selectividad hacia procariotes. Sin embargo, si la elongación ya ha comenzado (formación del primer enlace fosfodiéster en el nascente RNA) la actividad de la enzima no se ve afectada. Lo anterior, ha permitido esclarecer parcialmente el modo de acción del fármaco (1,42,88).

La RNA pol es un complejo formado por cuatro subunidades diferentes (α , β , β' y σ) cada una, codificada por un gen diferente (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*, respectivamente). El sitio activo del complejo enzimático se encuentra en la subunidad β y es además el blanco de la RIF. De esta forma, la unión

del fármaco a la subunidad β causa un cambio conformacional en la proteína, lo que impide la unión de subsecuentes nucleótidos sintetizándose únicamente pequeños transcritos sin función. En el género *Mycobacterium*, así como en las especies *M. leprae* y *E. coli*, la resistencia a RIF resulta de una sola mutación en el gen *rpoB* (aunque existen reportes de cepas con dos mutaciones en el mismo gen), lo que lleva a la sustitución de aminoácidos claves de la estructura proteica de la enzima, impidiendo el modo de acción de la RIF por unión defectuosa con su “blanco” (48,58,88,89,96).

El gen *rpoB* es una región altamente conservada entre las especies de lento crecimiento (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. goodii*, y *M. szulgai*, entre otras), lo que apoya la teoría de que mutaciones en esta región son las responsables de la adquisición de resistencia. Como se mencionó previamente, las mutaciones halladas se han comparado con las encontradas en cepas de *E. coli* (primeramente) y *M. leprae*, siendo la mutación más reportada en la posición 531, donde se sustituye al aminoácido serina. Las mutaciones más frecuentemente asociadas con la resistencia a RIF se encuentran en una región corta de 27 codones cerca del centro del gen *rpoB*;

en esta región, se han reportado mutaciones puntuales, mutaciones sin sentido, deleciones del marco de lectura e incluso inserciones (16,39,88,89).

Se debe recordar que como el estudio inicial del gen *rpoB* se hizo en *E. coli*, las posiciones de las mutaciones encontradas se referirán en relación a la numeración de dicho gen en este microorganismo. El gen *rpoB* de *E. coli* y de *M. tuberculosis* muestran entre si una homología del 57 %; mientras que entre *M. leprae* y *M. tuberculosis* es del 93.3 %. Con esto en mente, primero se encontraron mutaciones que conferían resistencia a RIF en *E. coli*, luego se buscó su presencia y/o ausencia en *M. leprae*, y finalmente en *M. tuberculosis*. La mutación de la posición 531 se ha encontrado en los 3 microorganismos confiriéndoles resistencia (39,58,88).

Las mutaciones más frecuentemente encontradas en el gen *rpoB* y asociadas con la adquisición de resistencia a RIF se resumen en la tabla 4 (39,45,58,60,88,89,94).

Tabla 4. Principales mutaciones relacionadas con resistencia a RIF en el gen *rpoB*.

Posición	Aminoácido sustituido
531	Serina por leucina
531	Serina por otros a.a.
511	Leucina por prolina
533	Leucina por prolina
526	Histidina por tirosina
526	Histidina por ác. aspártico
526	Histidina por arginina
526	Histidina por otros a.a.
516	Ác. aspártico por tirosina
516	Ác. aspártico por valina
513	Glutamina por leucina
518	Delección
408 y 409	Inserción de lisina y fenilalanina

a.a.: aminoácidos

El desconocer la estructura tridimensional de la enzima no ha permitido conocer el sitio exacto de unión del antifímico en la subunidad β de la RNA pol: por lo que resulta imposible hasta el momento explicar la alta frecuencia de las otras mutaciones reportadas y su posible implicación molecular. Es decir, para comprender de forma completa el mecanismo de acción de la RIF se necesita conocer la estructura tridimensional de la RNA pol para de esta forma establecer exactamente lo que sucede a nivel molecular entre el fármaco y su sitio de unión. Mientras tanto, sólo es posible especular cómo la sustitución de ciertos aminoácidos por otros, resulten probablemente en un

impedimento estérico de la RIF por alcanzar su sitio de unión evitando su modo de acción (39,45).

Las mutaciones reportadas abarcan entre un 90 y 95 % de las cepas resistentes a RIF; sin embargo, se han encontrado cepas sin mutaciones en la región analizada lo que permite suponer la presencia de mecanismos alternos que también confieran resistencia. Es posible que algunos bacilos presenten mutaciones en regiones no analizadas y así la adquieran. Afortunadamente, este alto porcentaje permite la aplicación de técnicas de biología molecular basadas en PCR, directamente en esputo, para la identificación rápida y precisa de las cepas resistentes. A diferencia de la INH, donde al menos dos genes se ven involucrados en la aparición de resistencia, estas técnicas sólo mostrarían una eficacia del 75 al 78 % dando numerosos falsos negativos (37,45,60,88,89,94).

La identificación de cepas resistentes a RIF a nivel molecular, debe constituir una práctica rutinaria del laboratorio en base a la problemática desarrollada por la "nueva tuberculosis".

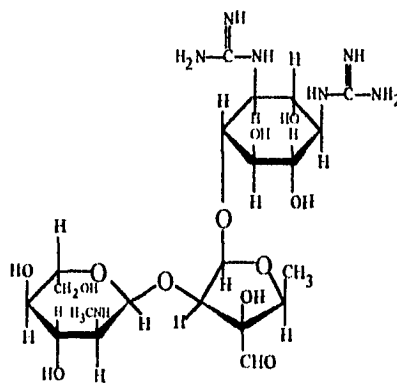
Finalmente, es posible que cambios en la permeabilidad de la membrana también permitan adquirir resistencia. En el complejo MAC, se ha reportado que no existe paso del fármaco a través de la membrana y, exclusivamente en el género *Mycobacterium*, se ha demostrado la inactivación de la RIF por mecanismos diferentes a glucosilación (por *Nocardia brasiliensis* en el grupo hidroxilo del carbono 23, ver figura 3) o fosforilación (por *N. otitidiscaviarum* en el grupo hidroxilo del carbono 21) del antibiótico. *M. smegmatis*, *M. flavescens*, *M. phlei* y *M. chelonae* (MNT de rápido crecimiento) inactivan el fármaco por ribosilación (primer reporte de este mecanismo en bacterias) del grupo hidroxilo del carbono 23 (19,20,42,48,88,96).

5. Resistencia a estreptomicina (Sm)

La Sm es producida por la especie *Streptomyces griseus* y corresponde a un antibiótico de amplio espectro, con acción contra bacterias Gram positivas y Gram negativas; se introdujo en 1944 como el primer fármaco efectivo para tratar la TB, si bien fue desplazada posteriormente por la INH y la RIF; no

obstante, se ha seguido empleando como parte de los regímenes multifármacos, sobre todo cuando se sospecha de que las cepas involucradas son resistentes a INH, RIF y/o pirazinamida (PZA) (1,50).

Figura 4. Estructura química de la Estreptomina



La Sm no muestra actividad en contra de los bacilos localizados intracelularmente, pero resulta bactericida para los extracelulares, a MIC's de 0.4 µg/mL. La aparición de cepas resistentes *in vitro* ocurre en uno de cada 10⁶ bacilos tuberculosos (1,50).

El modo de acción de la Sm y de los antibióticos relacionados -amikacina, gentamicina, kanamicina, entre otros- consiste en la inhibición de uno de los fenómenos biológicos más complejos: la síntesis de proteínas, concretamente a nivel de traducción. Entre los efectos que provoca la Sm destacan la inducción de errores durante la lectura del código genético y la inhibición de la traducción; de acuerdo con estudios realizados en *E. coli*, el sitio de unión del fármaco se localiza en los ribosomas, precisamente en la subunidad pequeña (30S), en un dominio específico localizado entre las posiciones 909 y 915 (numeración de *E. coli* equivalente a las posiciones 900 y 906 en *M. tuberculosis*) (10,24,55,59).

