

11281

4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

“UTILIDAD DEL POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA (PCR-SSCP) PARA LA IDENTIFICACION DE MUTACIONES EN EL GENE rpoB DE AISLADOS CLINICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* Y SU CORRELACION CON LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

M. EN B. JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE

COMITE TUTORAL: DR. JOSE SIFUENTES OSORNIO
DRA. CLARA INES ESPITIA PINZON
DR. GUILLERMO M. RUIZ-PALACIOS



MEXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

"Utilidad del polimorfismo conformacional de cadena sencilla
(PCR-SSCP) para la identificación de mutaciones en el gene *rpoB* de
aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y su correlación con la
concentración inhibitoria mínima"

Tesis para obtener el grado de:
Doctora en Ciencias Biomédicas

P R E S E N T A :
M. en B. Judith Miriam Bobadilla del Valle

COMITÉ TUTORAL:

DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO
DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZON
DR. GUILLERMO M. RUIZ - PALACIOS

México, D.F., Noviembre de 2001



REPUBLICA NACIONAL
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
ESTADO NACIONAL
ESTADÍSTICA DE
MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

pdcb/grad/019Jur/2001

ING. LEOPOLDO SILVA
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION
ESCOLAR DE LA UNAM
PRESENTE

Por medio del presente me permito informarle que en la reunión del Subcomité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 4 de Julio del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la M en Biotec JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE con número de cuenta 73755179 y número de expediente 100091 con la tesis titulada "UTILIDAD DEL POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA (PCR-SSCP) PARA LA IDENTIFICACION DE MUTACIONES EN EL GENE *rpoB* DE AISLADOS CLINICOS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* Y SU CORRELACION CON LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA", dirigida por el Dr. José Sifuentes Osornio

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
VOCAL
VOCAL
SUPLENTE
SUPLENTE

DR FERNANDO BASTARRACHEA AVILES
DR. JOSE SIFUENTES OSORNIO
DRA TERESA TUSSIE LUNA
DR EDMUNDO CALVA MERCADO
DR MOISES SELMAN LAMA
DR ROGELIO HERNANDEZ PANDO
DRA CLARA ESPITIA PINZON

Atentamente
"Por mi raza hablara el espíritu"
Cd Universitaria, D F, a 6 de Julio del 2001

Dr Gabriel Roldán Roldán
Responsable
Facultad de Medicina

Dr César A Domínguez Pérez Tejada
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas

C c p Biol Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado
Dr (a) Jose Sifuentes Osornio Tutor
Coordinación Doctorado

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, con financiamiento parcial del Proyecto CONACyT G26264-M; Fogarty International Center, FIRCA, PA-95-011, NIH, ICIDR-5U01AI35969 ERID-TW-96-001; Proyecto PAEP, UNAM clave 201313 y a través de la Beca de CONACyT 118152.

Agradecimientos:

A mi comité Tutorial muchas Gracias

A mi Jurado por su tiempo para la revisión de la Tesis y sus críticas constructivas.

Al personal Químico, Técnico y Administrativo del laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ.

Al Dr. Edmundo Calva Mercado por su afecto y apoyo siempre incondicional para la culminación de mis metas

Con agradecimiento especial al Dr. Alfredo Ponce de León por su amistad, ayuda, comentarios siempre atinados y por la revisión de este trabajo durante su realización.

Al Dr. Guillermo Ruiz Palacios, por su afecto y por creer en mí

Al Dr. José Sifuentes, por su apoyo para la realización de esta Tesis

INDICE

- I. Introducción
 1. Biología de *M. tuberculosis*
 2. Transmisión de la tuberculosis
 3. Patogénesis
 4. Síntomas clínicos de la tuberculosis
 5. Epidemiología de la tuberculosis
 6. Epidemiología de la tuberculosis resistente

- I. Antecedentes
 1. Origen de la resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*
 2. Mecanismo de acción de la rifampicina.
 - a) Unión de la rifampicina a la RNA polimerasa bacteriana
 - b) Localización del sitio de unión de la rifampicina a la RNA polimerasa.
- II. Mecanismo de resistencia bacteriana a rifampicina.
- III. Mutaciones en el gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*
- IV. Justificación
- V. Objetivos
 1. Objetivo general
 2. Objetivos específicos
- VI. Hipótesis
- VII. Método
 1. Población en estudio
 2. Definiciones
- VIII. Metodología
 1. Estandarización del SSCP-PCR
 - a. Obtención de DNA y amplificación del fragmento de 157pb.
 - b. Preparación del amplicón para el análisis del SSCP
 - c. Preparación de los geles de acrilamida
 - d. Detección del SSCP por el método radiactivo
 2. Secuenciación nucleotídica
 3. Análisis estadístico
- IX. Resultados
 1. Estandarización del PCR-SSCP
 2. Análisis del PCR-SSCP
 3. Análisis y frecuencia de las mutaciones en el gene *rpoB*
- X. Discusión
- XI. Perspectivas
- XII. Apéndice
 1. Tablas y figuras
- XIII. Bibliografía

Resumen

La resistencia a rifampicina se debe a mutaciones en la región central del gen *rpoB* que codifica para la RNA polimerasa. Existen diversas mutaciones y algunas se asocian a alta y baja resistencia a rifampicina. El objetivo de este trabajo fue identificar mutaciones en el gen *rpoB* en aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a concentraciones elevadas de rifampicina. Incluimos 46 cepas de *M. tuberculosis*, 35 resistentes a rifampicina y 11 sensibles. Realizamos PCR-SSCP para detectar las mutaciones en el gen *rpoB*, las cuales confirmamos por secuencia nucleotídica. Correlacionamos la concentración inhibitoria mínima con las mutaciones. Asimismo, comparamos nuestros hallazgos con lo reportado en la literatura. Las 35 cepas resistentes tuvieron alguna mutación de acuerdo a la secuencia nucleotídica de un fragmento de 411pb del gen *rpoB*. Las 11 susceptibles no presentaron mutación. En 11 de las 35 cepas resistentes encontramos mutación por PCR-SSCP (sensibilidad 31.4% y especificidad 100%). La reproducibilidad fue del 100%. Al analizar la secuencia nucleotídica de las 35 cepas encontramos mutación en siete codones que produjeron 13 cambios de aminoácido. Se identificaron tres *alelos* no descritos previamente en el codón 531. Encontramos mutaciones en codones específicos asociados con el nivel de resistencia: 513, 526 y 531 mostraron alta resistencia con respecto al codón 516 asociado a baja resistencia ($p=0.002$). Conclusiones. Encontramos mutaciones en el gen *rpoB* en todas las cepas de *M. tuberculosis* resistentes así como la asociación del grado de resistencia con mutaciones específicas. Asimismo, describimos nuevos *alelos* asociados a resistencia entre las cepas de *M. tuberculosis* de México.

Palabras clave: PCR-SSCP, *rpoB*, tuberculosis, mutación, secuencia nucleotídica

Abstract

The mechanism of resistance to rifampicin in *M. tuberculosis* is mainly due to mutations in the central region of the *rpoB* gene. Several mutations have been associated with high, medium and low resistance to rifampicin. The purpose of this study was to identify mutations in the *rpoB* gene among Mexican clinical isolates of *M. tuberculosis* resistant to variably high concentrations of rifampicin. We included 46 isolates of *M. tuberculosis*, 35 resistant to rifampicin and 11 susceptible. We used PCR-SSCP and sequence analysis of a fragment of the *rpoB* gene to detect the mutations and correlated them with the minimal inhibitory concentration. All resistant isolates had a mutation somewhere in the 411bp fragment of the *rpoB* gene according to sequence analysis. In contrast, none of the susceptible isolates had a mutation. The mutations were located in seven codons, which produced 13 alleles. We identified three new alleles in the codon 531. The PCR-SSCP detected mutations in 11 of the 35 resistant isolates and none among the 11 susceptible isolates. We found specific codons associated with the level of resistance: codon 516 was associated with low resistance and codon 513, 526 and 531 to high resistance. ($p=0.002$) Conclusions: We found mutations in the *rpoB* gene in all of our resistant *M. tuberculosis*, as well as an association with the resistance level and specific mutations. We also found new alleles associated to rifampicin resistance in Mexican isolates of *M. tuberculosis*.

Key words: PCR-SSCP, *rpoB*, mutations, sequence analysis, tuberculosis

Introducción

1. Biología de *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis es una infección bacteriana producida por microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El complejo está constituido por las siguientes especies: *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. bovis* y *M. africanum*. *M. tuberculosis* es un bacilo aerobio estricto, no esporulado e inmóvil de $0.2-0.6 \times 1-10 \mu\text{m}$. Poseen una pared celular compleja con un esqueleto de peptidoglicano, moléculas de arabinogalactano y ácidos micólicos unidas por enlaces covalentes, y cubiertas por lípidos libres y polipéptidos.¹

El peptidoglicano está compuesto de polisacáridos unidos covalentemente con el ácido N-acetil-murámico y el ácido N-acetil-glucosamino. El 25% del peso seco de la bacteria está constituido por lípidos libres en las capas exteriores de la célula. Estos lípidos contienen ceras (ésteres de ácidos grasos con alcoholes grasos) y glucolípidos (lípidos y carbohidratos unidos por enlaces covalentes). Los ácidos micólicos son ácidos grasos saturados, α -alquil- β -hidroxilos, y se encuentran tanto en las ceras como en los glucolípidos. La rigidez del esqueleto estructural de la pared celular se debe a la formación de un puente entre la capa rígida formada por el arabinogalactano, unido por enlaces covalentes al peptidoglicano.^{2,3}

Las características hidrófobas de su pared celular hacen a *M. tuberculosis* resistente a muchos desinfectantes y a colorantes utilizados en tinciones comunes en el laboratorio, como la de Gram y la de Giemsa. Por estas características, se le define como bacilo ácido-alcohol-resistente y sólo puede ser teñido con procedimientos como la tinción de Ziehl Neelsen o de Kinyou.²

M. tuberculosis es un microorganismo de crecimiento lento, su tiempo de replicación es de 12-24 horas dependiendo del ambiente y medio de cultivo en donde crezca. Una característica *suigeneris* de *M. tuberculosis* es su tendencia a formar "cordones", o grupos densos de bacilos en alineamiento paralelo como cordón o mecate. El origen bioquímico de este fenómeno fue identificado por Bloch⁴ y lo llamó "factor cord". Posteriormente, este factor fue identificado como un

compuesto poco usual de 6,6'dimicolato de trealosa; el cual ocasiona morbilidad alta, con consecuencias letales cuando es inoculado en modelos animales³ Sin embargo, el papel de este compuesto en la patogénesis de la tuberculosis aún no se ha determinado; pero se ha demostrado que puede ser un factor de virulencia³ En estudios experimentales hechos en animales inmunizados contra el factor cordón, éstos fueron retados con *M. tuberculosis* virulento y la mortalidad disminuyó notablemente contra un grupo control.⁵

2. Transmisión de la tuberculosis

La tuberculosis se transmite principalmente a través del aire, por gotas de saliva excretadas por individuos con infección pulmonar. Estas gotas son la fuente infectante cuando se expectoran suficientes bacilos como para ser detectados en la baciloscopia, aunque se ha demostrado que en pacientes con baciloscopia negativa (paucibacilares), también son capaces de infectar a las personas cercanas a ellos.^{6,7}

3. Patogénesis

Se debe sospechar de tuberculosis cuando existen antecedentes de convivencia con personas que padecen tuberculosis pulmonar activa, ya que una tercera parte de los contactos se infecta y de éstos, 10% desarrolla enfermedad clínica, la mitad en el primer año y la otra mitad en el transcurso de su vida.⁸

La entrada del microorganismo en el humano ocurre por la inhalación de pequeñas partículas (1- 5 μm) que son capaces de llegar a los alvéolos, donde la primera defensa del huésped son los macrófagos residentes. En este momento la infección puede permanecer en la forma latente de la enfermedad, o se puede generar la forma activa, esto es dependiendo del sistema inmune del huésped o del inóculo con el que se infectó.⁹

En la forma latente de la enfermedad, los macrófagos pueden destruir a los bacilos de inmediato o bien fagocitarlos sin destruirlos, limitando la infección mediante la formación de granulomas pequeños. La forma activa y contagiosa de a enfermedad se produce cuando el sistema inmune no es capaz de destruir los bacilos, éstos se dividen dentro del macrófago y se rompe, los bacilos salen y se reproducen. Durante el rompimiento de los macrófagos se liberan enzimas tóxicas

que dañan alrededor del tejido pulmonar, lo cual produce lesiones cavitarias o tubérculos dentro del pulmón, en los cuales *M. tuberculosis* es capaz de multiplicarse. Una vez establecida la infección local, el microorganismo invade los linfáticos y posteriormente el torrente sanguíneo. A través del torrente sanguíneo, se pueden establecer focos de infección activa o latente en sitios como vértices del pulmón, corteza del riñón y huesos, y a través de los linfáticos se disemina a los ganglios linfáticos locales.⁹

4. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la tuberculosis se describieron hace muchos años; sin embargo, su espectro es tan amplio que el diagnóstico sigue siendo un reto para el clínico. La tuberculosis pulmonar es la forma más conocida de la enfermedad. Se clasifica en infección primaria y en enfermedad por reactivación. La primera forma se presenta en personas que nunca han tenido contacto con *M. tuberculosis* (prueba cutánea de hipersensibilidad tardía o PPD previo negativo). La mayor parte de los individuos infectados no presenta síntomas y sólo se documenta la infección mediante la conversión del PPD.¹⁰ La infección primaria sintomática es controlada generalmente en semanas o meses por medio de una inflamación granulomatosa, la cual se observa como un nódulo calcificado en la radiografía de tórax. La infección primaria sintomática es más frecuente en niños y adultos jóvenes, y se presenta con fiebre, ataque al estado general, tos y dolor pleurítico, con o sin derrame pleural. La radiografía de tórax muestra infiltrados pulmonares difíciles de distinguir de una neumonía bacteriana, pero con adenomegalias en la región parahiliar y mediastinal, características sugerentes de diagnóstico de tuberculosis.¹¹

La tuberculosis pulmonar por reactivación se debe a los bacilos de *M. tuberculosis* que permanecen viables en los granulomas. Esta forma representa más del 90% de los casos de tuberculosis pulmonar sintomática.¹² En un enfermo inmunocompetente, las manifestaciones clínicas son: fiebre de predominio vespertino, diaforesis profusa, pérdida de peso y tos, que en un tercera parte de los pacientes es hemoptoica. En más del 90% de los casos de tuberculosis pulmonar, la radiografía de tórax muestra infiltrados alveolares y áreas con

lesiones fibronodulares o cavernas, en los segmentos apicales y posteriores del lóbulo superior o en los segmentos superiores del lóbulo inferior de los pulmones.⁶ El diagnóstico se basa en el cuadro clínico, el hallazgo radiológico, el PPD positivo y la detección de bacilos ácido-alcohol-resistentes en la expectoración.

5. Epidemiología de la tuberculosis

La tuberculosis es uno de los problemas de salud pública mundial más importante. En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara a la tuberculosis como un problema emergente. La incidencia de tuberculosis para el año 2000 fue de 3.5 millones de muertes y 10.2 millones de nuevos casos. Se estima que para el año 2005 se incrementa a 11.9 millones de casos al año¹³. Cerca del 95% de los casos nuevos y de las muertes se presentan en países pobres, con tasas de incidencia que en ciertas localidades llega a ser hasta de 500/100,000 habitantes, donde la tuberculosis coexiste con otras enfermedades, como cirrosis hepática, diabetes mellitus, alcoholismo, etc.