Las subunidades de los ribosomas se encuentran constituidas por diversas moléculas las cuales forman una estructura funcional y estructuralmente compleja: la subunidad 50S contiene una molécula de 5S rRNA, otra de 23S rRNA y 34 proteínas designadas desde L1 hasta L34 (L por "Large"). De manera similar, la subunidad pequeña (30S) consiste de una molécula de 16S rRNA y 21 proteínas denominadas S1 hasta S21 (S por "Small") (8,47).

En este sentido, la adquisición de resistencia se ha detectado precisamente en mutaciones del gen que codifica para la molécula 16S rRNA y en el que lo hace para la proteína S12. Cada una de las 55 proteínas mencionadas (L1 a L34 y S1 a S21) desempeña un papel crucial durante la síntesis de polipéptidos, ya sea funcionando como enzima, o bien, como un componente estructural; por ejemplo, las proteínas S4 y S12 aportan estabilidad a la subunidad 30S y las mutaciones que las involucran conducen a fallas en la traducción (2,10,47).

En resumen, los principales mecanismos relacionados con la adquisición de resistencia de *M. tuberculosis* a Sm son los siguientes:(10,16,30,37,60,62)

- A) Mutaciones en el gen *rrs*, que codifica para la síntesis del rRNA 16S.
- B) Mutaciones en el gen *rpsL*, que codifica para la síntesis de la proteína ribosomal S12.

Cabe mencionar que en diversos microorganismos se han reportado otros mecanismos de adquisición de resistencia a la Sm, destacando entre ellos la síntesis de una enzima que inactiva al fármaco (característica que reside en un plásmido o transposón de resistencia, inexistente en *M. tuberculosis*) y la

activación de un sistema de expulsión del antibiótico (observado principalmente en el género *Streptomyces*) (16).

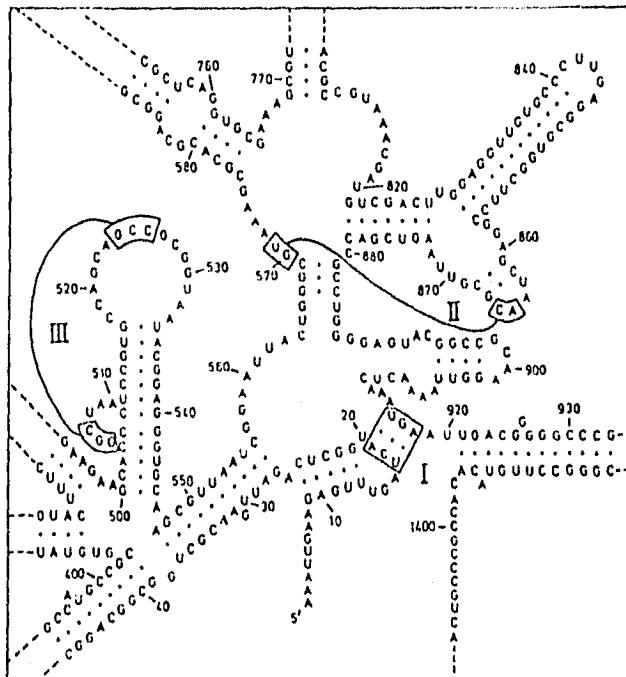
Como se mencionó anteriormente, la proteína ribosomal S12 le confiere estabilidad a una porción del rRNA que, a su vez, al plegarse (debido a interacciones ocurridas entre ciertas bases complementarias⁵), adquiere su funcionalidad al asumir una morfología altamente ordenada conocida como "pseudoknot"⁶. En particular, ésta se forma al plegarse los residuos 524 a 526 del rRNA 16S (conocido como el loop⁶ 530, secuencia GCC; consultar las figuras 5 y 6) con los residuos 505 a 507 (loop 510 secuencia complementaria CGG) de la misma molécula. El loop 530 es precisamente el sitio de unión entre la subunidad 16S y la proteína S12 (30,56,64).

Los estudios efectuados en *E. coli* han mostrado que el pseudoknot resultante posee una actividad funcional muy importante en la síntesis de proteínas. Se relaciona con la interacción codón-anticodón, durante la traducción del

⁵ Las bases complementarias que componen al DNA son: Guanina-Citosina y Adenina-Timina; en el RNA, la base pirimídica Timina es sustituida por Uracilo, con la consecuente complementariedad Adenina-Uracilo.

⁶ Su traducción al castellano deriva en palabras inusuales en el área bioquímica.

Figura 5. Estructura secundaria de la molécula rRNA 16S de *E. coli*. Las regiones agrupadas en cuadros representan aquellas que pueden formar "pseudoknots" (posiciones 20-920, 570-865 y 530-510).



código genético. A este respecto, se ha comprobado que la Sm se une a ciertas regiones de este pseudoknot, por lo que las mutaciones que suceden en las regiones que se “pliegan”, o bien, en la proteína S12, podrían derivar en la adquisición de resistencia al fármaco en cuestión (2,56,64).

Las mutaciones en el gen *rrs* (que confieren resistencia a Sm) alteran específicamente las regiones que forman al pseudoknot; de hecho, la inestabilidad de esta estructura (y su funcionalidad) se puede recuperar mediante la sustitución de ciertas bases⁷ a través de mutaciones puntuales (consultar la figura 7) (24,55,56,59).

Las mutaciones encontradas más frecuentemente en el gen *rrs* se resumen en la tabla 5 (10,24,30,40,41,55,59,60).

⁷ Las proteínas sólo derivan de la traducción de los mRNA. Las copias génicas que conforman el rRNA sirven, junto con las proteínas mencionadas, para constituir a los ribosomas.

Figura 7. Estructura secundaria de la molécula rRNA 16S de *M. tuberculosis*. Las posiciones donde se han observado mutaciones asociadas a la adquisición de resistencia a Sm se encuentran señaladas con círculos.

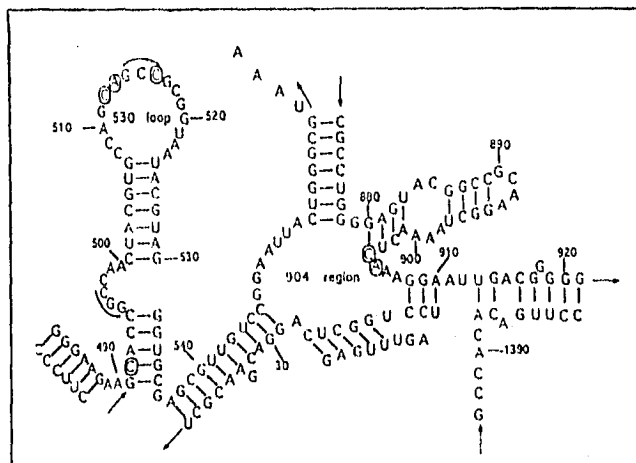


Tabla 5. Principales mutaciones relacionadas con resistencia a Sm en el gen *rrs*.

Posición ¹	Base sustituida
491	Citosina por uracilo
512	Citosina por uracilo
513	Adenina por citosina
513	Adenina por tirosina
516	Citosina por uracilo
866	Adenina por guanosina
903	Citosina por uracilo
904	Adenina por guanosina
904	Adenina por citosina
512 y 513	Inserción de citosina

CLAVE: ¹ = La numeración corresponde al gen *rrs* de MTB

Cabe mencionar que todas aquellas mutaciones asociadas a resistencia a Sm en *M. tuberculosis* también han sido observadas en *E. coli*. No obstante, en esta última especie y en eucariontes se han encontrado entre 7 y 9 juegos de genes *rrs*, en tanto que en las micobacterias de lento crecimiento sólo existe una copia única; de lo anterior se infiere que, mientras en *E. coli* debe pasar cierto número de generaciones para obtener el fenotipo resistente, en *M. tuberculosis* éste se presenta en cuanto ocurre la mutación correspondiente (24,56,86).

Por lo que se refiere a la proteína S12 (formada por 124 aminoácidos), ésta se encuentra altamente conservada tanto en *M. tuberculosis* como en las MNT; de hecho, la homología que existe entre las proteínas S12 de *M. tuberculosis*, *E. coli* y *S. typhimurium* es del 70 %, y dicha cifra es de alrededor del 97 % cuando se comparan *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* y *M. szulgai* (40,61,62).

Las mutaciones encontradas más frecuentemente en el gen *rpsL* (que codifica para la síntesis de la proteína S12) de *M. tuberculosis* se resumen en la tabla 6 (10,30,40,55,60,62).

Tabla 6. Principales mutaciones relacionadas con resistencia a Sm en el gen *rpsL*.

Posición ¹	Aminoácido sustituido
43	Lisina por arginina
43	Lisina por treonina
88	Lisina por arginina
88	Lisina por glutamina

CLAVE: ¹ = La numeración corresponde al gen *rpsL* de *M. tuberculosis*

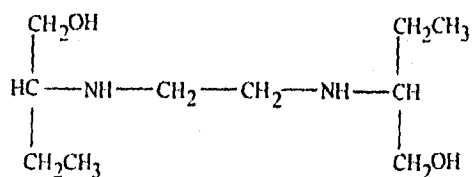
La Sm no se une a la proteína S12, sino sólo a ciertas regiones de la molécula rRNA 16S, alterando la estabilidad del pseudoknot y, por ende, inhibiendo la síntesis de proteínas. Las mutaciones asociadas a resistencia a la Sm en la proteína S12 permiten que el pseudoknot conserve su estabilidad y funcionalidad, aún cuando el antibiótico se fije a su "blanco" (9,30,64).

De manera similar a lo señalado para la RIF, se han encontrado cepas resistentes a Sm sin alteraciones en los genes *rrs* y *rpsL*, por lo que se puede suponer la existencia de otro(s) mecanismo(s) que conduzcan a la adquisición de resistencia a Sm; así, no se pueden descartar cambios en la permeabilidad de la membrana o alteraciones en otras zonas del ribosoma (10,30,37,40).

6. Resistencia a etambutol (EMB)

Este antifímico fue introducido en 1961 y su actividad en contra de *M. tuberculosis* es tuberculoestática. De manera similar a la INH, el EMB muestra actividad exclusiva en contra del género *Mycobacterium*, principalmente de aquellas especies de lento crecimiento, entre las que destacan *M. tuberculosis*, *M. avium* y *M. intracellulare*; cabe subrayar que su uso se ha restringido a regímenes terapéuticos en los que se administra como acompañante de los antifímicos previamente discutidos, con la finalidad de retrasar el surgimiento de cepas resistentes (1,50).

Figura 8. Estructura química del Etambutol



El EMB es activo contra *M. tuberculosis* a MICs de entre 1 y 5 µg/ml.; la aparición de cepas resistentes se calcula de uno de cada 10^5 bacilos tuberculosos. El modo de acción del EMB no ha sido elucidado de manera convincente, existiendo diversas hipótesis; entre éstas se encuentran las que establecen la inhibición de la síntesis de RNA, del arabinogalactano, de ácidos micólicos y del metabolismo de fosfolípidos. De todas las antes mencionadas, la más aceptada y mejor fundamentada es la que sugiere que ocurre la inhibición específica de la síntesis de arabinogalactano (AG), un importante componente de la pared celular micobacteriana; sin duda, esta teoría se encuentra apoyada por la alta especificidad del fármaco contra el género (1,42,73,74,87).

La pared celular micobacteriana se encuentra constituida por numerosos ácidos micólicos unidos covalentemente al AG, que a su vez lo está a otro componente estructural, el peptidoglicano. En este sentido, es claro que la inhibición de la síntesis del AG conduciría a una estructura alterada y, como consecuencia, a la muerte celular; además, hacia el exterior de la pared celular, se encuentran numerosos lípidos unidos a los ácidos micólicos o al

lipoarabinomanano (LAM). En este sentido, independientemente de que las cepas resistentes a EMB muestran alteraciones en la síntesis del AG, también evidencian que ocurre la polimerización final tanto de este último como del LAM (17,21,57).

No obstante lo antes mencionado, aún se considera que las bases moleculares de adquisición de resistencia al EMB son prácticamente desconocidas, si bien se acepta que mutaciones en los genes asociados a las enzimas involucradas en la biosíntesis del AG dan lugar al fenotipo resistente. Ciertos autores han mencionado posibles implicaciones de la pared celular micobacteriana y el fenotipo resistente a EMB, ya que han observado diferencias en la composición de los fosfolípidos de superficie en cepas susceptibles, respecto a las resistentes; este mecanismo también debe tomarse entre los que se establecen como probables. De hecho, es probable y lógico que algunos cambios en la composición de la pared celular originen la formación de barreras de permeabilidad que impidan el acceso del EMB (y de otros antifímicos) hacia su zona blanco (16,42,74).

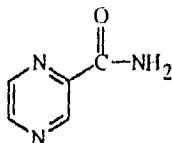
ESTADO DE GUATEMALA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
INSTITUTO GINECO OBSTETRICIA

Finalmente, cabe señalar que los estudios realizados para intentar descubrir el sitio de acción del EMB se han realizado en *M. smegmatis*, por lo que si bien se ha demostrado la implicación de la síntesis del AG, es probable que este mecanismo pudiera no ocurrir en *M. tuberculosis* y otras especies (73,87).

7. Resistencia a pirazinamida (PZA)

La PZA es un análogo sintético de la nicotinamida que muestra una alta actividad bactericida en contra de *M. tuberculosis* y *M. microti* pero resulta inocuo para otras especies del género. El uso de este antifímico se introdujo en 1949 y se ha venido empleando desde entonces en regímenes terapéuticos cortos (sólo durante los primeros 3 o 4 meses del tratamiento), dada su actividad bactericida y porque sólo actúa a pH's ácidos (de 5.0 y 5.5) lo que lo hace altamente específico en contra de los bacilos tuberculosos intracelulares (que encuentran tales condiciones dentro de los macrófagos) (1,42,50).

Figura 9. Estructura química de la Pirazinamida



La MIC relacionada con la PZA es de 12.5 µg/mL y, al igual que sucede con el EMB, el mecanismo de acción de aquél no se ha logrado establecer; sin embargo, al parecer la PZA es un pro-fármaco que dentro del bacilo tuberculoso se transforma en un compuesto tóxico; muy probablemente el ácido pirazinoico (POA), que posee la actividad bactericida. La formación de este supuesto compuesto tóxico (POA) sería catalizada por una amidasa (pirazinamidasas), producida y contenida por *M. tuberculosis*. Se ha observado que generalmente (pero no siempre) las cepas resistentes a este antifímico disminuyen la actividad de la pirazinamidasas pero aún hay dudas de que exista una relación directa entre el grado de susceptibilidad y la pérdida de tal actividad enzimática (1,13,50,84).

De hecho, el desconocimiento del modo de acción de la PZA ha impedido explicar la adquisición de resistencia a dicho fármaco; inclusive, la única teoría que se maneja ha quedado en entredicho, ya que existen cepas que son resistentes pero muestran actividad enzimática y, además, no se ha caracterizado ni aislado a la pirazinamidasasa para realizar estudios que la asociaran a las cepas resistentes; a este respecto, es posible que la síntesis de la enzima no tuviera relación alguna con el fenómeno y que sólo se tratara de una característica fenotípica coincidente (13,34,84).

De hecho, el desconocimiento del modo de acción de la PZA ha impedido explicar la adquisición de resistencia a dicho fármaco; inclusive, la única teoría que se maneja ha quedado en entredicho, ya que existen cepas que son resistentes pero muestran actividad enzimática y, además, no se ha caracterizado ni aislado a la pirazinamidasasa para realizar estudios que la asociaran a las cepas resistentes; a este respecto, es posible que la síntesis de la enzima no tuviera relación alguna con el fenómeno y que sólo se tratara de una característica fenotípica coincidente (13,34,84).

IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

1. Muestras a analizar

Por lo regular, las muestras más utilizadas para el diagnóstico de laboratorio de la TB pulmonar son las expectoraciones. En este sentido, se solicitan 3 muestras a cada paciente, a razón de una diaria, previa instrucción por parte del laboratorio, a fin de que los especímenes sean recolectados adecuadamente, en cantidades que rebasen los 10 mL y depositados en los recipientes estériles que se proporcionan para tal efecto (14,83).

2. Procesamiento de las muestras de expectoración: descontaminación, fluidificación y concentración

Por lo general, se transfieren cerca de 10 mL de cada muestra a tubos de centrifuga de 50 mL, estériles, con tapón de rosca, a los cuales después se agregan aproximadamente 10 mL de solución estéril digestivo-mucolítica de NALC-NaOH preparada de la siguiente manera: 50 mL de NaOH al 4 % + 50

mL de citrato trisódico al 2.9 % + 0.5 g de N-acetil L-cisteína. Los tubos se cierran herméticamente, se agitan en vórtex durante 20 segundos y se permite que reposen por 15 minutos, a temperatura ambiente, a fin de que ocurra la descontaminación correspondiente. Transcurrido dicho tiempo, se adiciona amortiguador de fosfatos pH = 6.8 hasta llegar a cerca de 1.5 cm por debajo de la boca del tubo y se procede a centrifugar a baja temperatura, a 3,000 x g durante 20 minutos. Posteriormente, se decanta el sobrenadante en un recipiente con hipoclorito sódico al 4 % y se agregan a cada sedimento 2 mL del amortiguador antes mencionado, con lo cual, previa homogeneización por agitación, se obtiene el inóculo inicial (INOC-1) (14,33,63,93).

3. Baciloscopia

Una vez obtenido el INOC-1, se preparan extensiones teñidas por la técnica de Ziehl Neelsen, las cuales se observan a inmersión, a fin de establecer la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) y, de ser el caso, intentar semicuantificarlos. Para lograr esto último, la suspensión se recoge con una asa calibrada y se extiende en una área de 1 x 3 cm del portaobjetos

correspondiente, mismo que debe ser nuevo (para evitar que las eventuales rayaduras se confundan con los BAAR). Por último, la interpretación del frotis se basa en los criterios resumidos en la tabla 7 (14,63).

Tabla 7. Clasificación de las extensiones teñidas por Ziehl Neelsen, preparadas a partir del sedimento asociado al procesamiento de la expectoración.

No. de BAAR	Clasificación
1 a 2 por 300 campos	Dudoso → repetir
1 a 9 por 100 campos	1+
1 a 9 por 10 campos	2+
1 a 9 por campo	3+
más de 9 por campo	4+

4. Aislamiento e identificación del agente causal

A partir del INOC-1 se siembran, con una jeringa estéril de insulina, 2 tubos de Lowenstein Jensen, a razón de 0.5 mL en cada uno y se incuban a 37°C, en atmósfera de 5 a 10 % de CO₂, durante 15 a 25 días (los primeros 7 de ellos en posición inclinada, a fin de que el inóculo se extienda lo mejor posible sobre la superficie del pico de flauta). Una vez que se detecta la presencia de colonias típicas del complejo *M. tuberculosis* (grandes, de color amarillo claro mate y aspecto granular), se verifica microscópicamente que se encuentren conformadas por BAAR y que no contengan contaminantes, con lo cual se

pueden someter a las siguientes pruebas bioquímicas de identificación: acumulación de niacina, reducción de nitratos y catalasa termoestable, las cuales son, respectivamente: positiva, positiva y negativa para *M. tuberculosis* en tanto que, para *M. bovis* y *M. africanum*, las 3 resultan negativas (14,63,83).

5. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El reciente desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y su aplicación en la detección de patógenos microbianos ha venido transformando la práctica diagnóstica de las enfermedades infecciosas en los laboratorios de todo el mundo (5,25,91).

Evidentemente, la muestra (o espécimen) debe ser representativa del proceso patológico y su cantidad ha de resultar suficiente para un examen completo.

Además, con el advenimiento del SIDA, el personal debe considerar cualquier muestra biológica como potencialmente infecciosa y tomar las medidas adecuadas de protección. Dichas muestras incluyen expectoraciones, aspirados

transtraqueales, biopsias diversas, sangre, productos sanguíneos, semen, secreciones vaginales, LCR o líquidos sinovial, pleural, peritoneal y amniótico, entre algunos otros (32,70).

En ocasiones, se requiere un procesamiento más amplio del espécimen, a fin de asegurar la lisis del patógeno en estudio y, por ende, para que se libere el DNA genómico a amplificar por PCR (70).

En este sentido, destacan la lisis bacteriana por congelamiento-descongelamiento o por congelamiento y ebullición. la ebullición con Chelex 100, la extracción con fenol:cloroformo y precipitación en etanol, o bien, la extracción salina y precipitación en etanol (32,52,70).

El método de amplificación de DNA por PCR fue concebido en 1983 por el Dr. Kary B. Mullis, del Departamento de Genética Humana de la Corporación Cetus, y tiene como base general el hecho de que, a partir de una molécula de DNA, la PCR puede generar cien mil millones de copias en una sola tarde (5,70,91).

La amplificación de DNA por PCR corresponde a una reacción enzimática ejecutada por la DNA polimerasa (comúnmente *Taq* DNA pol I). Todas las DNA polimerasas catalizan la formación de un enlace fosfodiéster entre el 3'-OH en el extremo creciente de la cadena de DNA (el iniciador) y el grupo 5'-PO₄ del desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) entrante (70,91).

Cada nucleótido entrante está determinado por el DNA molde, al cual el iniciador debe estar unido por complementariedad de bases a su extremo 3'-OH. Aunque todas las DNA polimerasas catalizan la misma reacción enzimática, pueden diferir en forma significativa en cuanto a sus condiciones óptimas de reacción; esto es especialmente cierto para la *Taq* DNA pol I cuya temperatura óptima es 75°C (91).

La amplificación de DNA se logra mediante ciclos repetidos de PCR, cada uno de los cuales tiene 3 etapas distintivas de temperatura: (1) desnaturalización del DNA molde entre los 94° y 96°C; (2) alineamiento de los iniciadores al molde entre los 42° y 60°C; (3) extensión de los iniciadores por la DNA polimerasa, entre los 60° y 72°C (70,91).

La reacción de amplificación contiene 2 iniciadores, dispuestos de tal forma que se hibridan a hebras opuestas de la secuencia blanco; cada iniciador se orienta para que la elongación de su extremo 3'-OH se superponga a través de la zona entre ambos iniciadores, hasta la región homóloga al otro iniciador. Como cada producto de extensión incluye la secuencia complementaria al otro iniciador, el producto de cada reacción sirve de molde para el siguiente ciclo de PCR, en una forma de reacción bioquímica en cadena (70,91).

En la primera etapa del primer ciclo de PCR, el DNA molde se mezcla con un exceso de ambos iniciadores de la amplificación, a continuación ocurre la desnaturalización entre 94° y 96°C. En la segunda etapa del primer ciclo, la mezcla de reacción se lleva a la temperatura óptima de alineamiento iniciador-molde. Finalmente, en la tercera etapa, la temperatura se modifica a 72°C, ligeramente inferior a la óptima de la Taq DNA pol I, pero no tan alta como para derretir a los iniciadores y moldes alineados (70).

Los iniciadores se elongan para producir nuevas hebras de DNA (a partir de cada molde), cada uno con un extremo 5' discreto (determinado por la secuencia del iniciador) y un extremo 3' indefinido, denominado "producto

largo". Este producto largo se seguirá produciendo a partir del molde original durante cada ciclo de PCR, pero su incremento será lineal (5,53).