Entre los factores que han contribuido al resurgimiento de la tuberculosis, se encuentra la epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la falta de adherencia a tratamiento, la inmigración, la falta de interés por parte del gobierno en los programas de salud y el problema socioeconómico que se presentan en países en vías de desarrollo.^{14,15,16,17} En 1996, se estimaba que en el mundo existían entre 14 y 15 millones de personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y cerca de 6 millones de esas personas también estaban co-infectadas con *M. tuberculosis*.¹⁸

En México, entre 1941 y 1976, se observó una disminución en el número de casos de tuberculosis pulmonar; sin embargo, a partir de 1985 se ha observado un incremento debido a la coinfección con el VIH y mejor notificación de los casos a la Secretaría de Salud.¹⁹ En 1986 se realizó la primera Encuesta Nacional de Salud y se observó que 20% de la población vivía en casas con piso de tierra, 46.7% tenía más de dos cuartos, 60% contaba con agua dentro de la casa, 55.8% de la población habitaba con más de 5 personas por casa, 57.4% disponía de drenaje conectado a la red pública, 60.8% tenía excusado de agua, 50.5% de la población no era derecho habiente a un servicio de salud. Con los datos anteriores

y por algunos otros estudios realizados, se estimó para 1996 entre 41,000 y 59,000 casos nuevos de tuberculosis en nuestro país.²⁰

6. Epidemiología de la tuberculosis resistente.

La re-emergencia de la tuberculosis se ha exacerbado por un alarmante incremento de cepas resistentes a uno o más agentes antimicrobianos. Aunque no se conoce con precisión, se estima que 50 a 100 millones de personas en el mundo están infectadas con *M. tuberculosis* resistente. Durante los primeros 3 meses de 1991, el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos reportó que 13% de los casos nuevos de tuberculosis son resistentes a por lo menos un antibiótico; presentándose brotes causados por estas cepas entre personas infectadas con VIH. La mortalidad asociada a estos casos fue del 72 a 89%.²¹

La OMS informó recientemente el estado actual de tuberculosis resistente a antibióticos en el mundo. Describió que en la Unión Soviética la tasa de resistencia primaria a isoniacida fue de 32% y la de multi-resistencia primaria se aproximó al 15%. En Latinoamérica, la tasa de resistencia primaria a isoniacida varió de 1% en Uruguay hasta 20% en la República Dominicana, la multi-resistencia primaria fue del 7% en la República Dominicana y del 5% en Argentina²². En 1995, nuestro grupo informó tasas de resistencia primaria a isoniacida del 9% y a rifampicina del 6%. La tasa de resistencia secundaria a isoniacida fue del 44% y a rifampicina del 35%. Estas cifras fueron cuatro veces más altas que las reportadas previamente en México por la OMS²³.

Se han realizado otros estudios en México en áreas urbanas, semi-urbanas y rurales. En todos estos sitios, el hallazgo común ha sido una tasa alta de resistencia primaria a isoniacida y a la combinación de isoniacida y rifampicina (multi-resistencia)^{24,25}.

Datos semejantes se encontraron en un estudio realizado por la Secretaría de Salud de México en colaboración con el Centro de Control de Enfermedades (CDC) en 3 estados de la República Mexicana. El promedio de la tasa de resistencia primaria a isoniacida fue de 11% y de multi-resistencia primaria de 2%²⁶. Desde el punto de vista de salud pública se ha enfatizado el impacto de la resistencia en la morbilidad y mortalidad en lugares donde el VIH ha sido

prevalente, sin embargo, este impacto también es alto en lugares semi-urbanos sin la influencia de la infección por VIH ²⁷.

La resistencia es el resultado de la selección de mutantes resistentes en cepas originalmente susceptibles como consecuencia de una terapia inadecuada²⁸. En los últimos años, los aislados resistentes a isoniacida y rifampicina han sido responsables de una serie de brotes con mortalidad elevada, lo cual, hace evidente la necesidad de desarrollar métodos de detección y vigilancia de la distribución de estos aislados²¹.

II. Antecedentes

1. Origen de la resistencia de *Mybacterium tuberculosis*

La isoniacida y la rifampicina son los antimicrobianos primarios en el tratamiento de los enfermos con tuberculosis. Para evitar la aparición de la resistencia a los antibióticos primarios, es importante implementar estrategias en las que el tratamiento sea estrictamente supervisado y garantice la adherencia del paciente al tratamiento ^{29,30,31}.

M. tuberculosis desarrolla resistencia en forma espontánea. La probabilidad de resistencia a antibióticos menos efectivos contra *M. tuberculosis*, como la tiacetazona, etionamida, capreomicina, cicloserina y viomicina es de 10^{-3} ; para antibióticos más efectivos como isoniacida, estreptomina, etambutol, kanamicina y ácido p-amino-salicílico es de 10^{-6} ; y para rifampicina, el antibiótico más efectivo contra *M. tuberculosis*, es de 10^{-8} .³² Consecuentemente, la probabilidad de que haya una mutación es directamente proporcional a la carga bacteriana. Como las mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos es cromosomal, la probabilidad de que una mutante sea resistente simultáneamente a dos o más antibióticos es el producto de las probabilidades individuales y la probabilidad de multi-resistencia es multiplicativa

La resistencia a los antibióticos no tiene ninguna ventaja selectiva para la bacteria, a menos que ésta sea expuesta al antibiótico.³³ Bajo estas circunstancias, las cepas sensibles mueren y las mutantes resistentes sobreviven. Cuando el paciente es expuesto a los antibióticos de primera línea y no se adhiere

prevalente, sin embargo, este impacto también es alto en lugares semi-urbanos sin la influencia de la infección por VIH²⁷.

La resistencia es el resultado de la selección de mutantes resistentes en cepas originalmente susceptibles como consecuencia de una terapia inadecuada²⁸. En los últimos años, los aislados resistentes a isoniacida y rifampicina han sido responsables de una serie de brotes con mortalidad elevada, lo cual, hace evidente la necesidad de desarrollar métodos de detección y vigilancia de la distribución de estos aislados²¹.

II. Antecedentes

1. Origen de la resistencia de *Mybacterium tuberculosis*

La isoniacida y la rifampicina son los antimicrobianos primarios en el tratamiento de los enfermos con tuberculosis. Para evitar la aparición de la resistencia a los antibióticos primarios, es importante implementar estrategias en las que el tratamiento sea estrictamente supervisado y garantice la adherencia del paciente al tratamiento^{29,30,31}.

M. tuberculosis desarrolla resistencia en forma espontánea. La probabilidad de resistencia a antibióticos menos efectivos contra *M. tuberculosis*, como la tiacetazona, etionamida, capreomicina, cicloserina y viomicina es de 10^{-3} ; para antibióticos más efectivos como isoniacida, estreptomina, etambutol, kanamicina y ácido p-amino-salicílico es de 10^{-6} ; y para rifampicina, el antibiótico más efectivo contra *M. tuberculosis*, es de 10^{-8} .³² Consecuentemente, la probabilidad de que haya una mutación es directamente proporcional a la carga bacteriana. Como las mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos es cromosomal, la probabilidad de que una mutante sea resistente simultáneamente a dos o más antibióticos es el producto de las probabilidades individuales y la probabilidad de muti-resistencia es multiplicativa.

La resistencia a los antibióticos no tiene ninguna ventaja selectiva para la bacteria, a menos que ésta sea expuesta al antibiótico.³³ Bajo estas circunstancias, las cepas sensibles mueren y las mutantes resistentes sobreviven. Cuando el paciente es expuesto a los antibióticos de primera línea y no se adhiere

al tratamiento puede generar resistencia a alguno de éstos. Si el paciente recibe nuevamente terapia antimicorbiana con otros antibióticos, se seleccionarán mutantes resistentes al antibiótico nuevo; por lo tanto, el mecanismo predominante del desarrollo de la multi-resistencia es la selección consecutiva de cada uno de los antibióticos a los cuales es expuesta la bacteria.

Los pacientes con cepas multi-resistentes constituyen una combinación de infecciones crónicas, las cuales propagan la multi-resistencia primaria. Estos hechos apoyan la idea de que la tuberculosis producida por *M. tuberculosis* multi-resistente, es una enfermedad debida al efecto selectivo por una quimioterapia inapropiada.³⁴

2. Mecanismo de acción de la Rifampicina

La rifampicina es un derivado semisintético de la rifamicina B. La rifamicina B es el producto de la fermentación de *Nocardia mediterranei*.³⁵ La rifampicina tiene un espectro antibacteriano amplio y es particularmente activo contra micobacterias y otros microorganismos grampositivos.³⁶

La rifampicina es muy activa contra bacterias grampositivas como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y menos efectivo contra organismos gramnegativos.³⁷ La concentración inhibitoria mínima (CIM) para la mayoría de los microorganismos sensibles es de 0.01-0.02µg/mL³⁸. A pH de 5.5-8 la actividad inhibitoria de la rifampicina no cambia. Una característica especial de la rifampicina es su penetración en los leucocitos polimorfonucleares y mata patógenos intracelulares.³⁹

La rifampicina fue introducida como antituberculoso en 1972 y es extremadamente activo contra *M. tuberculosis*; presenta una CIM de 0.1 - 0.2µg/mL.³⁶ Por su acción bactericida, la rifampicina con isoniacida forman el principio del tratamiento contra la tuberculosis. La actividad antibacteriana de la rifampicina está basada en un mecanismo de acción único y específico. En base a los estudios de estructura-función realizados en *Escherichia coli*, el mecanismo de acción de la rifampicina a nivel molecular, involucra la inhibición de la RNA-polimerasa dependiente de DNA^{36,40}. Se ha encontrado que muchas bacterias filogenéticamente cercanas a *E. coli* son sensibles a rifampicina. La RNA polimerasa de estas bacterias es inhibida por otros antibióticos que tienen efecto

tóxico en humanos, tales como la actinomicina y la mitomicina. Estos antibióticos interfieren con la acción de la RNA polimerasa que interactúa con el DNA "templado".⁴¹

En los primeros estudios realizados para determinar el mecanismo de acción de la rifampicina, se utilizó como modelo el efecto de la rifampicina en la RNA polimerasa de *E. coli*. La función de la RNA polimerasa es polimerizar los ribonucleosidos trifosfato a partir de un DNA "templado" por lo que cataliza la transcripción de DNA a RNA.⁴²

El proceso de transcripción se lleva a cabo en varios pasos: a) unión de la enzima al DNA, b) unión del primer nucleósido trifosfato al complejo enzima-DNA, c) formación de la primera unión fosfodiéster y la producción de un dinucleótido (cadena de iniciación), d) el ensamble de más nucleótidos para formar un polirribonucleótido (cadena de elongación) y e) la liberación de la cadena de RNA completa (cadena de terminación).⁴³

En experimentos en el fago lambda, se demostró que la rifampicina produce un efecto abortivo en la transcripción desde la cadena de iniciación. Se ha propuesto que, a partir del dinucleótido pppApU, se inhibe la formación de la segunda unión fosfodiéster, en donde la unión de la rifampicina a la RNA polimerasa bloquea, por impedimento estérico, la translocación de pppApU y se inhibe la elongación de la cadena de RNA.⁴⁴

Otros investigadores han postulado que, en presencia de la rifampicina, se forma un oligonucleótido a partir del dinucleótido y, como consecuencia, la rifampicina compete directamente, o por efecto alostérico, con el RNA por el sitio de unión de la RNA polimerasa. Así, la inhibición de la transcripción es causada por un efecto desestabilizador por la unión de un oligonucleótido intermediario.⁴⁵

a) Unión de la rifampicina a la RNA polimerasa bacteriana

Se ha analizado con detalle la interacción física de la rifampicina con la polimerasa bacteriana. Se demostró la formación del complejo rifampicina-RNA polimerasa con experimentos de rifampicina marcada radiactivamente y se observó que una molécula de antibiótico se une a cada monómero de la enzima y se inhibe su acción.³⁶

Con el fin de demostrar el porqué una molécula de rifampicina (peso molecular 823 Da) es capaz de inactivar a la RNA polimerasa (peso molecular 475 KDa) a concentraciones tan bajas se han realizado estudios cinéticos de la unión rifampicina-RNA polimerasa.⁴⁶ Los estudios de cinética mostraron que la constante de disociación (kd) del complejo rifampicina-enzima, sigue una cinética de primer orden, con una vida media de 12 horas a 0°C y disminuye a 9 minutos a 37°C. La constante de asociación (ka) sigue una reacción de segundo orden, con una constante $ka = 6 \times 10^{-4}$ M/seg a 0°C y se incrementa a 1.2×10^6 M/seg a 37°C. Con estos valores, se calculó la constante de equilibrio $K = kd/ka$. La K fue de 10^{-10} a 0°C y de 10^{-9} a 37°C. Los valores de K, son tan pequeños que explican la eficiencia de la rifampicina.

Otros investigaciones han mostrado que la asociación enzima-antibiótico disminuye cuando el DNA se une a la enzima en cualquier estado de la transcripción; es decir, la rifampicina se une en forma más lenta a cualquier complejo formado durante la transcripción, que cuando se une a directamente a la enzima libre. Esta medidas cinéticas comprueban que el DNA puede proteger a la RNA polimerasa de la inactivación por la rifampicina y la síntesis del RNA no se ve afectado una vez que se ha iniciado la cadena de elongación.⁴⁷

La naturaleza física de la unión entre la enzima-antibiótico se ha visto que es de carácter lipofílico; pues se ha observado que la fuerza iónica no tiene influencia en la constante de asociación, mientras que el dimetil sulfóxido (solvente menos polar) la incrementa 20 veces.⁴⁸

b) Localización del sitio de unión de la rifampicina a la RNA polimerasa

La RNA polimerasa es una enzima compleja constituida por 5 subunidades $\alpha_2\beta\beta'\sigma$.⁴⁶ Se ha demostrado que la rifampicina se une a la subunidad β .⁴⁹ Para comprobar este hecho, se hicieron experimentos de reconstitución en donde se probaron subunidades de cepas de *E. coli* sensibles y resistentes. Se observó que la RNA polimerasa que contenía las subunidades $\alpha\beta'$ de una cepa resistente y la subunidad β de una cepa sensible, confirió a la cepa sensibilidad a rifampicina; mientras que la RNA polimerasa que contenía las subunidades $\alpha\beta'$ de una cepa

sensible y la subunidad β de una cepa resistente, confirió a la cepa resistencia a rifampicina.⁵⁰

III. Mecanismo de resistencia a rifampicina

Se ha demostrado que la resistencia a rifampicina es causada por una alteración en el sitio blanco del antibiótico; la RNA polimerasa. La enzima ha sido aislada de mutantes resistentes a rifampicina, tanto en microorganismos gramnegativos como grampositivos, y se ha encontrado que la rifampicina no se une tan solidamente a la enzima de las cepas resistentes.^{46,51} Estos hallazgos concuerdan con el concepto de que la unión de la rifampicina a la enzima es un prerrequisito para la inhibición de la enzima.

El mecanismo de resistencia a rifampicina en microorganismos grampositivos y gramnegativos se debe a mutaciones en el gen *rpoB*, el cual codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa. Las mutaciones confieren cambios conformacionales en la RNA polimerasa y se produce la unión defectuosa entre el antibiótico y la RNA polimerasa, desarrollando resistencia.⁵² En 1980 se realizaron estudios moleculares en donde se demostró que las cepas de *E. coli* resistentes a rifampicina tuvieron mutaciones sin sentido y remociones cortas en el gen *rpoB*.

Jin y Gross⁵³ identificaron los sitios en donde se encuentran las mutaciones que confieren resistencia a rifampicina en el gen *rpoB* de *E. coli*. Los sitios fueron clasificados en tres grupos llamados Región I (codones 507-533), II (codones 563-574), III (codones 676-689) y una región a 146 amino ácidos inmediatamente corriente arriba de la región I (Fragmento B, Fig.1).⁵⁴ Además, también informaron que el nivel de resistencia depende de la región en donde se encuentra la mutación, y observaron que las mutaciones en la región I confieren resistencia a niveles altos de rifampicina. En este estudio, también se describieron 17 mutaciones que afectaron 14 residuos de aminoácidos en la subunidad β de la RNA polimerasa de *E. coli*, resistente a rifampicina.

Posteriormente, otros investigadores han analizado las secuencias de las regiones I y II del gen *rpoB* de microorganismos, como *Salmonella typhimurium*,⁵⁵ *M. leprae*,⁵⁶ *M. tuberculosis*,⁵⁷ *Neisseria meningitidis*,⁵⁸ *M. smegmatis*,⁵⁹ *Staphylococcus aureus*,⁶⁰ *Listeria monocytogenes*,⁶¹ *Streptococcus pneumoniae*,⁶² *Rickettsia*

sensible y la subunidad β de una cepa resistente, confirió a la cepa resistencia a rifampicina⁵⁰

III. Mecanismo de resistencia a rifampicina

Se ha demostrado que la resistencia a rifampicina es causada por una alteración en el sitio blanco del antibiótico, la RNA polimerasa. La enzima ha sido aislada de mutantes resistentes a rifampicina, tanto en microorganismos gramnegativos como grampositivos, y se ha encontrado que la rifampicina no se une tan solidamente a la enzima de las cepas resistentes.^{46,51} Estos hallazgos concuerdan con el concepto de que la unión de la rifampicina a la enzima es un prerequisite para la inhibición de la enzima.

El mecanismo de resistencia a rifampicina en microorganismos grampositivos y gramnegativos se debe a mutaciones en el gen *rpoB*, el cual codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa. Las mutaciones confieren cambios conformacionales en la RNA polimerasa y se produce la unión defectuosa entre el antibiótico y la RNA polimerasa, desarrollando resistencia.⁵² En 1980 se realizaron estudios moleculares en donde se demostró que las cepas de *E. coli* resistentes a rifampicina tuvieron mutaciones sin sentido y remociones cortas en el gen *rpoB*.

Jin y Gross⁵³ identificaron los sitios en donde se encuentran las mutaciones que confieren resistencia a rifampicina en el gen *rpoB* de *E. coli*. Los sitios fueron clasificados en tres grupos llamados Región I (codones 507-533), II (codones 563-574), III (codones 676-689) y una región a 146 amino ácidos inmediatamente corriente arriba de la región I (Fragmento B, Fig.1).⁵⁴ Además, también informaron que el nivel de resistencia depende de la región en donde se encuentra la mutación, y observaron que las mutaciones en la región I confieren resistencia a niveles altos de rifampicina. En este estudio, también se describieron 17 mutaciones que afectaron 14 residuos de aminoácidos en la subunidad β de la RNA polimerasa de *E. coli*, resistente a rifampicina.

Posteriormente, otros investigadores han analizado las secuencias de las regiones I y II del gen *rpoB* de microorganismos, como *Salmonella typhimurium*,⁵⁵ *M. leprae*,⁵⁶ *M. tuberculosis*,⁵⁷ *Neisseria meningitidis*,⁵⁸ *M. smegmatis*,⁵⁹ *Staphylococcus aureus*,⁶⁰ *Listeria monocytogenes*,⁶¹ *Streptococcus pneumoniae*,⁶² *Rickettsia*

typhi,⁶³ *Spiroplasma citri*⁶⁴ y *Legionella pneumophila*,⁶⁵ resistentes a rifampicina y han encontrado que en la mayoría de estas cepas presentan mutaciones, inserciones o remociones en estas dos regiones. Específicamente, en la región I es en donde las mutaciones se presentan con más frecuencia, los codones 526 y 531.

Se han encontrado otros mecanismos de resistencia a rifampicina, los cuales se han caracterizado por la inactivación del antibiótico. Los mecanismos descritos hasta la fecha son la fosforilación, glucosilación, ribosilación y descomposición.⁶⁶ También se ha observado que estos mecanismos se encuentran específicamente en ciertos géneros de bacterias. Por ejemplo, la ribosilación se presenta en el género *Mycobacterium* spp. y otros géneros relacionadas como *Gordona* y *Tsukamurella*; la glucosilación ha sido observada en *Nocardia*, *Bacillus* spp y *Rhodococcus*.⁶⁷ La descomposición fue observada en *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium*, esta última se puede observar como la decoloración del antibiótico.

IV. Mutaciones en el gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*

En *M. tuberculosis* resistente a rifampicina se ha caracterizado el locus *rpoB* y se han identificado mutaciones en una región central de resistencia (RCR) de 69-81 nucleótidos (codones 507-533)^{68,69,70}; los cambios fueron en un nucleótido del produciendo sustituciones de aminoácidos, aunque también se observaron inserciones o remociones pero con frecuencia muy baja.

Telenti y cols.,⁶⁷ analizaron 122 aislados clínicos de *M. tuberculosis* de origen geográfico diverso. En 66 aislados resistentes, observaron que las mutaciones en el gen *rpoB* se encuentran en los codones 511-533; así mismo, mostraron que los aislados sensibles no presentaron mutaciones. Posteriormente, Kapur y cols.,⁶⁹ al estudiar 98 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina aisladas en Texas y regiones de la frontera con México, encontraron las mismas mutaciones que Telenti y cols.⁶⁷ Sin embargo, Kapur y cols.,⁶⁹ encontraron en aislados de una misma región geográfica mutaciones en los codones 511 y 516, por ello, postularon que las mutaciones en el gen *rpoB* tenían distribución geográfica. Además encontraron inserciones y remociones entre los codones 513 y 514 y, en algunos aislados, la combinación de dos mutaciones. En Japón,⁷¹ se estudiaron 40 cepas de *M. tuberculosis* para correlacionar la CIM y las

typhi,⁶³ *Spiroplasma citri*⁶⁴ y *Legionella pneumophila*,⁶⁵ resistentes a rifampicina y han encontrado que en la mayoría de estas cepas presentan mutaciones, inserciones o remociones en estas dos regiones. Específicamente, en la región I es en donde las mutaciones se presentan con más frecuencia, los codones 526 y 531.

Se han encontrado otros mecanismos de resistencia a rifampicina, los cuales se han caracterizado por la inactivación del antibiótico. Los mecanismos descritos hasta la fecha son la fosforilación, glucosilación, ribosilación y descomposición.⁶⁶ También se ha observado que estos mecanismos se encuentran específicamente en ciertos géneros de bacterias. Por ejemplo, la ribosilación se presenta en el género *Mycobacterium* spp. y otros géneros relacionadas como *Gordona* y *Tsukamurella*; la glucosilación ha sido observada en *Nocardia*, *Bacillus* spp y *Rhodococcus*.⁶⁷ La descomposición fue observada en *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium*, esta última se puede observar como la decoloración del antibiótico.

IV. Mutaciones en el gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis*

En *M. tuberculosis* resistente a rifampicina se ha caracterizado el locus *rpoB* y se han identificado mutaciones en una región central de resistencia (RCR) de 69-81 nucleótidos (codones 507-533)^{68,69,70}; los cambios fueron en un nucleótido del produciendo sustituciones de aminoácidos, aunque también se observaron inserciones o remociones pero con frecuencia muy baja.

Telenti y cols.,⁶⁷ analizaron 122 aislados clínicos de *M. tuberculosis* de origen geográfico diverso. En 66 aislados resistentes, observaron que las mutaciones en el gen *rpoB* se encuentran en los codones 511-533; así mismo, mostraron que los aislados sensibles no presentaron mutaciones. Posteriormente, Kapur y cols.,⁶⁹ al estudiar 98 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina aisladas en Texas y regiones de la frontera con México, encontraron las mismas mutaciones que Telenti y cols.⁶⁷ Sin embargo, Kapur y cols.,⁶⁹ encontraron en aislados de una misma región geográfica mutaciones en los codones 511 y 516, por ello, postularon que las mutaciones en el gen *rpoB* tenían distribución geográfica. Además encontraron inserciones y remociones entre los codones 513 y 514 y, en algunos aislados, la combinación de dos mutaciones. En Japón,⁷¹ se estudiaron 40 cepas de *M. tuberculosis* para correlacionar la CIM y las

mutaciones en *rpoB*, y encontraron que el 35% de las cepas presentaron mutaciones en el codón 526, 35% en el codón 531 y 15% en el codón 516. Estos aislados tuvieron una CIM >64 µg/mL, dos aislados sensibles con una CIM de 1µg/mL tuvieron un cambio en el codón 533, y una cepa sensible con una CIM < 0.063µ/mL presentó mutación en el codón 515, que nunca había sido reportada, y tres cepas con CIM de 2-32µg/mL no presentaron mutaciones.

En un estudio de revisión sobre la identificación de mutaciones en el gen *rpoB*, se informó sobre el análisis de 478 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina en todo el mundo y se encontró que el 70% de los aislados presentaron cambios en los codones Ser531 e His526⁷². Así mismo, se han encontrado en aislados resistentes, un número pequeño de mutaciones fuera de la región de 81pb.

La consistencia de mutaciones en el locus *rpoB* y el fenotipo de resistencia a rifampicina (>95%) han marcado implicaciones clínicas en el tratamiento de los pacientes. Por ello, la identificación de las mutaciones asociadas con la resistencia a rifampicina ha impulsado el desarrollo de diversas pruebas para mejorar la sensibilidad en la detección de las mutaciones. La secuenciación nucleotídica es uno de los métodos más seguros; sin embargo, este no es aplicable en el laboratorio clínico o de salud pública, dado que se requiere de equipo costoso, es laborioso y se necesita personal especializado. Se han utilizado otros métodos como el PCR-SSCP (del inglés "polymerase chain reaction - single strand conformation polymorphism")⁶⁷⁻⁷¹, el análisis de "heminested-PCR"⁷³, el análisis del "PCR heteroduplex"⁷⁴, "line probe hibridization"^{75,76}, "dideoxy-fingerprint"⁷⁷, "DNA probe arrays"⁷⁸, análisis de "RNA mismatch"⁷⁹, y faros moleculares⁸⁰ Entre estos métodos, el PCR-SSCP ha sido el más empleado por su bajo costo y, en particular, por el desarrollo de PCR-SSCP no isotópico. Esta metodología se basa en la amplificación de una secuencia blanco de DNA, seguido por la desnaturalización del producto amplificado el cual es sometido a electroforesis. En condiciones nativas, el DNA de cadena sencilla tiene una conformación que está determinada por la secuencia nucleotídica. Cualquier cambio o mutación en dicha secuencia afectará el plegamiento o la conformación de la cadena y este cambio

es observado por un patrón electroforético diferente (polimorfismo), con respecto al de un control sin mutaciones.^{81,82}

El primer estudio en que se utilizó esta metodología, para encontrar mutaciones en el gen *rpoB* de aislados clínicos de *M. tuberculosis*, resistentes a rifampicina, incluyó el análisis de un fragmento de 157 pares de bases (pb), en donde están contenidas la mayoría de las mutaciones identificadas que confieren resistencia a rifampicina (Fig. 1, región I).⁸⁷ Los resultados mostraron una relación directa entre el polimorfismo observado en el PCR-SSCP, la resistencia fenotípica de los aislados y las mutaciones. Esta metodología es relativamente sencilla y fue inicialmente muy prometedora; sin embargo, actualmente los resultados obtenidos con el PCR-SSCP deben interpretarse con precaución, como un método que sólo detecta mutaciones pero no da información de la naturaleza de ellas. Por ejemplo, se han identificado mutaciones silenciosas en el gen *rpoB* que alteran la movilidad electroforética en el SSCP, pero que no tienen asociación con resistencia a rifampicina, lo cual dificulta la correlación de la expresión fenotípica con el genotipo.⁸³

En nuestro laboratorio se determinó la sensibilidad a rifampicina de 46 aislados clínicos de *M. tuberculosis*, de pacientes con tuberculosis pulmonar. De éstos, 35 fueron resistentes a rifampicina y 11 fueron sensibles. Los 35 aislados resistentes se probaron con diferentes concentraciones del antibiótico para determinar su CIM (2-2048 µg/mL). Debido a que estas cepas mostraron un intervalo amplio de resistencia a rifampicina, pensamos que las mutaciones presentes en el gen *rpoB* podrían ser diferentes a las descritas previamente; también consideramos la posibilidad de encontrar mutaciones asociadas con la CIM, sobre todo en las cepas con resistencia más elevada (256-2048 µg/mL). Además, queríamos observar si las cepas aisladas en nuestro laboratorio presentaban mutaciones peculiares por su origen mexicano.

En este estudio analizamos estas cepas de maneras diversas: 1) con PCR-SSCP para determinar si es un buen método para detectar las mutaciones en el gen *rpoB* en forma presuntiva; 2) para confirmar la mutación, se realizó la secuencia nucleotídica; 3) se correlacionó la CIM con las mutaciones; y 4) se

estudió la frecuencia de las mutaciones para comparar nuestros hallazgos con la literatura.

V. Justificación

Recientemente se ha reconocido que el problema de la resistencia antimicrobiana de *M. tuberculosis* es importante en México, ya que se ha detectado en por lo menos seis regiones del país. Asimismo, sus consecuencias clínicas son graves, pues la ruta de transmisión de la enfermedad de persona a persona es a través del aire, por gotas de saliva excretadas por individuos con infección pulmonar, el número de fármacos antituberculosos es limitado, y el costo del tratamiento de cada paciente enfermo con *M. tuberculosis* resistente es muy elevado. Por ello, las cepas de *M. tuberculosis* multi-resistente presentan un gran daño a la sociedad. Los métodos actuales para detectar la resistencia a los antibióticos de primera línea (isoniacida, rifampicina, estreptomycin y etambutol) requieren de 2-3 semanas, debido a que *M. tuberculosis* se replica cada 18-24 horas. El tratamiento básico de la tuberculosis es con rifampicina e isoniacida, por ello es muy probable que las cepas que son resistentes a rifampicina lo sean también a isoniacida. Consecuentemente, la detección de resistencia a rifampicina se considera como un marcador de cepas multi-resistentes. Por otro lado, el mecanismo molecular de la resistencia a isoniacida en *M. tuberculosis* todavía no se conoce con certeza, en tanto que, el mecanismo molecular de resistencia a rifampicina se conoce muy bien

El mecanismo de resistencia a rifampicina se debe a las mutaciones en una región central del gen *rpoB* que codifica para la RNA polimerasa. Por lo tanto, es de vital importancia entender la naturaleza y la distribución de las mutaciones que confieren resistencia a rifampicina y desarrollar procedimientos rápidos y seguros para la detección de estos organismos, facilitar el tratamiento adecuado y prevenir su diseminación. Actualmente, los ensayos con DNA tienen sensibilidad y especificidad alta, de tal manera que es posible la detección rápida de la resistencia a rifampicina en aislados de *M. tuberculosis*.