Una secuencia "blanco" óptima debe tener un largo de 150 a 500 pares de bases (bp, por sus siglas en inglés), sin embargo, longitudes entre 100 y 2,000 bp son susceptibles de amplificarse en forma eficiente. Evidentemente, es preferible que dicha secuencia sea única, para evitar la competencia de moldes no deseados (70).

Una de las características ideales de los iniciadores para PCR es una longitud del oligonucleótido entre 15 y 25 bp. La temperatura de fusión DNA molde-iniciador (T_m), utilizada para la fase de alineamiento, se calcula con base en el contenido total de GC y AT de los iniciadores mediante la fórmula: $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$ (70).

Los protocolos originales de PCR se desarrollaron utilizando DNA pol I de *E. coli*; dicha enzima presentaba actividad de exonucleasa en dirección 5'→3' pero, al no ser termoestable, se inactivaba durante la fase de desnaturalización, debiéndose añadir más enzima antes de la etapa de alineamiento. Este hecho,

combinado con la baja temperatura requerida para la elongación, daba lugar a una reacción de baja eficiencia y especificidad (70,91).

En tal contexto, un descubrimiento técnico de gran importancia para la PCR fue el reemplazo de la DNA pol I de *E. coli* por una serie de DNA polimerasas termoestables. La primera de estas enzimas en ser utilizada fue la Taq DNA polimerasa I (*Taq pol I*), obtenida de la bacteria Gram-negativa *Thermus aquaticus* (70,91).

La *Taq pol I* altamente purificada tiene una temperatura óptima de 70° a 80°C con una Vmax próxima a los 180 nucleótidos/segundo/molécula de enzima (nt/s), cifra que supera a los 16 a 20 nt/s de la *E. coli* DNA pol I (70).

Evidentemente, la síntesis de DNA requiere desoxirribonucleótidos trifosfato libres (dNTPs): dATP, dGTP, dCTP y dTTP, mismos que se utilizan en concentraciones equivalentes, a fin de minimizar los errores en la incorporación. Del mismo modo, otros de los ingredientes importantes en la reacción son: el ión Mg^{2+} (ya que su concentración afecta el alineamiento de los iniciadores, la temperatura de fusión del DNA y la actividad enzimática de la *Taq* DNA pol I), gelatina -estéril- o albúmina sérica bovina (para estabilizar

la actividad de la enzima) junto con detergentes no iónicos como el *Tween 20* o el *Laureth 12* (0.05-0.1%), un cosolvente como el dimetilsulfóxido y glicerol al 5-20 % (que incrementa el rendimiento de la reacción de amplificación para fragmentos de DNA molde mayores a 2.5 kbp) (5,70).

El análisis por PCR permite detectar con una elevada sensibilidad y especificidad, a diversos patógenos presentes en las muestras clínicas. Evidentemente, cada vez son más numerosos los reportes que difunden las ventajas asociadas a esta metodología entre las cuales destaca la reducción del tiempo de identificación del agente etiológico, en relación con el cultivo convencional. Por lo que respecta a la TB, la PCR aporta resultados en un día, lo cual contrasta con el estándar clásico: el cultivo, que tarda entre 2 y 4 semanas (11,25,32,46,52).

Linton diseñó un método de amplificación al azar, con un subsecuente análisis del polimorfismo del DNA amplificado (RAPD, por sus siglas en inglés), que ha revolucionado la agilidad y confiabilidad de los estudios asociados a la TB. De hecho, el autor diferenció con éxito 14 cepas distintas en aproximadamente 8 h; no obstante, la principal ventaja del método de RAPD reside en que no requiere del conocimiento genético previo del microorganismo "blanco" (49).

V. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LAS DROGAS ANTITUBERCULOSAS

1. Aspectos generales

Por lo regular se realiza alguna de las 2 técnicas más utilizadas: el método radiométrico y el de las proporciones por elución en tubo; ambas suelen emplearse como pruebas directa e indirecta, es decir, se llevan a cabo a partir tanto del INOC-1 (la suspensión del sedimento asociado al procesamiento de la expectoración) como de una suspensión del cultivo puro obtenido en Lowenstein Jensen (INOC-2), mismo que se prepara de la siguiente manera: las colonias obtenidas se trasladan a un tubo que contenga solución salina isotónica (SSI) estéril y el contenido resultante se homogeneiza y se ajusta a aproximadamente a 1 mg/mL de biomasa, llevándolo a una densidad óptica de 1.5 a 2 a 650 nm en un espectrofotómetro (33,35,42).

2. Método radiométrico

Se adicionan 0.1 mL del INOC-2 a un vial que contenga 4 mL de medio 12B (7H12a) y se haya estabilizado de manera que en su interior se encuentre un ambiente de 5 % de CO₂; se incuba a 37°C hasta que se obtiene un índice de crecimiento (IC) \geq 500. Este cultivo se utiliza como inóculo particular (INOC-RADIO), a partir del cual se siembran los viales restantes con medio 12B (el "vial control" y los que contienen a los diferentes antifímicos) (14,42,63).

Previo a la inoculación de los viales 12B, se preparan las soluciones de los agentes antituberculosos a probar, de manera que alcancen la concentración crítica en los medios; la tabla 8 indica las concentraciones críticas de los fármacos de primera línea que se prueban por el método radiométrico (14,33,67,83).

Tabla 8. Concentraciones críticas de las drogas antituberculosas de primera línea, para las pruebas de susceptibilidad realizadas por el método radiométrico.

FÁRMACO	CONCENTRACIÓN CRÍTICA ($\mu\text{g/mL}$)
Isoniacida	0.2
Estreptomina	2.0
Estreptomina	6.0
Rifampicina	2.0
Etambutol	2.5
Etambutol	7.5

Una vez que se han adicionado los antifímicos a sus respectivos viales 12B, los 6 que contienen su droga específica a la concentración final señalada en la tabla 8, se inoculan, cada uno con 0.1 mL de INOC-RADIO; por lo que hace al vial control (que se encuentra exento de cualquier fármaco), también se inecula con 0.1 mL, pero a partir de una dilución 1:100 de INOC-RADIO (empleando el fluido diluyente que se proporciona junto con el equipo comercial); la incubación de los 7 viales se lleva a cabo a 37°C, en 5 % de CO₂, de 4 a 12 días, hasta que el IC del vial control sea ≥ 30 . Las lecturas de IC de la totalidad de los viales deberán efectuarse diariamente, para obtener los ΔIC y determinar si la cepa nuestra resistencia hacia alguna droga de primera línea (33,42,67).

En cuanto a la prueba directa, las únicas diferencias que tienen lugar - respecto a lo antes mencionado- son las siguientes: **a)** La adición de un complejo de antibióticos: PANTA (50 U/mL de Polimixina B, 5 mg/mL de anfotericina B, 20 mg/mL de ácido nalidíxico, 5 mg/mL de trimetoprim y 10 mg/mL de azlocilina), a los 7 viales, independientemente de sus respectivos contenidos -a fin de evitar el desarrollo de las bacterias contaminantes que pudieran sobrevivir al proceso de digestión de las expectoraciones-; **b)** Sólo para el caso de que se hayan observado muy pocos o ningún BAAR en la extensión del sedimento asociado al procesamiento de la expectoración, la inoculación del vial control a partir de una dilución 1:10 de INOC-RADIO (en lugar de la 1:100) (14,33,67,83).

3. Método de las proporciones por elución en disco

Los discos impregnados con la concentración adecuada de droga antituberculosa, necesaria para alcanzar la concentración crítica en el agar Middlebrook 7H11, se distribuyen comercialmente; de esta manera, cada uno se coloca en el fondo de la placa, centrado respecto a su respectivo cuadrante y, posteriormente, se vacían 5 mL del medio mencionado en cada cuadrante:

una vez que el agar solidifica, se dejan las placas durante toda la noche a 25°C, a fin de que cada droga difunda regularmente en el medio, alcanzando la concentración crítica que se pretende. A continuación se depositan 100 µL del inóculo sobre la superficie del agar contenido en cada cuadrante (destinando un total de 4 cajas de Petri para el INOC-1 y otras tantas para el INOC-2) y se distribuyen con ángulos de vidrio estériles. Las diluciones, controles, discos y concentraciones finales relacionados con cada cuadrante se señalan en la tabla 9 (35,42).