VI. Objetivos:

1. **Objetivo general:** Identificar las mutaciones en el gen *rpoB*, involucradas en la resistencia a rifampicina en aislados clínicos de *M. tuberculosis* resistente a concentraciones elevadas de este antibiótico.

2. **Objetivos específicos:**

2.1 Investigar mutaciones no descritas en la región central del gen *rpoB*, que nos ayuden a elucidar el mecanismo de resistencia de aislados de *M. tuberculosis* resistentes a concentración elevada de rifampicina y su posible correlación con la concentración inhibitoria mínima.

2.2 Investigar las mutaciones descritas previamente en el gen *rpoB*, de aislados de *M. tuberculosis* resistente a concentraciones elevadas de rifampicina.

2.3 Determinar la utilidad del PCR-SSCP para detectar mutaciones en la región central de resistencia del gen *rpoB* de cepas de *M. tuberculosis*, resistente a concentraciones elevadas de rifampicina

2.4 Analizar la frecuencia de las mutaciones para comparar nuestros hallazgos con la literatura

VII. Hipótesis

El análisis de la región central de resistencia del gen *rpoB* de cepas de *M. tuberculosis* resistente a concentraciones elevadas de rifampicina (CIM 2-2048 μ g/mL), mostrará que dicha resistencia, se asocia con mutaciones iguales a las descritas previamente, a mutaciones nuevas y combinación de mutaciones.

VIII. Método

1 Población de estudio

Se incluyeron un total de 46 cepas de *M tuberculosis* recuperadas de esputo de pacientes de la ciudad de México. Los aislados fueron identificados por métodos convencionales. Todas las cepas fueron resistentes cuando menos a uno de los antibióticos primarios (isoniacida 0.1µg/mL, rifampicina 2 µg/mL, estreptomycin 6µg/mL, etambutol 7.5µg/mL). Treinta y cinco cepas fueron resistentes a rifampicina y 11 fueron sensibles. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y la concentración inhibitoria mínima (CIM) se realizaron con el método radiométrico (Becton Dickinson, Road Towson, MD, EUA) según recomendaciones del fabricante. La cepa *M. tuberculosis* H37Rv fue utilizada como cepa control sensible. La CIM de las 35 cepas resistentes a rifampicina se describe en la Tabla 1. Las once cepas susceptibles a rifampicina (CIM <0.5µg/mL) fueron resistentes a cuando menos un antibiótico de primera línea.

2. Definiciones

- a. Concentración crítica es la concentración del antibiótico que inhibe el crecimiento del 99% de la población bacteriana, pero que permite el crecimiento de la sub-población mutante resistente en una proporción crítica del 1% .
- b. Resistencia primaria, es aquella que presenta un aislado de *M. tuberculosis* de un paciente que no ha recibido previamente tratamiento antituberculoso.
- c. Resistencia secundaria es aquella que presenta *M. tuberculosis* aislado de un paciente que recibió previamente tratamiento antituberculoso
- d. *M. tuberculosis* resistente a rifampicina fue aquella cepa con CIM $\geq 2\mu\text{g/mL}$ de rifampicina.
- e. *M. tuberculosis* resistente a concentración alta de rifampicina fue aquella cepa con CIM $>128\mu\text{g/mL}$ de rifampicina.
- f. Estándar de oro de susceptibilidad fue la determinación de la CIM con el método radiométrico

- g. SSCP idéntico. Patrón electroforético en donde la posición de bandas es igual entre la cepa problema y la cepa control H37Rv
- h. SSCP diferente. Patrón electroforético en donde la posición de las bandas es diferente entre la cepa problema y la cepa control H37Rv.

IX. Metodología

1. Estandarización del PCR-SSCP

a. Obtención de DNA y amplificación del fragmento de 157pb.

Para realizar la estandarización del PCR-SSCP primero se realizó la extracción de DNA cromosomal de los 46 aislados de *M. tuberculosis*. El DNA fue extraído por métodos convencionales.⁸⁴ Se amplificó por PCR un fragmento de 157 pb (Región I de RpoB; Fig 1), con 10pmol de los oligonucleótidos TR8 (5'-TGACGTCGCGGACCTCCA) y el TR9 (5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT). Cada reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L; MgCl₂ 1.5 mM; mezcla de dCTP, dATP, dGTP y dTTP 100 mM (Gibco BRL, NY, EUA); *Taq* polimerasa 1 U (Gibco BRL, NY, EUA) y 2 μ L de DNA (10 ng/ μ L) de cada cepa. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (PTC-100 MJ Research Inc. Watertown, Mass. EUA). El programa consistió de un ciclo a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos: 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos y un ciclo 72°C por 8 minutos. En cada lote de muestras amplificadas, se utilizó un control positivo con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv y un control negativo con reactivos sin DNA. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2% (Gibco BRL) y teñidos con bromuro de etidio (10mg/mL) para observar la banda de 157pb

b. Preparación del amplicón para el análisis del SSCP.

Los productos amplificados se diluyeron 1:5 con una solución amortiguadora de EDTA 10 mM y SDS 0.1%. Se tomaron 3 μ L del amplicón diluido y se mezclaron con 3 μ L de amortiguador de carga (formamida al 80%, Tris-Boratos 50mM pH 8.3, EDTA 1 mM, Xilenciano! 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Posteriormente, los tubos se colocaron en un baño con agua a 94°C durante 2 minutos para desnaturalizar, y luego se colocaron en hielo 5 min.

- g. SSCP idéntico. Patrón electroforético en donde la posición de bandas es igual entre la cepa problema y la cepa control H37Rv.
- h. SSCP diferente. Patrón electroforético en donde la posición de las bandas es diferente entre la cepa problema y la cepa control H37Rv.

IX. Metodología

1. Estandarización del PCR-SSCP

- a. Obtención de DNA y amplificación del fragmento de 157pb.

Para realizar la estandarización del PCR-SSCP primero se realizó la extracción de DNA cromosomal de los 46 aislados de *M. tuberculosis*. El DNA fue extraído por métodos convencionales.⁸⁴ Se amplificó por PCR un fragmento de 157 pb (Región I de RpoB; Fig 1), con 10pmol de los oligonucleótidos TR8 (5'-TGCACGTCGCGGACCTCCA) y el TR9 (5'-TCGCCGCGATCAAGGAGT). Cada reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L; MgCl₂ 1.5 mM; mezcla de dCTP, dATP, dGTP y dTTP 100 mM (Gibco BRL, NY, EUA); Taq polimerasa 1 U (Gibco BRL, NY, EUA) y 2 μ L de DNA (10 ng/ μ L) de cada cepa. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (PTC-100 MJ Research Inc. Watertown, Mass. EUA). El programa consistió de un ciclo a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos: 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos y un ciclo 72°C por 8 minutos. En cada lote de muestras amplificadas, se utilizó un control positivo con DNA de *M. tuberculosis* H37Rv y un control negativo con reactivos sin DNA. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2% (Gibco BRL) y teñidos con bromuro de etidio (10mg/mL) para observar la banda de 157pb.

- b. Preparación del amplicón para el análisis del SSCP.

Los productos amplificados se diluyeron 1.5 con una solución amortiguadora de EDTA 10 mM y SDS 0.1%. Se tomaron 3 μ L del amplicón diluido y se mezclaron con 3 μ L de amortiguador de carga (formamida al 80%, Tris-Boratos 50mM pH 8.3, EDTA 1 mM, Xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Posteriormente, los tubos se colocaron en un baño con agua a 94°C durante 2 minutos para desnaturalizar, y luego se colocaron en hielo 5 min.

c. Preparación de los geles de poliacrilamida

Se utilizaron diferentes concentraciones de poliacrilamida 6, 7 y 12%. Los geles se prepararon a partir de una solución concentrada de poliacrilamida:bis 30:0.8% Asimismo, se probaron diferentes fuerzas iónicas del amortiguador utilizando: TBE 1X (Trizma-base 90 mM, ac. Bórico 90 mM y EDTA 2.7 mM) y 0.5X para la electroforesis. Se evaluaron dos tiempos de corrida con diferente voltaje en cada gel. El primer voltaje para la entrada del amplicón en el gel y el segundo para la corrida completa. En la Tabla 2, se muestran las condiciones utilizadas. Posteriormente, los fragmentos amplificados de las cepas en estudio y la cepa control H37Rv, fueron separados en los geles, los cuales fueron revelados con plata⁸⁵. Las condiciones de concentración de poliacrilamida, fuerza iónica y tiempo de corrida de la electroforesis idóneas, se eligieron por la nitidez y resolución de las bandas. El tamaño de los geles fue siempre de 14x10x1.5cm. Se analizaron tres diferentes productos de PCR de cada cepa, cinco veces cada uno.

d. Detección del SSCP por el método radiactivo.

Con el fin de observar si se mejoraba la sensibilidad del SSCP, se realizó la amplificación del fragmento de 157pb marcando 10pmol de los oligonucleótidos TR8 y TR9 con 5 μ Ci de [α -³²P]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech Buckinghamshire, England). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 μ L, MgCl₂ 1.5 mM, dATP, dGTP, dTTP 500 mM, *Taq* polimerasa 1 U y 2 μ L (10 ng/ μ L) de DNA de cada cepa. La amplificación se llevó a cabo con el mismo programa usado por el método no radiactivo y el mismo tipo de controles

Los productos de amplificación marcados con [α -³²P]dCTP fueron preparados como los productos amplificados por el método no radiactivo y se cargaron en geles de poliacrilamida a concentración final de 12%. La electroforesis se corrió a 6 W por 12 horas en una cámara de secuencia (Gibco BRL) con amortiguador TBE 1X (Trizma-base 90 mM, ácido bórico 90 mM y EDTA 2.7 mM). El tamaño de los geles fue de 20cm x 40 cm x 0.2 mm. Después de la electroforesis, los geles fueron transferidos a papel Whatman # 3 y se colocaron en un secador de geles (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA) a 80 °C por 1 hora

Posteriormente, los geles se expusieron en un caset con una película de rayos X Kodak, BioMax, México, D.F.) y fueron revelados a las 24 horas

2. Secuenciación nucleotídica

Para corroborar las mutaciones en las cepas resistentes y su ausencia en las cepas sensibles, se realizó la secuencia nucleotídica de un fragmento de 411pb en el cual está contenido el fragmento de 157pb. Se amplificó el fragmento de 411pb con los oligonucleótidos TR1 y TR2. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L: MgCl₂ 0.7mM, mezcla de dCTP, dATP, dGTP, y dTTP 100 μ M, Taq polimerasa 1U y 2 μ L de DNA (10ng/ μ L) de cada cepa. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (PTC-100, MJ Research Inc.) el programa consistió de: un ciclo a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 94°C por minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y un ciclo final a 72°C por 8 minutos. En cada lote de muestras amplificadas, se utilizó un control positivo con DNA del control *M. tuberculosis* H37Rv y un control negativo de reactivos sin DNA. Los productos de PCR fueron probados en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (Gibco BRL) y teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) para observar la banda de 411pb. Los productos de PCR fueron purificados para eliminar el exceso de nucleótidos y de oligonucleótidos (Qiaquick Gel Extraction, Quiagen, Stanford, CA, EUA). La reacción de secuenciación de los productos purificados se hizo con el equipo de secuenciación fluorescente (Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA) y secuenciados directamente en un secuenciador automatizado Applied Biosystems 373 A (Perkin Elmer), según las instrucciones del fabricante.

3 *Análisis estadístico.* La sensibilidad y especificidad del método PCR-SSCP fueron determinadas con las tablas de contingencia de 2x2. La asociación entre la mutación específica y el grado de resistencia se calculó con la prueba de rangos señalados de pares igualados de Wilcoxon⁸⁶.

X. Resultados

1. Estandarización del PCR-SSCP.

Las condiciones para la estandarización del PCR-SSCP se presentan en la Tabla 2. La mejor resolución del PCR-SSCP se obtuvo en los geles con concentración de poliacrilamida al 12%, 200V, 10 minutos y después a 40V, 16 horas, en amortiguador TBE 0.5x. Se observó mejor resolución de las bandas de los productos amplificados en los geles de poliacrilamida al 12% en comparación con los de 7% (Fig. 2 y 3). En los geles revelados por el método radiactivo, se observaron tres bandas bien definidas (Fig. 4).

2. Análisis del PCR-SSCP.

Los ensayos de PCR-SSCP fueron repetidos al menos cinco veces para todos los aislados con tres diferentes amplicones y se obtuvo un 100% de reproducibilidad. De acuerdo con los resultados del PCR-SSCP, de cada una de las 35 cepas resistentes a rifampicina, se obtuvieron dos grupos : el grupo uno, con 24 cepas resistente (68.6%) con CIM variable, las cuales presentaron SSCP idéntico al de la cepa control sensible H37Rv; y el grupo dos, con once aislados (31.4%) con SSCP diferente. Estos resultados dieron una sensibilidad global del método PCR-SSCP de 31.4% y especificidad del 100%. En el grupo dos se presentaron cuatro polimorfismos a los cuales se les asignó en forma arbitraria polimorfismo 1, 2, 3 y 4 (Tabla 3, Fig. 5). Hubo correlación entre el polimorfismo con la mutación, se observó que cuatro cepas con el polimorfismo 4 y tres cepas con el polimorfismo 3 presentaron mutación en el codon 526 (Tabla 3). No hubo correlación entre el SSCP y la CIM, pues cada cepa tuvo CIM diferente. Las once cepas susceptibles a rifampicina mostraron SSCP idéntico al control H37Rv (Fig 2).

Cuando comparamos los resultados del PCR-SSCP entre los métodos radiactivo y la tinción con plata, solo hubo diferencia en una cepa resistente a rifampicina que mostró SSCP diferente con el método radiactivo.

3. Análisis y frecuencia de las mutaciones en el gen *rpoB*

No se encontraron mutaciones en la región de 157pb del gen *rpoB* (Región I de RpoB, Fig. 1), en las once cepas de *M. tuberculosis* susceptibles a rifampicina. En las 35 cepas resistentes, se identificaron mutaciones en siete codones que produjeron 13 cambios de aminoácidos; "transversion" en 24 cepas y "transition" en 11 cepas (Tabla 4) La frecuencia de las mutaciones fue: 15 aislados presentaron mutación en el codón 531 y nueve en el codón 526, cinco en el codón 516, tres en el codón 513, uno en el codón 522, uno en el 533 y uno en el 572.

En el codón 531, todos los aislados presentaron cambio de nucleótido por "transversion". El cambio de aminoácido más frecuente fue Ser/Leu (TCG/TIG). En el codón 526, cinco cepas presentaron mutación por "transversion" CAC/TAC (His/Tyr) y cuatro por "transition" CAC/GAC (His/Asp). Asimismo, se encontró que 7/9 cepas con mutación en el codón 526 presentaron los polimorfismos 3 y 4 (Tabla 3). En el codón 516 se presentó mutación en cinco aislados, el cambio que se produjo fue solamente la "transition" GAC/ GTC (Asp/Val), en el codon 513 se presentó mutación en tres aislados, dos de ellos presentaron mutación por "transversion" y uno por "transition", uno en el 522 por "transition", uno en el 533 y uno en el 572, en éstos dos últimos el cambio fue una "transition". En el codon 531 se identificaron tres alelos no descritos previamente (Ser/Pro, Ser/Phe, Ser/Ala), y en este grupo de cepas no se encontraron remociones ni inserciones (Fig. 2) (Tabla 4).

4. Correlación entre la CIM y las mutaciones

Encontramos mutaciones en codones específicos asociados con el nivel de resistencia. Se observó que los codones 513 (mediana CIM=2048µg/mL, p=0.001), codón 526 (mediana CIM=2048µg/mL, p=0.002) y el codón 531 (mediana CIM=256µg/mL, p=0.002) tienen una CIM significativamente alta con respecto a la mutación en el codón 516 (mediana CIM=8 µg/mL). Las cepas de bajo nivel de resistencia (2-8 µg/mL), presentaron mutación en los codones 522, 533, y el 572. (Tabla 5)

XI. Discusión

Los resultados de este trabajo muestran que todas las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina estudiadas presentaron mutaciones en el gen *rpoB*. Asimismo, encontramos mutaciones específicas en este gen asociadas con el grado de resistencia a rifampicina. Además, se determinó la frecuencia de las mutaciones y comprobamos que no existe distribución geográfica por mutaciones en *rpoB* como lo habían postulado otros investigadores^{69,87}. También observamos que el PCR-SSCP no es un método útil para la detección de mutaciones en el gene *rpoB*, de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina.

Para comprobar que las cepas estudiadas estaban mutadas, realizamos la secuencia nucleotídica de un fragmento de 411 pb el cual contiene el fragmento de 157pb de la región central de resistencia (RCR) del gen *rpoB*. Las 35 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina presentaron mutación (Tabla 4). Estos resultados muestran que hubo correlación entre el fenotipo y el genotipo resistente con la presencia de la mutación.

Todas las cepas con CIM $\geq 128\mu\text{g/mL}$ presentaron mutaciones en los codones 513, 526 o 531 como se ha descrito en estudios previos^{67-71,88,89,90}. Las mutaciones en los codones 526 (26%) y 531 (43%) fueron los más frecuentes en nuestras cepas. En un estudio de revisión reciente⁷¹, en donde se mostraron los resultados de mutaciones en el gen *rpoB* de 478 aislados de *M. tuberculosis* de diferentes partes del mundo, se muestra una frecuencia de mutaciones de 41% en el codon 531 y de 36% en el codon 526; estos resultados podrían apoyar la idea de que las mutaciones en estos codones son críticos para el desarrollo de resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis* y para su supervivencia⁹¹. Recientemente, se ha descrito en *E. coli*⁹² que la supervivencia de la bacteria en presencia del antibiótico se debe a mutaciones compensatorias y no por la reversión de la susceptibilidad en forma espontánea como se había pensado siempre. En este estudio, los investigadores pudieron observar que las mutantes aisladas, después de 200 generaciones fueron más capaces de adaptarse al antibiótico que su progenie ancestral y no observaron asociación entre la

capacidad y el nivel de resistencia a rifampicina. En las cepas de ese estudio, la mutación más frecuente fue Asp516/Gly, lo que no ocurre en *M. tuberculosis* en donde se ha observado que se presenta en una minoría de las cepas estudiadas y el cambio en este codón es por valina y no por glicina⁷¹. También se ha reportado la presencia de mutación en Asp516/Gly en 2-8% de las cepas estudiadas de *S. pneumoniae*⁶¹ y *S. aureus*⁵⁹. En nuestro estudio, en cinco cepas se encontró mutación en el codón Asp516/Val que corresponde al 14.3% del total de nuestras cepas resistentes.

Por otro lado, Billington y cols.,⁹⁰ estudiaron mutantes resistentes a rifampicina obtenidas *in vitro* de la cepa H37Rv, para determinar la frecuencia de mutaciones. Ellos encontraron que la mutación más común fue Ser531/Leu, seguida de His526/Asp. Además, demostraron que estas mutaciones representan el menor costo fisiológico para la bacteria (capacidad de crecimiento de la bacteria en presencia del antibiótico). Ellos trabajaron con organismos nuevos sin resiembras de muchas generaciones y no tuvieron la oportunidad de adaptación por mutaciones compensatorias, lo que podría sugerir que en *M. tuberculosis* la presencia de mutación en los codones 531 y 526 es inmediata, y presentan mayor capacidad para sobrevivir en presencia del antibiótico y generar así un aislado resistente a rifampicina. Esta hipótesis podría estar sustentada por otro estudio que también fue realizado en mutantes resistentes a rifampicina de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv obtenidos *in vitro*, en donde se observó también que la mutación más frecuente fue Ser531/Leu.⁹³ Sin embargo, es necesario hacer experimentos a largo plazo para demostrar si en *M. tuberculosis* se presentan mutaciones compensatorias.

Por otro lado, en los codones 531 y 526 se produce un cambio de aminoácido polar por un no polar. Se ha demostrado que la unión rifampicina RNA polimerasa es de carácter lipofílico⁴⁰, probablemente dicho cambio en estos codones sea la razón por la cual estas mutaciones se presenten con mayor frecuencia, para producir resistencia. (Tabla 4)

Con respecto al codón 526, nosotros encontramos frecuencia similar (25.7%) a la de cepas estudiadas en otras partes del mundo⁷¹ con excepción de

las cepas de la India⁹⁴ en donde la frecuencia de esta mutación fue sólo del 6%. Esta mutación también ha sido encontrada en el 30% de las cepas estudiadas de *S. pneumoniae* y en el 46% combinada con una mutación en el codon 516⁶¹. En *M. leprae* el codon 526 también es una mutación frecuente⁵⁵, en tanto que en *L. monocytogenes* esta mutación no se ha presentado.⁶⁰

Cuando comparamos el grado de resistencia con la mutación, encontramos asociación estadísticamente significativa. Las mutaciones en los codones 513, 526 y 531 estuvieron asociados con concentración elevada de rifampicina, en tanto que las mutaciones en el codon 516 estuvieron asociadas con concentración baja ($p < 0.005$) (Tabla 5), en contraste con los resultados de otros investigadores, que han demostrado que la mutación en el codon 516 se puede encontrar en cepas con alto y bajo grado de resistencia a rifampicina.^{68,95,96} Estas diferencias reflejan el complejo papel entre el blanco y el antibiótico a nivel molecular, donde la posición del alelo afectado es crítico. Asimismo, se puede observar que en los codones 513, 526 y 531 en donde se presenta el nivel de resistencia más alto a rifampicina, no hay correlación entre la CIM y el cambio de aminoácido, por ejemplo, en el caso de la mutación en el codon 513, en donde dos cepas tienen un cambio de aminoácido Gln/Lys. Una de ellas, tiene CIM de 2048 μ g/mL, y la otra tiene CIM de 256 μ g/mL, lo esperado en este caso, es que ambas cepas tuvieran la misma CIM. El mismo fenómeno se observa en el codon 531 en donde se produce con mayor frecuencia el cambio de Ser/Leu con un amplio intervalo de resistencia (32-2048 μ g/mL) Podríamos especular, que la presencia de mutaciones en otras regiones conservadas en RpoB, combinadas con la mutación detectada, aumentan el nivel de resistencia en estas cepas. Como nosotros solo analizamos la Región I (Fig. 1), no pudimos detectar mutaciones adicionales en las otras regiones. Por ello, sería importante secuenciar la subunidad β completa de RpoB de las mutantes y comprobar que realmente existen otras mutaciones que incrementen la CIM.

En trabajos previos se han reportado mutaciones fuera de la región de 81pb (codon 504, 541, 553 y codon 572)^{97,98,99}. Nosotros encontramos una mutación

fuera de la región de 81 pb del gen *rpoB* (codon 572) en una cepa con CIM= 2µg/mL, mutación que podría estar asociada con la resistencia de esta cepa.

Recientemente, se han encontrado mutaciones en la región conservada B de la subunidad β de RpoB (Fig. 1), tanto en *M. tuberculosis*¹⁰⁰ como en otros géneros de bacterias: específicamente en los codones 149 de *Helicobacter pylori*¹⁰¹, 151, 201 y 271 de *Rickettsia typhi*⁶², 159 de *Legionella pneumophila*⁶⁴ y 137 de *S. aureus*¹⁰². La presencia de estas mutaciones vinculadas a resistencia a rifampicina, se debe a las mutaciones en una región conservada pero diferente a la que se presenta con mayor frecuencia en *M. tuberculosis*.

En un estudio reciente¹⁰³, se describió la estructura cristalográfica de la RNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, se comparó la secuencia nucleotídica de cuatro regiones conservadas (I, II, III y una amino terminal de la región B, Fig. 1) de la subunidad β de RpoB (donde se presentan las mutaciones relacionadas con resistencia a rifampicina de *E. coli*, *T. aquaticus* y *M. tuberculosis*). Se encontró que dichas secuencias son 91% idénticas, lo que explica el amplio espectro de actividad de la rifampicina entre los organismos procariontes. No obstante, entre las 23 posiciones con la sustitución de aminoácidos que confieren resistencia a rifampicina en *E. coli* y *M. tuberculosis* solo cinco de éstas se presentaron en *T. aquaticus* (387, 395, 398, 453, y 566); por lo tanto, como las regiones son muy conservadas, es factible que podamos encontrar en todo organismo procarionte, mutaciones en cualquiera de las regiones conservadas de RpoB. Por el contrario, en eucariontes estas regiones están muy poco conservadas, lo que explica la inactividad de la rifampicina contra la RNA polimerasa de los organismos eucariontes.

Encontramos tres alelos no descritos previamente en el codon 531, Ser/Ala, Ser/Phe y Ser/Pro. A pesar del gran número de mutaciones reportadas en otros estudios, la evidencia de nuevos alelos encontrados en nuestro estudio, indican que las mutaciones son diversas, probablemente por la capacidad de adaptación de *M. tuberculosis* a la exposición de antibióticos.

La frecuencia de las mutaciones en los codones 531 y 526 en cepas de *M. tuberculosis* de diferentes partes del mundo, y en las cepas de este estudio,

indican que no hay distribución geográfica precisa de las mutaciones en el gene *rpoB* como se había señalado en estudios anteriores.^{69,66}

El PCR-SSCP ha mostrado ser un método bueno para la detección de mutaciones tipo "transversion" o "transition", inserciones y remociones en células de eucariontes, responsables de varias enfermedades genéticas en humanos.^{60,81} En estos trabajos, se ha descrito que para mejorar la sensibilidad y reproducibilidad del método, es necesario controlar variables como la concentración de poliacrilamida en los geles, el voltaje, la fuerza iónica y el tamaño del fragmento que se quiere analizar. Nosotros probamos tres concentraciones de poliacrilamida (6%, 7% y 12%), y dos tiempos de corrida con voltaje diferente y dos concentraciones del amortiguador (tabla 2), para la electroforesis. En los geles de poliacrilamida al 6% no se pudo observar si había SSCP diferente, en tanto que en los geles al 7% se observó polimorfismo sólo en 9/35 cepas resistentes a rifampicina.

Para elegir las condiciones más apropiadas para el análisis de las 46 cepas, tomamos en cuenta la resolución de las bandas del SSCP y la reproducibilidad. Las condiciones fueron: geles de poliacrilamida al 12%, y electroforesis inicial a 200V por 10 minutos y un segundo tiempo de electroforesis a 40V 16 horas. Con estas condiciones, observamos la mejor resolución de las bandas; sin embargo, sólo se detectó polimorfismo en 11/35 cepas (Fig 5). A pesar de detectar polimorfismo sólo en 11 cepas, se observó que siete de ellas coincidieron con mutación en el codón 526. En estas cepas, la presencia del mismo polimorfismo con una sustitución idéntica de aminoácido, llama la atención que tengan una CIM diferente, ello sugiere la posibilidad de que haya mutaciones en otras regiones no estudiadas relacionadas con resistencia a concentraciones elevadas del antibiótico, que pudieron ser detectados con el PCR-SSCP. Podemos apoyar esta hipótesis, con el hallazgo de dos cepas que presentaron mutación en este codón, una con cambio de aminoácido His/Tyr y con CIM= 2048µg/mL, y la otra con cambio His/Asp con CIM= 128µg/mL (Tabla 4). En estas dos cepas no fue posible detectar la mutación con el PCR-SSCP, a pesar de que el cambio de aminoácido fue igual al de las cepas en donde si fue detectada la mutación con PCR-SSCP.

Por ello, será necesario realizar la secuencia nucleotídica completa de la subunidad β de RpoB de las dos mutantes

En los primeros estudios donde se realizó el SSCP para la detección de mutaciones⁶⁷, se utilizaron oligonucleótidos marcados con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Se sabe que la radiactividad se asocia con mayor sensibilidad, sin embargo, es un riesgo para el usuario y no se puede realizar fácilmente en un laboratorio clínico. Por estas razones, nosotros utilizamos la tinción con plata para detectar el SSCP, dado que se ha difundido como una tinción de ácidos nucleicos muy sensible. La tinción con plata nos permitió observar el patrón electroforético con bandas bien definidas. A pesar de estos resultados, sólo pudimos observar SSCP diferente en 11/35 cepas resistentes a rifampicina (Fig 5). Estos resultados producen controversia con lo reportado por otros investigadores, que demostraron una clara asociación entre las mutaciones y el SSCP. Mas aún, actualmente están utilizando este método para detectar mutaciones en otros genes que confieren resistencia a otros antibióticos y han informado buenos resultados.¹⁰⁴ Con la idea de mejorar la sensibilidad del SSCP, hicimos un experimento en donde marcamos los oligonucleótidos con radiactividad y utilizamos las condiciones estandarizadas del SSCP. Cuando comparamos los resultados del experimento realizado con radiactividad y el revelado con tinción con plata, encontramos diferencia solamente en una cepa resistente, la cual tuvo SSCP distinto. Por lo tanto, a pesar del uso de la radiactividad, nuestros resultados muestran que el SSCP es una metodología incapaz de detectar mutaciones en el gen *rpoB* de *M. tuberculosis*, descartando que la pobre sensibilidad sea por el método de revelado.

Otro resultado interesante en este trabajo, fue el SSCP idéntico a la cepa control H37Rv en las once cepas sensibles a rifampicina; es decir, la especificidad del método fue del 100%. Este resultado fue reproducido con las dos formas de revelado. Además, 24/35 (68.6%) cepas resistentes a rifampicina tuvieron SSCP igual a la cepa control. Es decir, sólo detectamos resistencia a rifampicina por SSCP en once de los aislados. Estas discrepancias han sido reportadas también por otros investigadores en Corea⁹⁶, quienes encontraron 17/67 aislados de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina con el mismo SSCP que la cepa control.

Ellos concluyeron que las condiciones para la realización del SSCP no fueron las apropiadas. Otros investigadores¹⁰⁵, también han encontrado discrepancias en la detección de mutaciones con el PCR-SSCP y mencionan que el método no ofrece la suficiente sensibilidad para detectar < 10% de la subpoblación mutante. Sin embargo, sus resultados podrían explicar la incapacidad del método para detectar mutaciones como se observó en este trabajo.

La reproducibilidad del método fue del 100%. Esta se calculó en base a la realización de los ensayos del SSCP de tres diferentes productos de PCR, cinco veces cada uno. Con esta reproducibilidad, se demostró que las variables inherentes al método, fueron controladas y que nuestros resultados fueron confiables.

Con el conocimiento de las mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a resistencia a rifampicina, es posible diseñar nuevos métodos para detectar dicha resistencia basados en la amplificación de DNA con PCR y con diferentes formas de marcaje no radiactivo, con sensibilidad igual o superior a los isótopos radiactivos.