Finalmente, se realiza la incubación correspondiente y se procede a cuantificar las UFC, a fin de detectar la resistencia o susceptibilidad de la cepa en turno, hacia los fármacos antituberculosos probados (14,33,35,42).

Tabla 9. Concentraciones críticas relacionadas con las pruebas de susceptibilidad a fármacos antituberculosos, por el método de las proporciones con elución en placa.

Caja de Petri y dilución del inóculo*	Cuadrante	Droga o control	µg de droga por disco	µg/mL finales de droga en el agar
1 - 1:100	I	CONTROL 1	---	0
1 - 1:100	II	Isoniacida	1	0.2
1 - 1:100	III	Isoniacida	5	1.0
1 - 1:100	IV	Rifamicina	5	1.0
2 - 1:100	I	CONTROL 2	---	0
2 - 1:100	II	Estreptomina	10	2.0
2 - 1:100	III	Estreptomina	50	10.0
2 - 1:100	IV	Etambutol	25	5.0
3 - 1:1000	I	CONTROL 3	---	0
3 - 1:1000	II	Isoniacida	1	0.2
3 - 1:1000	III	Isoniacida	5	1.0
3 - 1:1000	IV	Rifamicina	5	1.0
4 - 1:1000	I	CONTROL 4	---	0
4 - 1:1000	II	Estreptomina	10	2.0
4 - 1:1000	III	Estreptomina	50	10.0
4 - 1:1000	IV	Etambutol	25	5.0

* = Se emplean 4 placas para realizar pruebas de susceptibilidad a partir del sedimento asociado al procesamiento de la expectoración (INOC-1) y otras 4 para someter a la suspensión de colonias puras de la cepa implicada (INOC-2).

CONCLUSIONES

1. La "nueva tuberculosis" es producto de la mayor virulencia de las cepas involucradas, de la elevada frecuencia de cepas multirresistentes y de la progresiva pandemia de SIDA.
2. La "nueva tuberculosis" marca el resurgimiento de la enfermedad en los países desarrollados y su persistencia en el tercer mundo.
3. La aparición de resistencia en *M. tuberculosis* es consecuencia exclusiva de alteraciones que ocurren en el genoma micobacteriano y no reside en plásmidos y/o transposones.
4. Las técnicas moleculares constituyen una adecuada alternativa para diferenciar cepas multirresistentes de *M. tuberculosis*; no obstante, aquéllas deben complementarse con las metodologías tradicionales.

5. Las medidas de control y tratamiento de la “nueva tuberculosis” deben contemplar el establecimiento de nuevos esquemas terapéuticos, el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos y la incorporación del RAPD-PCR al diagnóstico de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Alford R.H. 1990. Antimycobacterial agents, p. 350-360. In G.L. Mandell (ed), R.G. Douglas Jr. and J.E. *Principles and practices of infectious diseases*. Bennett. Churchill Livingstone. New York
- 2) Allen, P.N., and Noller, H.F. 1989. Mutations in ribosomal proteins S4 and S12 influence the higher order structure of 16S ribosomal RNA. *J Mol Biol.* **208**(3): 457-468
- 3) Altantirano M., J. Marostenmaki, A. Wong, M. FitzGerald, W.A. Black and J.A. Smith. 1994. Mutations in the Catalase-Peroxidase Gene from Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *J Infec Dis.* **169**:1162-1165
- 4) Arara S.K., and P. Arjunan. 1992. Molecular structure and conformation of rifamycins, a potent inhibitor of DNA-dependent RNA polymerase. *J Antibiot.* **45**(3):428-431
- 5) Ausubel F.M., R. Brent, R.E. Kingston, et al (eds). 1994. The Polymerase Chain Reaction. In *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc. U.S.A.
- 6) Banerjee A., E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K. Sun Um, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle and W.R. Jacobs Jr. 1994. *inhA*, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* **263**:227-230
- 7) Bloom, B.R., and C.J.L. Murray. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* **257**:1055-1064
- 8) Bohinski R. 1991
Bioquímica.
Addison-Wesley-Iberoamericana.
5a ed.

- 9) Bohmann K., Ruusala T., Jelenc P.C., and Kurland C.G. 1984. Kinetic impairment of restrictive streptomycin-resistant ribosomes. *Mol Gen Genet.* **198**: 90-99
- 10) Böttger E.C. 1994. Resistance to drugs targeting protein synthesis in mycobacteria. *Trends Microbiol.* **2**(10): 416-421
- 11) Brisson-Noel A., B. Giequel, D. Lecossier, V. Levy-Frebault, X. Nassif and A.J. Hance. 1989. Rapid Diagnosis of Tuberculosis by Amplification of Mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet.* **4**:1069-1071
- 12) Brock T. D., Smith D.W. and Madigan M. T. 1987
 Microbiología
 Prentice-Hall. México
 4a ed
 p. 388-411
- 13) Butler, R.W. and J.O. Kilburn. 1983. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide and its relationship to pyrazinamidase activity. *Antimicrob Ag Chemother.* **24**(4):600-601
- 14) Cernoch P.L., Enns R.K., Saubolle M.A. and Wallace R.J., 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., Weissfeld A.S., American Society for Microbiology, Washington D.C.
- 15) Cockerill III F.R., J.R. Uhl, Z. Temesgen, Y. Zhang, L. Stockman, G.D. Roberts, D.L. Williams and B.C. Kline. 1995. Rapid Identification of a Point Mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (*katG*) Gene Associated with Isoniazid Resistance. *J Infect Dis.* **171**:240-245
- 16) Cole S.T. 1994. *Mycobacterium tuberculosis*: drug-resistance mechanisms. *Trends Microbiol.* **2**(10): 411-415

- 17) Connell N.D., and Nikaido H. 1994. Membrane Permeability and Transport in *Mycobacterium tuberculosis*, p.333-352. In B. R. Bloom (ed), *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. American Society for Microbiology, Washington, DC
- 18) Crawford, J. T., and J.O. Falkinham III. 1990. Plasmids of the *Mycobacterium avium* complex, p. 97-119. In J. McFadden (ed), *Molecular Biology of the Mycobacteria*. Harcourt Brace Jovanovich Publishers, London
- 19) Dabbs E.R. 1987. Rifampicin inactivation by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**(3):395-399
- 20) Dabbs E.R., K. Yazawa, Y. Mikami, M. Miyaji, N. Morisaki, S. Iwasaki and K. Furihata. 1995. Ribosylation by Mycobacterial Strains as a New Mechanism of Rifampin Inactivation. *Antimicrob Ag Chemother.* **39**(4):1007-1009
- 21) Deng, L., K. Mikusová, K.G. Robuck, M. Scherman, P.J. Brennan and M.R. McNeil. 1995. Recognition of Multiple Effects of Ethambutol on Metabolism of Mycobacterial Cell Envelope. *Antimicrob Ag Chemother.* **39**(3): 694-701
- 22) Deretic Y., Philipp W., Dhandayuthapani S., Mudd M.H., Curcic R., Garbe T., Heym B., Via L.E., and Cole S.T. 1995. *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. *Mol Microbiol.* **17**(5): 889-900
- 23) Dessen, A., A. Quémard, J.S. Blanchard, W.R. Jacobs Jr, and J.C. Sacchettini. 1995. Crystal Structure and Function of the Isoniazid Target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* **267**: 1638-1641
- 24) Douglass J. and L.M. Steyn. 1993. A Ribosomal Gene Mutation in Streptomycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *J Infect Dis.* **167**(6): 1505-1506