En los últimos cinco años, los métodos para detectar mutaciones se han caracterizado por mejorar la sensibilidad, la especificidad y la reducción del tiempo, para dar el resultado de resistencia al clínico en forma rápida, utilizando herramientas moleculares sofisticadas, pero con la desventaja de la necesidad de infraestructura y reactivos muy caros. En general, en la mayoría de los métodos se amplifica la región central de resistencia del gen *rpoB* por PCR. Lo que los diferencia es la forma de detección de la mutación, ya sea por hibridación en solución, con el consiguiente corrimiento electroforético en geles con desnaturalizante o geles con doble gradiente de poliacrilamida, como en las metodologías "DG-DGGE"¹⁰⁶, "PCR-heteroduplex"⁷³ y "dideoxy fingerprinting"⁷⁶. Estos métodos tienen el principio del SSCP pero con mejor sensibilidad, para la detección de las mutaciones. En estudios recientes, realizados con estas metodologías, se ha observado la posibilidad de detectar mutaciones en las cepas con fenotipo resistente, así como la detección de la mutación en el codón 531 con un patrón de tres bandas. En estos estudios, esta mutación no fue detectada por

el SSCP. Por otro lado, cuando se probó el método "PCR-heteroduplex"⁷³, para detectar mutaciones en muestras de tejido, se observó que este método fue menos sensible que el SSCP y la PCR-semi-anidada¹⁰⁷. Los investigadores suponen que el problema fue en la obtención del DNA de las muestras y concluyen que la sensibilidad mostrada por el método PCR-heteroduplex es bueno, para detectar resistencia a rifampicina en cepas de *M. tuberculosis*, pero subrayaron la necesidad de tener controles y métodos apropiados para la extracción del DNA de la muestra.

El método Inno-LIPA^{108,109} está basado en hibridación reversa. Este método utiliza sondas diseñadas con una mutación específica. Estas sondas son inmovilizadas en tiras de nitrocelulosa y posteriormente se hibridan con la región central de resistencia de *rpoB* marcada con biotina. La detección de las mutaciones se revelan por colorimetría, utilizando estreptavidina, fosfatasa alcalina y un substrato cromogénico. Esta metodología tiene las ventajas de ser un producto comercializado con los reactivos necesarios para realizar la prueba, y la detección de las mutaciones se lleva a cabo en un día; sin embargo, tiene la desventaja de detectar solamente las 5 mutaciones más frecuentes. En diversos estudios realizados con esta metodología, se ha observado una correlación del 90-95% entre las pruebas de susceptibilidad convencionales y la detección de mutaciones, y de 94-100% entre las mutaciones detectadas y la secuencia nucleotídica.

Otro método es el "PCR-Enzyme-Linked-immunosorbent assay".¹¹⁰ Este método utiliza sondas de captura, las cuales son sintetizadas con la secuencia de la cepa silvestre y con la secuencia que incluye la mutación que se busca. Las sondas son inmovilizadas en una placa de ELISA cubiertas con estreptavidina. Se amplifica la región central de resistencia del gen *rpoB* marcada con digoxigenina y se hibrida con la sonda de captura. La detección de las mutaciones se hace con anticuerpos anti-digoxigenina. Este método tuvo una correlación del 90% con la secuencia nucleotídica en 11 aislados de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina y la prueba se realizó en 24 horas

En los últimos dos años, se han desarrollado métodos moleculares para la detección de resistencia en *M. tuberculosis*, basados en el uso de biochips con oligonucleótidos inmovilizados en una almohadilla de gel de poliacrilamida. Los oligonucleótidos fueron diseñados para analizar un fragmento de 81 pares de bases del gen *rpoB*, donde se localiza la región central de resistencia.⁷⁷

El método MAGI-chip¹¹¹ consiste de microarreglos de oligonucleótidos, y se basa en la hibridación perfecta o imperfecta entre el DNA blanco marcado con fluorescencia y sondas inmovilizadas en la almohadilla de gel de poliacrilamida. La intensidad de la fluorescencia en la almohadilla indica la presencia y la naturaleza de la mutación. Esta prueba incluyó 42 oligonucleótidos y puede detectar 30 mutaciones de las más comunes en el gene *rpoB*: este método se puede realizar en 24 horas.

Los microarreglos de DNA de alta densidad es la tecnología desarrollada por Affymetrix¹¹² y se basa en la hibridación del DNA blanco con oligonucleótidos localizados en forma precisa en una placa de vidrio miniaturizada. En esta placa, se han colocado fragmentos de DNA del gen 16S y fragmentos de DNA con las mutaciones del gen *rpoB*. Así, en un solo ensayo, es posible la identificación de las especies de micobacteria y detectar la resistencia a rifampicina. Su principal ventaja es que en un solo ensayo es posible monitorear la resistencia a varios antibióticos, pues se puede colocar todas las mutantes que se deseen en un microarreglo. Sus principales desventajas son el costo, la necesidad de personal especializado y la dificultad en su interpretación.

Todos los ensayos descritos han mostrado capacidad para encontrar mutaciones, sin embargo, en la mayoría de los estudios, se ha enfocado a la búsqueda de mutaciones en la región central de resistencia del gen *rpoB*, la cual está constituida por 81 pares de bases en donde se presentan con más frecuencia las mutaciones. Pero en algunos otros estudios, se ha podido constatar mediante experimentos de reconstitución, que se pueden encontrar mutaciones en otras regiones del gen *rpoB* que confieren resistencia a rifampicina como es el caso de las mutaciones en los nucleótidos 146 y 176 en cepas de *M. tuberculosis*¹¹³, en el

verdaderamente resistentes, se puede probar cualquier antibiótico y el tiempo en que se realiza es muy corto con respecto a las pruebas convencionales.

Por lo tanto, en la actualidad existen muchos métodos para detectar resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis*, pero las metodologías más prometedoras son los microarreglos y el ensayo reportero de la luciferasa.

XII. Conclusiones

1. Todas las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina probadas en este estudio, tuvieron mutaciones en la Región I de RpoB (Fig. 1). Sin embargo, contrario a lo que se esperaba no encontramos mutaciones en codones diferentes a los reportados previamente ni combinación de mutaciones.
2. Existe la posibilidad de que haya mutaciones en otras regiones conservadas de RpoB.
3. Hubo asociación entre el grado de resistencia a rifampicina y las mutaciones identificadas.
4. El 68.6% de las cepas de *M. tuberculosis* analizadas en este trabajo tuvieron mutación en los codones 531 y 526, como sucede en la mayoría de las cepas probadas de diferentes partes del mundo, lo que confirma que no existe diversidad geográfica por mutaciones en el gene *rpoB*.
5. Las condiciones de estandarización del método PCR-SSCP fueron las apropiadas para obtener reproducibilidad del 100%. Sin embargo, en nuestras manos, el PCR-SSCP no es una herramienta confiable para la detección de resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis*.
6. No hubo correlación entre el SSCP y la CIM en los once aislados resistentes a rifampicina con SSCP diferente.
7. Además, los resultados de este estudio confirman que hay un patrón universal de mutaciones en el gene *rpoB*, así como la presencia de nuevos alelos entre las cepas de *M. tuberculosis* de México.

XIII. Perspectivas

La evidencia de que algunas de las cepas estudiadas en este trabajo tengan el mismo cambio de aminoácido pero con diferente CIM, nos invita a considerar la posibilidad de que estas cepas tengan mutaciones en otras regiones conservadas de RpoB. Por estos hallazgos, una perspectiva de este trabajo es continuar la búsqueda de mutaciones en otras regiones realizando la secuenciación completa de mutantes con alta y baja resistencia y con mutación en el mismo aminoácido.

Por otro lado, el conocimiento de las mutaciones específicas que confieren resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis* en diferentes partes del mundo, deberán ser consideradas para la genotipificación del gene *rpoB* como una herramienta epidemiológica para diferenciar los aislados de *M. tuberculosis* sensibles y resistentes a rifampicina.

Asimismo, las mutaciones encontradas en este estudio que producen nuevos alelos en el 531 deberán ser también consideradas para la detección de resistencia a rifampicina en los métodos actuales y en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico de resistencia a nivel molecular

Tabla 1. Resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos primarios y la concentración inhibitoria mínima (CIM) a rifampicina de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* probados en el estudio

No. Cepa ¹	Estrepto ²	INH ³	RIFA ⁴	EMB ⁵	C IM de RIFA µg/mL
5	S	S	R	S	256
7	S	R	R	S	2048
15	R	S	S	S	0.5
21	R	S	S	S	0.5
23	S	S	S	S	0.5
35	R	R	R	R	8
36	S	R	R	S	128
46	S	R	R	S	2048
53	S	S	S	S	0.5
54	S	R	R	S	2048
58	R	R	R	S	256
62	R	R	R	S	256
74	S	R	R	S	2048
77	S	R	R	S	8
78	S	R	R	S	2
82	S	S	S	S	0.5
83	R	S	S	S	0.5
84	R	R	R	R	8
85	S	R	R	S	16
86	R	R	R	S	1024
88	S	S	S	S	0.5
91	R	R	R	R	2
96	S	R	R	S	32
99	S	R	R	S	8
107	S	R	R	S	256
111	S	R	S	S	0.5
130	R	S	S	S	0.5
134	S	R	R	S	2048
135	R	R	R	S	256
136	S	R	R	S	8
137	S	R	R	S	512
138	S	R	R	S	256
139	S	R	R	S	8
140	R	R	R	S	1024
143	R	R	R	S	2048
144	S	R	R	S	2048
147	S	R	R	S	2048
151	S	R	R	S	256
163	R	R	R	S	2048
5447	S	R	R	S	64
5029	R	S	S	S	0.5
5123	S	S	R	S	128
5068	R	R	R	S	256
5106	S	S	S	S	0.5
174	S	R	R	S	2048
44	S	S	R	S	64

¹número asignado a la cepa en el laboratorio, ²estreptomicina, ³isoniacida, ⁴rifampicina, ⁵etambutol

Tabla 2. Variables analizadas para la estandarización del PCR-SSCP.

Concentración de acrilamida (%)	Tiempo (min.) a		Fuerza iónica del amortiguador TBE*
	200V	40V	
6	2	10	0.5x, 1x
7	2	10	0.5x, 1x
12	10	16	0.5x, 1x
12**	10	12	0.5x, 1x

*amortiguador Tris- boratos-EDTA

**Esta condición experimental fue la utilizada para el método radiactivo.

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y polimorfismo conformacional de cadena sencilla (PCR-SSCP) de 11 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina con polimorfismo diferente de la cepa control H37Rv

No. de Cepa ¹	CIM de RIFA (µg/mL)	SSCP	Mutación
36	128	Polimorfismo 1	Ser531/Ala
143	2048	Polimorfismo 2	Ser531/Phe
78	2	Polimorfismo 2	Ser533/Pro
77	8	Polimorfismo 2	Ser522/Leu
58	256	Polimorfismo 3	His526/Asp
138	256	Polimorfismo 3	His526/Asp
74	2048	Polimorfismo 3	His526/Asp
5068	256	Polimorfismo 4	His526/Tyr
140	1024	Polimorfismo 4	His526/Tyr
46	2048	Polimorfismo 4	His526/Tyr
54	2048	Polimorfismo 4	His526/Tyr

¹número asignado a cada cepa en el laboratorio

Tabla 4. Resultados de las mutaciones y del polimorfismo conformacional de cadena sencilla de las 35 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina.

Cepa	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	SSCP	Mutación	Sustitución (aminoácido)
5068	256	Polimorfismo 4	CAC526/TAC	His/Tyr
46	2048	Polimorfismo 4	CAC526/TAC	His/Tyr
54	2048	Polimorfismo 4	CAC526/TAC	His/Tyr
163	2048	Idéntico H37Rv	CAC526/TAC	His/Tyr
140	1024	Polimorfismo 4	CAC526/TAC	His/Tyr
58	256	Polimorfismo 3	CAC526/GAC	His/Asp
74	2048	Polimorfismo 3	CAC526/GAC	His/Asp
5123	128	Idéntico H37Rv	CAC526/GAC	His/Asp
138	256	Polimorfismo 3	CAC526/GAC	His/Asp
5	256	Idéntico H37Rv	TCG531/TTG	Ser/Leu
62	256	Idéntico H37Rv	TCG531/TTG	Ser/Leu
135	256	Idéntico H37Rv	TCG531/TTG	Ser/Leu
144	2048	Idéntico H37Rv	TCG531/TTG	Ser/Leu
86	1024	Idéntico H37Rv	TCG531/TTG	Ser/Leu
139	8	Idéntico H37Rv	TCG531/CCG	Ser/Pro
36	128	Polimorfismo 1	TCG531/GCG	Ser/Ala
96	32	Idéntico H37Rv	TCG531/TTG	Ser/Leu
107	256	Idéntico H37Rv	TCG531/TTG	Ser/Leu
134	2048	Idéntico H37Rv	TCG531/TTG	Ser/Leu
5447	64	Idéntico H37Rv	TCG531/TTG	Ser/Leu
174	2048	Idéntico H37Rv	TCG531/TTG	Ser/Leu
44	64	Idéntico H37Rv	TCG531/GCG	Ser/Ala
137	512	Idéntico H37Rv	TCG531/TGG	Ser/Trp
143	2048	Polimorfismo 2	TCG531/TTC	Ser/Phe
7	2048	Idéntico H37Rv	CAA513/AAA	Gln/Lis
147	2048	Idéntico H37Rv	CAA513/CCA	Gln/Pro
151	256	Idéntico H37Rv	CAA513/CCA	Gln/Pro
35	8	Idéntico H37Rv	GAC516/GTC	Asp/Val
84	8	Idéntico H37Rv	GAC515/GTC	Asp/Val
85	16	Idéntico H37Rv	GAC516/GTC	Asp/Val
136	8	Idéntico H37Rv	GAC516/GTC	Asp/Val
99	8	Idéntico H37Rv	GAC516/GTC	Asp/Val
77	8	Polimorfismo 2	TCG522/TTG	Ser/Leu
91	2	Idéntico H37Rv	ATC572/TTC	Ile/Phe
78	2	Polimorfismo 2	CTG533/CCG	Leu/Pro

Tabla 5 Mutaciones en el gen *rpoB* encontradas en 35 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a rifampicina y su correlación con la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Codon de <i>rpoB</i>	Mutación específica	No. de cepas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	p^c
513	CAA/AAA(Gln/Lys)	1	2048	0.01
	CAA/AAA(Gln/Lys)	1	256	
	CAA/CCA(Gln/Pro)	1	2048	
516	GAC/GTC(Asp/Val)	5	8-16	0.01
526	CAC/TAC (His/Tyr)	1	256	
	CAC/TAC (His/Tyr)	1	1024	
	CAC/TAC(His/Tyr)	3	2048	
	CAC/GAC (His/Asp)	2	256	
	CAC/GAC (His/Asp)	1	128	
	CAC/GAC (His/Asp)	1	2048	
531	TCG/TTG (Ser/Leu)	1	32	0.002
	TCG/TTG (Ser/Leu)	1	64	
	TCG/TTG (Ser/Leu)	4	256	
	TCG/TTG (Ser/Leu)	1	1024	
	TCG/TTG (Ser/Leu)	3	2048	
	TCG/CCG (Ser/Pro) ^b	1	8	
	TCG/GCG (Ser/Ala) ^b	1	64	
	TCG/GCG (Ser/Ala) ^b	1	128	
	TCG/TGG (Ser/Trp)	1	512	
	TCG/TTG (Ser/Phe) ^b	1	2048	
522	TCG/TTG (Ser/Leu)	1	8	
533	CTG/CCG (Leu/Pro)	1	2	
572	ATC/ITC (Ile/Phe) ^a	1	2	

^a Esta mutación está localizada fuera de la región de 81pb del gene *rpoB* ^b alelos no descritos previamente

^c Wilcoxon-rank-sum test.

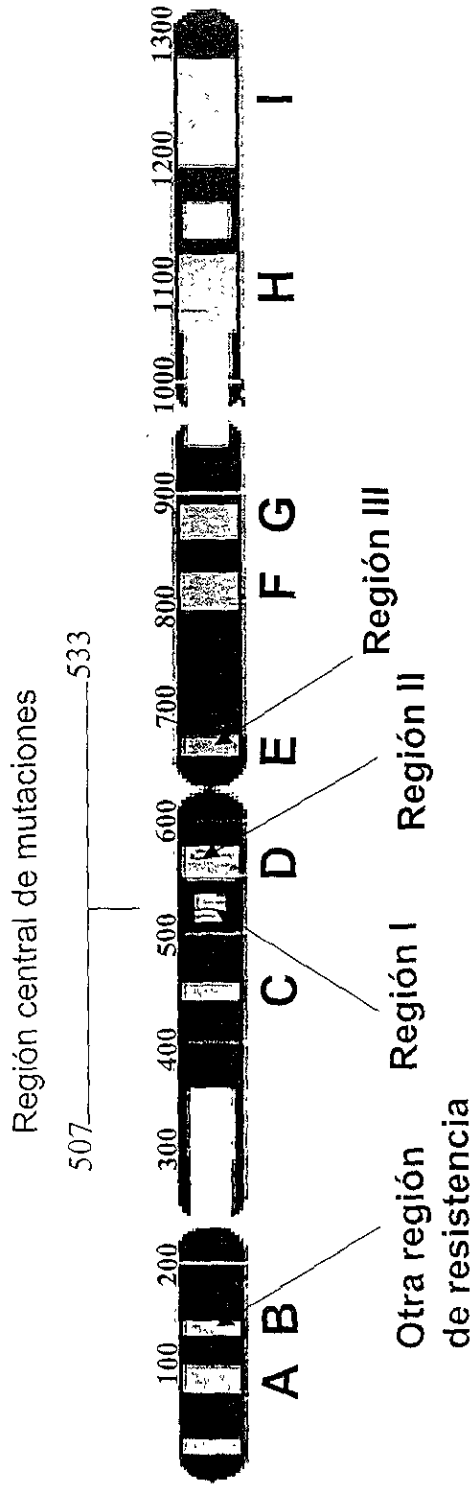


Figura 1. Representación esquemática de la subunidad β (RpoB) de la RNA polimerasa de *E. coli*. A-I fragmentos conservados entre organismos procariontes. Las regiones I (codones 505-533), II (codones 563-574) y III (codones 676-689) confieren resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis* y son las referidas en el texto. Las regiones II y III se ubican en los fragmentos D y E que están conservados entre bacterias. Otra región de resistencia a rifampicina se ubica en el fragmento conservado B. La numeración va del extremo amino al carboxi terminal. Tomada y modificada de Nopalka y cols., Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:617-22.

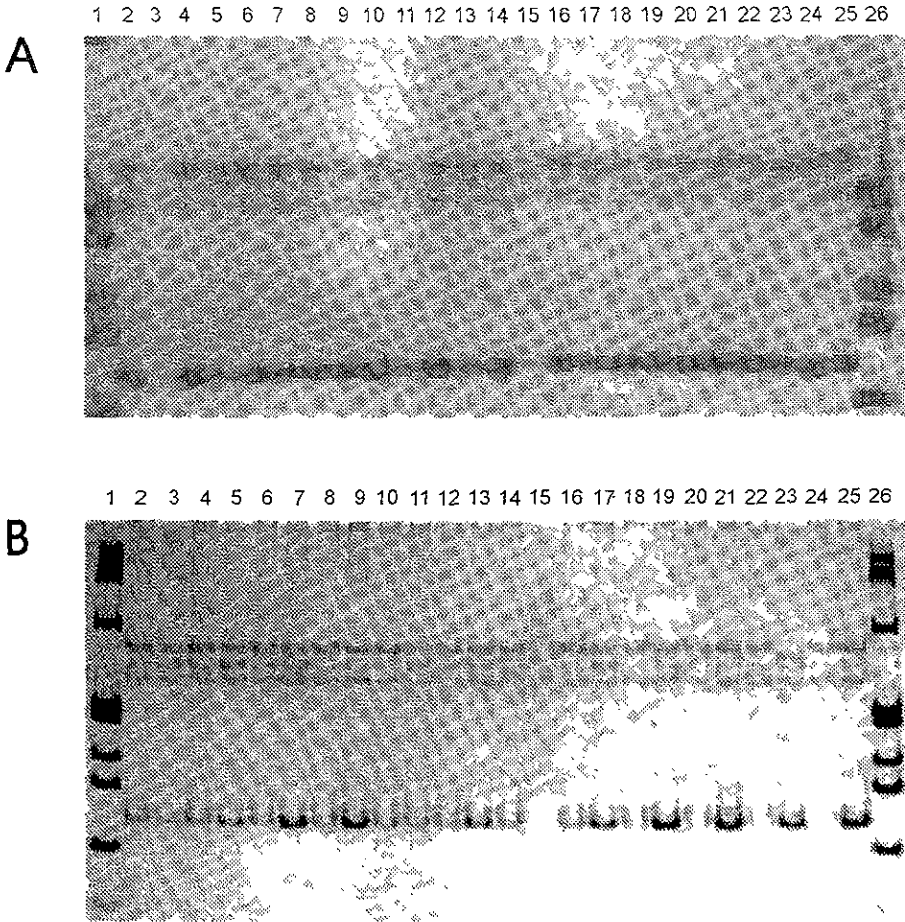


Fig. 2 Resultados del análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP). SSCP de las cepas de *M. tuberculosis* susceptibles a rifampicina (CIM <0.5 µg/mL). En **A** gel de poliacrilamida (7%) las condiciones de la electroforesis fueron TBE 0.5x, 200V 3 minutos, 40V 12 horas. El gel fue teñido con plata. Carril 1 y 26 marcador de peso molecular ϕ x174. Carriles 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22 y 24 muestran el SSCP de la cepa control H37Rv. Carriles 3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23 y 25 muestran el SSCP de las cepas de *M. tuberculosis* susceptibles a rifampicina. En **B** gel de poliacrilamida (12%) Las condiciones de electroforesis fueron TBE 0.5x, 200V 10 minutos, 40V 16 horas. El gel fue teñido con plata. Los carriles tienen las mismas muestras que en **A**.

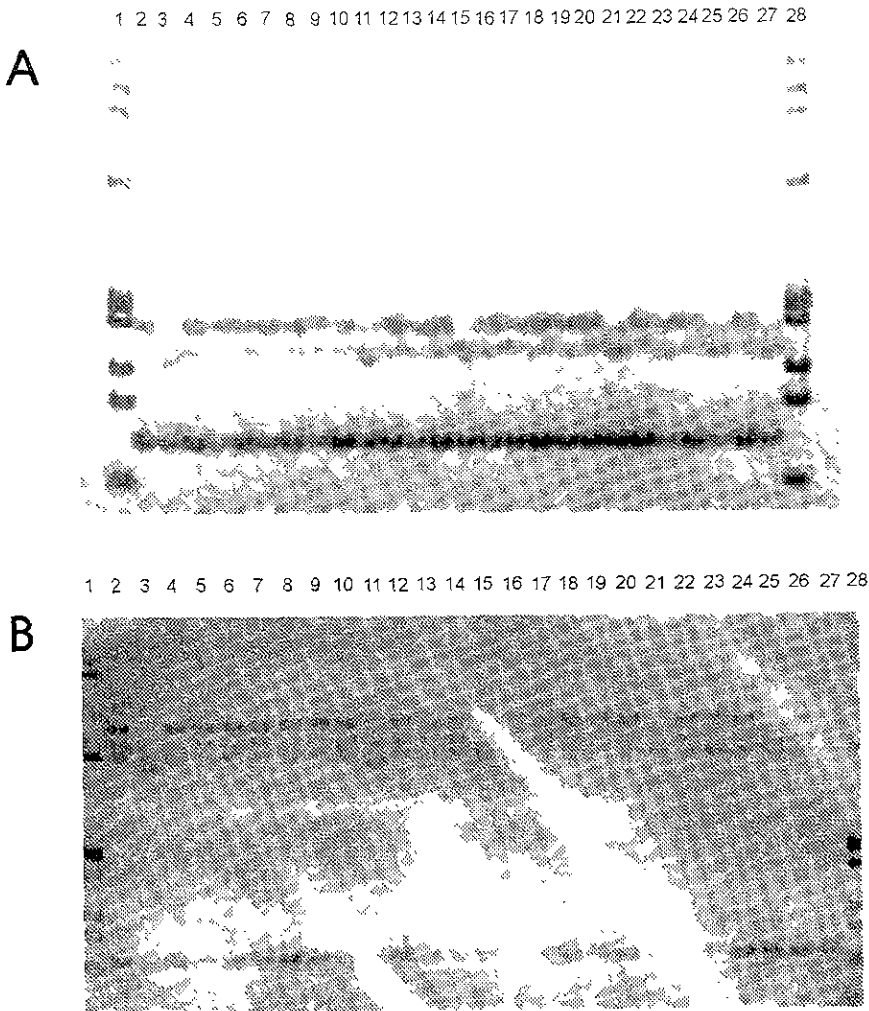


Fig. 3 Resultados del análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina. En **A** gel de poli(acrilamida) (7%) las condiciones de la electroforesis fueron TBE 0.5x, 200V 3 minutos, 40V 12 horas. El gel fue teñido con plata. Carril 1 y 28 marcan el peso molecular $\phi \times 174$. Carriles 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26 muestran el SSCP de la cepa control H37Rv. Carriles 3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,25,27 muestran el SSCP de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina. En **B** gel de poli(acrilamida) (12%) las condiciones de electroforesis fueron TBE 0.5x, 200V 10 minutos, 40V 16 horas. El gel fue teñido con plata. Los carriles tienen las mismas muestras que en **A**.

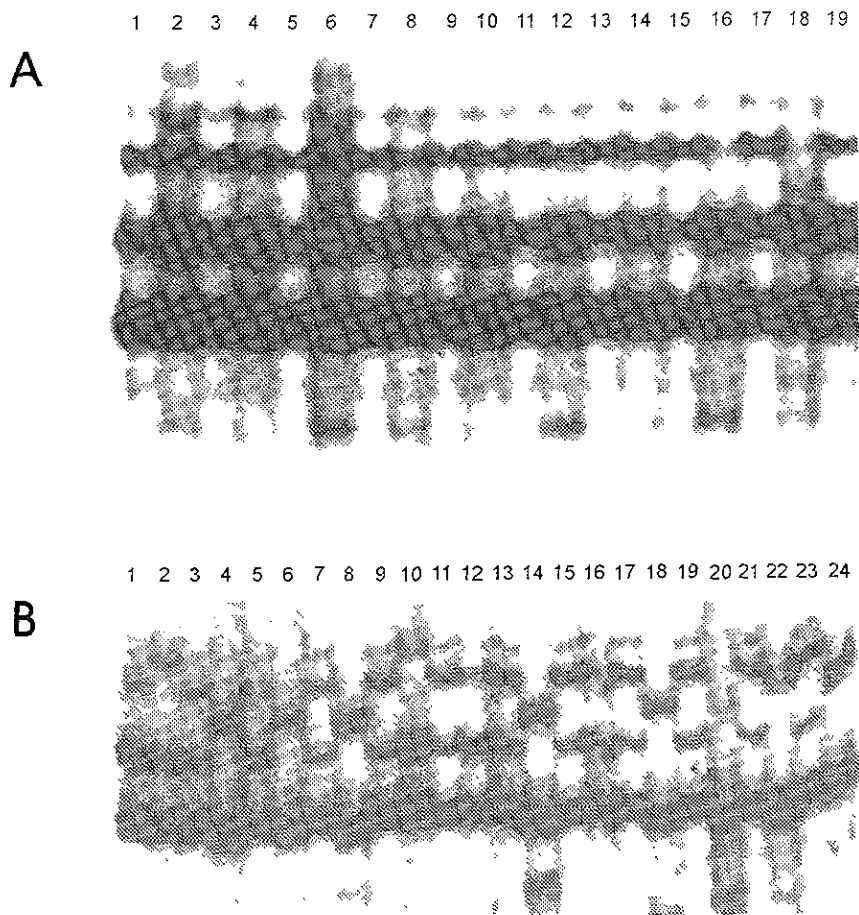


Fig. 4 Resultados del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) SSCP de las cepas de *M. tuberculosis* susceptibles y resistentes a rifampicina con el método radiactivo. En **A** autorradiograma del gel de poliacrilamida (12%). Las condiciones de la electroforesis fueron: TBE 1x, 6W por 12 horas. En los carriles 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19 se observa el SSCP H37Rv. Carriles 2,4,6,8,10,12,14,16,18 SSCP de las cepas de *M. tuberculosis* susceptibles a rifampicina. En **B** autorradiograma gel y condiciones de electroforesis igual que A. Carriles 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23 SSCP del control H37Rv. Carriles 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 SSCP de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina.