- 25) Eisenach K.D., M.D. Cave, and J.T. Crawford. 1993. PCR Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In Persing D.H., Tenover F., White T.J., Smith T.F. (ed), *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 26) Ellner J.J., Hinman A.R., Dooley S.W., Fischl M.A., Sepkowitz K.A., Goldberger M.J., Shinnick T.M., Iseman M.D. and Jacobs W.R.1993. Tuberculosis symposium: emerging problems and promise. *J Infect Dis.* **168**: 537-551.
- 27) Falkinham III J. O., and J.T. Crawford. 1994. Plasmids, p. 185-198. In B. R. Bloom (ed), *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. American Society for Microbiology, Washington, DC
- 28) Ferrazoli L., M. Palaci, M.A. da Silva, S. Yoko, A. Kritski. L.R. Macelloni, O.C. Ferreira and L.W. Riley. 1995. Catalase Expression, *katG*, and MIC of Isoniazid for *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from São Paulo, Brazil. *J Infect Dis.* **171**:237-240
- 29) Ferreira G.E.E. y Velázquez M.O. 1993. Tuberculosis en México: otro emisario del pasado. *Boletín Mensual Epidemiología.* **8**(7): 97-103.
- 30) Finken M., P. Kirschner, A. Meier, A. Wrede and E.C. Böttger. 1993. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol.* **9**(6): 1239-1246
- 31) Frieden T.R., Sterling T., Pablos-Méndez A., Kilburn J.O., Cauthen G.M. and Dooley S.W.1993. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *New Eng J Med.* **328**(8): 521-526.
- 32) Hawkey P.M. 1994. The role of polymerase chain reaction in the diagnosis of mycobacterial infections. *Rev Med Microbiol.* **5**(1):21-32

- 33) Hawkins J.E., Wallace R.J., and Brown B.A. 1991. Antibacterial susceptibility tests: Mycobacteria, p. 1138-1152. In Balows A, Hausler W.J., Herrmann K.L., Isenberg H.D. and Shadomy H.J. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th edition. American Society of Microbiology, Washington, DC
- 34) Heifets, L.B., M.A. Flory and P.J. Lindholm-Levy. 1989. Does pyrazinoic acid as an active moiety of pyrazinamide have specific activity against *Mycobacterium tuberculosis*? *Antimicrob Ag Chemother*. **33**(8): 1252-1254
- 35) Heifets L.B. 1991. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections, CRC Press, Florida.
- 36) Heym B., Y. Zhang, S. Poulet, D. Young and S.T. Cole. 1993. Characterization of the *katG* Gene Encoding a Catalase-Peroxidase Required for the Isoniazid Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. **175**(13): 4255-4259
- 37) Heym B., N. Honoré, C. Truffot-Pernot, A. Banerjee, C. Schurra, W.R. Jacobs Jr, J.D.A. van Embden, J.H. Grosset and S.T.Cole. 1994. Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet* **344**:293-298
- 38) Heym B., P.M. Alzari, N. Honoré and S.T.Cole. 1995. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. **15**(2): 235-245
- 39) Honore N. and S.T. Cole. 1993. Molecular Basis of Rifampin Resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob Ag Chemother*. **37**(3):414-418
- 40) Honoré N., and S.T. Cole. 1994. Streptomycin Resistance in *Mycobacteria*. *Antimicrob Ag Chemother*. **38**(2): 238-242

- 41) Honoré N., G. Marchal and S.T. Cole. 1995. Novel Mutation in 16S rRNA Associated with Streptomycin Dependence in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Ag Chemother.* **39**(3): 769-770
- 42) Inderlied C.B. 1991. Antimycobacterial Agents: In vitro susceptibility testing, spectrums of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biological fluids, p. 134-195. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 3rd edition, Williams and Wilkins, Baltimore.
- 43) Iseman M.D. 1993. Treatment of multidrug-resistant Tuberculosis. *N Engl J Med.* **329**(11):784-791
- 44) Johnsson K., D.S. King, and P.G. Schultz. 1995. Studies on the Mechanism of Action of Isoniazid and Ethionamide in the Chemotherapy of Tuberculosis. *J Am Chem Soc.* **117**:5009-5010
- 45) Kapur V., L. Li, S. Iordanescu, M.R. Hamrick, A. Wanger, B.N. Kreiswirth and J.M. Musser. 1994. Characterization by Automated DNA Sequencing of Mutations in the Gene (*rpoB*) Encoding the RNA Polymerase β Subunit in Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from New York City and Texas. *J. Clin. Microbiol.* **32**(4): 1095-1098
- 46) Kirschner P., A. Meier, and E.C. Böttger. 1993. Genotypic Identification and Detection of Mycobacteria -Facing Novel and Uncultured Pathogens. In Persing D.H., Tenover F., White T.J., Smith T.F. (ed), *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 47) Lehninger A. L., D.L. Nelson and M.M. Cox. 1993
Principles of Biochemistry
 Worth Publishers, New York
 2nd ed.
 p. 791-813

- 48) Levin, M.E., and G.F. Hatfull. 1993. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol Microbiol.* **8**(2): 277-285
- 49) Linton, C.J., H. Jalal, J.P. Leeming, and M.R. Millar. 1994. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol.* **32**(9):2169-2174
- 50) Mandell G.L., and M.A. Sande. 1992. Drugs used in the chemotherapy of Tuberculosis and Leprosy, p.1146-1164. In Goodman A.G., T.W. Rall, A.S. Nies and P. Taylor. *Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics*. Vol.2. Eighth Edition. McGraw-Hill.
- 51) Martin C., J. Timm, J. Rauzier, R. Gomez-Ius, J. Davies, and B. Giequel. 1990. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature (London)* **345**:739-743
- 52) Martinetti G. and M. Altwegg. 1994. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by polymerase chain reaction, p. 197-203. In A Rolfs et al (eds), *Methods in DNA amplification*. Plenum Press, New York
- 53) Mathew C (ed). 1991. *Methods in Molecular Biology, Vol 9: Protocols in Human Molecular Genetics*. The Humana Press Inc., Clifton, NJ.
- 54) McAdam, R., C. Guilhot and B. Giequel. 1994. Transposition in Mycobacteria, p. 199-216. In B.R. Blaom (ed), *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. American Society for Microbiology, Washington, DC
- 55) Meier A., P. Kirschner, F.C. Bange, U. Vogel and E.C. Böttger. 1994. Genetic Alterations in Streptomycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Mapping of Mutations Conferring Resistance. *Antimicrob Ag Chemother.* **38**(2): 228-233

- 56) Melancon P., C. Lemieux and L. Brakier-Gingras. 1988. A mutation in the 530 loop of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA causes resistance to streptomycin. *Nucleic Acids Res.* **16**(20): 9631-9639
- 57) Mikusová, K., R.A. Slayden, G.S. Besra and P.J. Brennan. 1995. Biogenesis of the Mycobacterial Cell Wall and the Site of Action of Ethambutol. *Antimicrob Ag Chemother.* **39**(11): 2484-2489
- 58) Miller L.P., J.T. Crawford and T.M. Shinnick. 1994. The *rpoB* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Ag Chemother.* **38**(4):805-811
- 59) Moazed D. and H.F. Noller. 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature.* **327**(4): 389-394
- 60) Morris S., G.H. Bai, P. Suffys, L. Portillo-Gomez, M. Fairchok and D. Rouse. 1995. Molecular Mechanisms of Multiple Drug Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* **171**: 954-960
- 61) Nair J., D. Rouse and S. Morris. 1993. Nucleotide sequence analysis of the ribosomal S12 gene of *Mycobacterium intracellulare*. *Nucleic Acids Res.* **21**(4): 1039
- 62) Nair J., D.A. Rouse, G.H. Bai and S.L. Morris. 1993. The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* **10**(3): 521-527
- 63) Nolte F.S. and Metchock B. 1995. *Mycobacterium*, p. 400-437. In Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. and Tenover F.C., *Manual of Clinical Microbiology*. 6th edition. American Society for Microbiology, Washington, DC
- 64) Powers T., and H.F. Noller. 1991. A functional pseudoknot in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* **10**(8): 2203-2214

- 65) Pretorius G.S., van Helden P.D., Sireg F., Eisenach K.D., and Victor T.C. 1995. Mutations in *katG* Gene Sequences in Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Are Rare. *Antimicrob Ag Chemother.* **39**(10): 2276-2281
- 66) Quemard A., A. Dessen, M. Sugantino, W.R. Jacobs Jr., J.C. Sacchettini, and J.S. Blanchard. 1996. Binding of Catalase-Peroxidase-Activated Isoniazid to Wild-Type and Mutant *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl-ACP Reductases. *J Am Chem Soc.* **118**:1561-1562
- 67) Rastogi N., Gob K.S. and David H.L. 1989. Drug susceptibility testing in tuberculosis: A comparison of the proportion methods using Lowenstein Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 agar media and a radiometric method. *Res. Microbiol.* **140**: 405-417
- 68) Ristow M., M. Möhlig, M. Rifai, H. Schatz, K. Feldman, and A. Pfeiffer. 1995. New isoniazid/ethionamide resistance gene mutation and screening for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Lancet.* **346**: 502-503
- 69) Roberts, G. D., E.W. Koneman and Y.K. Kim. 1990. *Mycobacterium*, p. 304-339. In: Balows A., W.J. Hausler Jr., H.D. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (ed). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. 5th. Edition.
- 70) Rolfs A., Y. Schuller, U. Finckh and Weber-Rolfs. 1992. PCR: Clinical diagnostics and research. Editorial Springer Verlag, Berlin, Alemania.
- 71) Rosner J.L. 1993. Susceptibilities of *oxyR* regulon mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to isoniazid. *Antimicrob Ag. Chemother.* **37**: 2251-2253
- 72) Rouse, D.A., Z. Li, G. Bai, and S.L. Morris. 1995. Characterization of the *katG* and *inhA* Genes of Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Ag Chemother.* **39**(11): 2472-2477

- 73) Sareen, M. and G.K. Khuller. 1988. Phospholipids of ethambutol susceptible and resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biosci.* **13**:243-248
- 74) Sareen, M. and G.K. Khuller. 1990. Cell Wall and Membrane Changes Associated with Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra. *Antimicrob Ag Chemother.* **34**(9):1773-1776
- 75) Shafer R.W., Small P.M., Larkin C., Sing S.P., Kelly P., Sierra M.F., Schoolnik G. and Chirgwin K.D. 1995. Temporal trends and transmission patterns during the emergence of multidrug-resistant tuberculosis in New York City: a molecular epidemiologic assessment. *J Infect Dis.* **171**: 170-176.
- 76) Shinnick, T. M., and R. C. Good. 1994. Mycobacterial Taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**: 884-901.
- 77) Shoeb H.A., B.U. Bowman Jr, A.C. Ottolenghi and A.J. Merola. 1985. Peroxidase-Mediated Oxidation of Isoniazid. *Antimicrob Ag Chemother.* **27**(3): 399-403
- 78) Shoeb H.A., B.U. Bowman Jr, A.C. Ottolenghi and A.J. Merola. 1985. Evidence for the Generation of Active Oxygen by Isoniazid Treatment of Extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra. *Antimicrob Ag Chemother.* **27**(3): 404-407
- 79) Shoeb H.A., B.U. Bowman Jr, A.C. Ottolenghi and A.J. Merola. 1985. Enzymatic and Nonenzymatic Superoxide-Generating Reactions of Isoniazid. *Antimicrob Ag Chemother.* **27**(3): 408-412
- 80) Small P.M., Schecter G.F., Goodman P.C., Sande M.A., Chaisson R.E. and Hopewell P.C. 1991. Treatment of tuberculosis in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *New Eng J Med.* **324**: 289-294
- 81) Small P.M., Shafer R.W., Hopewell P.C., Singh S.P. and Schoolnick G.K. 1993. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *New Eng J Med,* **328**: 1137-1144.

- 82) Smith P.G., and A.R. Moss. 1994. Epidemiology of Tuberculosis, p. 47-59. In B. R. Bloom (ed), *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. American Society for Microbiology, Washington, DC
- 83) Sommers H.M. and McClatchy J.K., 1983. Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., Morello J.A., American Society for Microbiology, Washington D.C.
- 84) Speirs, R.J., J.T. Welch and M.H. Cynamon. 1995. Activity of n-Propyl Pyrazinoate against Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Investigations into Mechanism of Action of and Mechanism of Resistance to Pyrazinamide. *Antimicrob Ag Chemother.* **39**(6): 1269-1271
- 85) Stoeckle M.Y., L. Guan, N. Riegler, Y. Weitzman, B. Kreiswirth, J. Kornblum, F. Laraque and L.W. Riley. 1993. Catalase-Peroxidase Gene Sequences in Isoniazid-Sensitive and -Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York City. *J Infect Dis.* **168**:1063-1065
- 86) Suzuki Y., K. Yoshinaga, Y. Ono, A. Nagata and T. Yamada. 1987. Organization of rRNA Genes in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol.* **169**(2): 839-843
- 87) Takayama, K. and J.O. Kilburn. 1989. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Ag Chemother.* **33**(9):1493-1499
- 88) Telenti A., P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M.J. Colston, L. Matter, K. Schopfer and T. Bodmer. 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**:647-650
- 89) Telenti A., P. Imboden, F. Marchesi, T. Schmidheini, and T. Bodmer. 1993. Direct, Automated Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Polymerase Chain Reaction and Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Antimicrob Ag Chemother.* **37**(10): 2054-2058

- 90) Valway S.E., Greifinger R.B., Papania M., Kilburn J.O., Woodlay C., DiFerdinando G.T. and Dooley S.W. 1994. Multidrug-resistant tuberculosis in the New York State prison system, 1990-1991. *J Infect Dis.* **170**: 151-156.
- 91) Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. 1992
Recombinant DNA
Scientific American Books. New York, USA.
2nd ed.
- 92) Wayne, L.G., and G.P. Kubica. 1986. The Mycobacteria, p. 1436-1457. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (ed): *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 93) Willett H.P. 1994. Mycobacterium, p. 684-721. In Joklik W.K., Willett H.P., Amos D.B. and Wilfert C.M., *Zinsser Microbiología*. 20a. edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- 94) Williams, D.L., C. Waguespack, K. Eisenach, J.T. Crawford, F. Portaels, M. Salfinger, C.M. Nolan, C. Abe, V. Sticht-Groh, and T.P. Gillis. 1994. Characterization of Rifampin Resistance in Pathogenic Mycobacteria. *Antimicrob Ag Chemother.* **38(10)**:2380-2386
- 95) Wilson T.M., G.W. de Lisle, and D.M. Collins. 1995. Effect of *inhA* and *katG* on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol Microbiol.* **15(6)**: 1009-1015
- 96) Young D.B., and S.T. Cole. 1993. Leprosy, Tuberculosis, and the New Genetics. *J Bacteriol.* **175**:1-6
- 97) Zainuddin, Z. F., and J. W. Dale. 1990. Does *Mycobacterium tuberculosis* have plasmids?. *Tubercle* **71(1)**; 43-49

- 98) Zhang, Y., R. Lathigra, T. Garbe, D. Catty and D. Young. 1991. Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 5(2):381-391
- 99) Zhang Y., B. Heym, B. Allen, D. Young and S.T. Cole. 1992. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature (London).* 358: 591-593
- 100) Zhang, Y., M.J. Garcia, R. Lathigra, B. Allen, C. Moreno, J.D.A. van Embden, and D. Young. 1992. Alterations in the Superoxide Dismutase Gene of an Isoniazid-Resistant Strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 60(6): 2160-2165.
- 101) Zhang Y., and D.B. Young. 1993. Molecular mechanisms of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends Microbiol.* 1(3): 109-113
- 102) Zhang, Y., T. Garbe and D. Young. 1993. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Mol Microbiol.* 8(3): 521-524