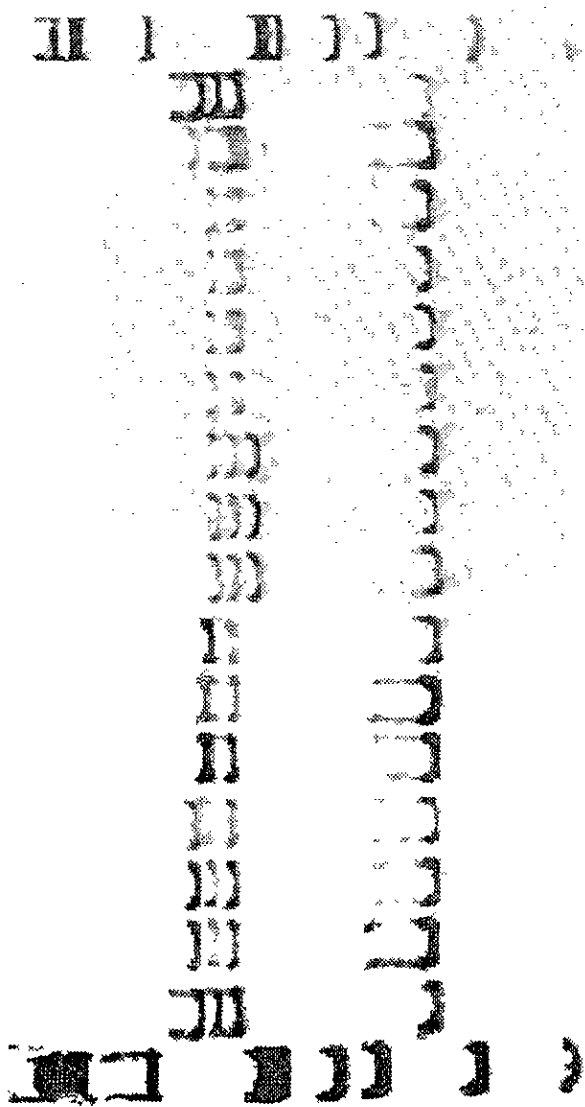


Fig. 5 Resultados del análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP). SSCP de las 11 cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina que tuvieron SSCP diferente al del control H37Rv. Carriles 1,18 marcador de peso molecular ϕ x174/HaeIII. Carriles 2 y 17 SSCP del control H37Rv. Carriles 3,4,5 SSCP de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina (CIM 2,8,64 μ g/mL), lanes 6,7,8 (CIM 2,8,2048 μ g/mL), carriles 9,10,11 (CIM 2048, 256, 256 μ g/mL), carriles 12,13,14,15 (CIM 2048, 2048, 256, 1024 μ g/mL), carril 16 (CIM 128 μ g/mL)

XIV. Bibliografía

- ¹ Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Washington C Jr. *Micobacterias. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* Philadelphia 1997:893-938.
- ² Nolte FS and Metchock B. *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller, Tenover FC, Tenover RH (ed.), *Manual of Clinical microbiology*. American Society for Microbiology Washington, 1995 400- 437.
- ³ Iseman MD. A clinician's guide to tuberculosis. *Biology and laboratory diagnosis of tuberculosis*. Philadelphia, 2000:21-49
- ⁴ Bloch H. Studies on the virulence of tubercle bacilli: isolation and biological properties of a constituent of virulent organisms. *J Exp Med* 1950; 91: 197-218
- ⁵ Kato M. Antibody formation to theraiose-6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* *Infect Immun* 1972;5:203-212
- ⁶ American Thoracic Society and Centers for Disease Control 1990. Diagnostic standars and classification of tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142. 725-735.
- ⁷ Behr MA, Warren SA, Salomón H, et al. Transmisión of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative form acid-fast bacilli. *Lancet* 199;353:444-9.
- ⁸ Grzybowski S, Barnett GD, Styblo K. Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc* 1975; 50:90-106.
- ⁹ Iseman MD. A clinician's guide to tuberculosis. *Immunity and Pathogenesis*. Philadelphia, 2000:63-96.
- ¹⁰ Barnes PF, Modlin RL, et al. T-cell responses and cytokines. In: Bloom BR Ed *Tuberculosis Pathogenesis, protection and control* Washington, 1994:417-35
- ¹¹ Woodring JH, Vandiviere HM, Fried AM, Dillon ML, Williams TD, Melvin IG. Update. the radiographic features of pulmonary tuberculosis. *AJR Am J Roentgenol* 1986, 146 497-506.
- ¹² Dannenberg AM, Jr. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis* 1989, 11:S369-78.
- ¹³ Pilheu JA. Tuberculosis 2000 problems and solutions *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:696-703
- ¹¹ Blomm, B.R and Murray CJL. Tuberculosis commentary on a reemergent killer *Science*1992;257: 1055-1064

-
- ¹⁵ Brudney K, Dobkin J. Resurgent tuberculosis in New York City: Human immunodeficiency virus infection. *N Engl J. Med.* 1991; 324: 1644-50.
- ¹⁶ Eilner JJ, Hinman AR, Dooley SW, Fischl MA, Sepkowitz KA, Goldberger MJ, Shinnick T M, Iseman MD and Jacobs Jr W R. Tuberculosis Symposium: Emerging Problems and Promise. *J of Infect Dis* 1993;168: 537-551.
- ¹⁷ Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Jr, Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin microbiol* 1993;31:767-70.
- ¹⁸ Shafer RW, Edlin BR. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. *Clin Infect Dis* 1996; 22:683-704.
- ¹⁹ Tapia R, Ruiz C, Ferreira E. Epidemiología de la tuberculosis en México. En: Sada-Díaz E, Sifuentes-Osornio J (ed.) México, 1995:789-808.
- ²⁰ INEGI. Censo General de la Población. Puebla, 1995.
- ²¹ Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, Fujiwara PI, Crawford JT, Nivin B, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis. *JAMA* 1996;276:1229-35.
- ²² Espinal MA, Lazo A, Simonsen L, Boulahbal F, Jae S, Reiniero A, et al. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Eng J of Med* 2001;344:1294-1303.
- ²³ Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-León A, Camacho-Mezquita FE, Bobadilla-del-Valle M, Infante-Suárez ML, Ramírez-Fernández N, et al. Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican patients. I. Clinical features and risk factors. [Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos. I. Características clínicas y factores de riesgo] *Rev Invest Clin* 1995;47:273-81.
- ²⁴ Kato-Maeda M, Sifuentes-Osornio J, Bobadilla-del-Valle M, Ruiz-Palacios GM, Ponce-de-León A. Drug resistance among acid-fast bacilli. *Lancet* 1999;353:1709.
- ²⁵ García-García ML, Jiménez-Corona ME, Ponce-de-León A, Jiménez-Corona A, Palacios-Martínez M, Balandrano-Campos S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in a suburban community in southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4 (Suppl 2):168-70.
- ²⁶ Granich RM, Balandrano S, Santaella AJ, Binkin NJ, Castro KG, Márquez-Fiol A, et al. Survey of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in 3 Mexican states, 1997. *Arch Intern Med* 2000;160:639-44.
- ²⁷ García-García MI, Ponce-de-León A, Jiménez-Corona ME, Jiménez-Corona A, Palacios-Martínez M, Balandrano-Campos S, et al. Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. *Arch Intern Med* 2000;160:630-6.

-
- ²⁸ World Health Organization. A controlled comparison of a twice-weekly and three once weekly regimens in the initial treatment of pulmonary tuberculosis. *Bull WHO* 1970;43:143-206.
- ²⁹ Zwarenstein M, Schoeman JH, Vundule C, Lombard CJ, Tatley M. Randomised controlled trial of self-supervised and directly observed treatment of tuberculosis. *Lancet* 1999;353:147-8.
- ³⁰ Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. *Diario Oficial de la Federación. Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. Tomo DLXV No 22. 31 octubre de 2000*
- ³¹ Chauk CP, Kazandjian VA. For the public health tuberculosis guidelines panel. Directly observed therapy for treatment completion of pulmonary tuberculosis. Consensus statement of the public health tuberculosis guidelines panel. *JAMA* 1998;279:943-948.
- ³² Shimao T. Drug-resistance in tuberculosis control. *Tubercle* 1987;68(S):5-15.
- ³³ Vareldzis BP, Grosset J, de Kantor I, Crofoton J, Lazlo A, Felten M, y col. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. *World Health Organization recommendations. Tubercle and Lung Diseases* 1994;75:1-7.
- ³⁴ Goble M. Drug-resistant tuberculosis. *Semin Respir Infect* 1986;1:220-9.
- ³⁵ Sensi P, Margalith P, Timbal MT. Rifomicin, a new antibiotic-preliminary report. *Farmaco (Sci)* 1959;14:146
- ³⁶ Wehrli W. Rifampin. mechanisms of action and resistance. *Reviews of Infectious Dis* 1983;5(S3):S407-11.
- ³⁷ Dans PE, McGehee RF Jr, Wilcox C, Finland M. Rifampin: antibacterial activity in vitro and absorption and excretion in normal young men. *Am J Med Sci* 1970 Feb;259(2) 120-32.
- ³⁸ Martindale. *The extra Pharmacopoeia* 1996 31st ed , p 268
- ³⁹ Prokesch RC, Hand WL. Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1982;21:373-80.
- ⁴⁰ Wehrli W. Kinetic studies of the interaction between rifampicin and DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 1977;80:325-330
- ⁴¹ Hartmann G, Honikel KO, Knusel F, Nuesch J. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochim Biophys Acta* 1967;145(3):843-4

- ⁴² Mustaev A, Zaychikov E, Severinov K, Kashlev M, Polyakov A, Nikiforov V, Goldfarb A. Topology of the RNA polymerase active center probed by chimeric rifampicin-nucleotide compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12036-40.
- ⁴³ McClure WR, Cech CL. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem* 1978;253(24):8949-56.
- ⁴⁴ Johnston DE, McClure WR. Abortive initiation of in vitro RNA synthesis on bacteriophage lambda DNA polymerase. In: Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor laboratory. 1976:423-28.
- ⁴⁵ Kessler C, Mi H, Hartman GR. Competition of rifampicin with binding of substrate and RNA to RNA polymerase. *Eur J Biochem* 1982 Mar 1;122(3):515-8.
- ⁴⁶ Wehrli W. Kinetic studies of the interaction between rifampicin and DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 1977;80:325-30.
- ⁴⁷ Sippel AE, Hartmann GR. Rifampicin resistance of RNA polymerase in the binary complex with DNA. *Eur J Biochem* 1970;16:152-7.
- ⁴⁸ Stender W, Scheit KH. Studies of the topography of the binding site of DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli* for the antibiotic rifamycin SV. *Eur J Biochem* 1977;76:591-600.
- ⁴⁹ Rabussay D, Zilling W. A rifampicin resistant RNA polymerase from *E. coli* altered in the beta-subunit. *FEBS Lett* 1969;5:104-6.
- ⁵⁰ Heil A, Zilling W. Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. *FEBS Lett* 1970;11:165-8.
- ⁵¹ Morrow TO, Harmon SA. Genetic analysis of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase mutants. *J Bacteriol* 1979;137:374-83.
- ⁵² Ovchinnikov YuA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Lipkin VM, Sverdlov ED, Kiver IF et al. Primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase nucleotide substitution in the beta subunit gene of the rifampicin resistant rpoB255 mutant. *Mol Gen Genet* 1981;184:536-8.
- ⁵³ Jin D, Gross C. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that leads to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 1988;202:45-58.
- ⁵⁴ Opalka N, Mooney RA, Richter C, Severinov K, Landick R, Darst SA. Direct localization of a beta-subunit domain on the three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:617-22.

- ⁵⁵ Blanc-Potard AB, Gari E, Spirito F, Figueroa-Bossi N, Bossi L. RNA polymerase (*rpoB*) mutants selected for increased resistance to gyrase inhibitors in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 1995;247:680-92.
- ⁵⁶ Honore N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:414-8.
- ⁵⁷ Miller LP, Crawford JT, Shinnick T. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:805-811.
- ⁵⁸ Carter PE, Abadi FJ, Yakubu DE, Pennington TH. Molecular characterization of rifampin-resistant *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1256-61.
- ⁵⁹ Levin ME, Hatfull GF. *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol Microbiol* 1993;8:277-85.
- ⁶⁰ Aubry-Damon H, Soussy CJ, Courvalin P. Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2590-4.
- ⁶¹ Morse R, O'Hanlon K, Virji M, Collins MD. Isolation of rifampin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* and their characterization by *rpoB* gene sequencing, temperature sensitivity for growth, and interaction with an epithelial cell line. *J Clin Microbiol* 1999;37:2913-9.
- ⁶² Padayachee T, Klugman KP. Molecular basis of rifampin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2361-5.
- ⁶³ Troyer JM, Radulovic S, Andersson SG, Azad AF. Detection of point mutations in *rpoB* gene of rifampin-resistant *Rickettsia typhi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1845-6.
- ⁶⁴ Gaurivaud P, Laignet F, Bove JM. Insusceptibility of members of the class Mollicutes to rifampin. studies of the *Spiroplasma citri* RNA polymerase beta-subunit gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:858-62.
- ⁶⁵ Nielsen K, Hindersson P, Hoiby N, Bangsbo JM. Sequencing of the *rpoB* gene in *Legionella pneumophila* and characterization of mutations associated with rifampin resistance in the Legionellaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2679-83.
- ⁶⁶ Quan S, Imai T, Mikami Y, Yazawa K, Dabbs ER, Morisaki N y cols. ADP-ribosylation as an intermediate step in inactivation of rifampin by a mycobacterial gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 Jan;43(1):181-4.

- ⁶⁷ Andersen S, Quan S, Gowan B, Dabbs E. Monoxygenase-like sequence of a *Rhodococcus equi* gene conferring increased resistance to rifampin by inactivating this antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:218-221
- ⁶⁸ Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993;342:647-50.
- ⁶⁹ Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels M, Salfinger M, et al. Characterization of rifampicin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2380-6.
- ⁷⁰ Kapur V, Li L, Iordanesco S, Hamrick MR, Wanger A, Kreiswith B, y Musser MR. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit from New York city and Texas. *J Clin Microbiol* 1994;32:1095-98.
- ⁷¹ Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K. Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1053-6.
- ⁷² Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*:1998 update. *Tuberc Lung Dis* 1998;(79):3-29.
- ⁷³ Wheleen AC, Feimlee TA, Hunt JM, Williams DL, Roberts GD, Stockman L, Persing DH. Direct genotype detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance in clinical specimens by using single tube heminested PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:556-61
- ⁷⁴ Williams DL, Spring L, Gillis TP, Salfinger M, Persing DH. Evaluation of a polymerase chain reaction – based universal heteroduplex generator assay for direct detection of rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *Clin Infect Dis* 1998;26:446-50
- ⁷⁵ De Benhower, Lhiang HZ, Jannes G, Mijis W, Machtelinckx L, Rossau H, et al. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy samples from tuberculosis patients by PCR and line probe assays. *Tubercle and Lung Dis* 1995;76:425-30.
- ⁷⁶ De Benhower, Lhiang HZ, Jannes G, Mijis W, Machtelinckx L, Rossau H, et al. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy samples from tuberculosis patients by PCR and line probe assays. *Tubercle and Lung Dis* 1995;76:425-30.
- ⁷⁷ Feimlee TA, Liu Q, Whelen AC, Williams D, Sommer SS, Persing DH. Genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance. comparison of single strand conformation polymorphism and dideoxy fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1995;33 1617-23

-
- ⁷⁸ Gingeras TR, Ghandour G, Wang E, Berno A, Small P, Drobneski F, Alland D, Desmond E, Holodniy M, Drenkow J. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Res* 1998;8:435-448.
- ⁷⁹ Nash KA, Gaytan A, Inderlied CB. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by use of rapid, simple, and specific RNA/RNA mismatch assay. *J Infect Dis* 1997;176:533-36.
- ⁸⁰ Platek AS, Telenti A, Murray MR, El-Hajj H, Jacobs WR Jr, Kramer FR, Alland D. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:103-110.
- ⁸¹ Onita M, Iwahana H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad USA* 1998;86:2766-70.
- ⁸² Kishimoto M, Sakura H, Hayashi K, Akanuma Y, Kasuga M, Kadowaki T. Detections of mutations in the human insulin gene by single strand conformation polymorphisms. *J Clin Invest Metabol* 1992;74:1027-31.
- ⁸³ Bum-JK, Seok YK, Byoung HP, Mi AL, Il KP, Gill HB, Chang YC, Yoo HK. Mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* that interfere with PCR-single strand conformation polymorphism analysis for rifampin susceptibility testing. *J Clin Microb* 1997;35:492-94
- ⁸⁴ Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. *Currents Protocols in Molecular Biology*. Vol.1, New York. Green and Wiley-Interscience, 1990. p 2.4.1-2.
- ⁸⁵ Mitchell LG, Bodenteich A, Merrill CR. Use of silver staining to detect nucleic acids. In: *Methods in Molecular Biology: Basic DNA and RNA protocols*. Vol. 58, NJ: Humana Press Inc, 1996. 97-103.
- ⁸⁶ Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics*. 4th ed 1995. Wadsworth Publishing Co Belmont California.
- ⁸⁷ Rinder H, Dobner P, Feldmann K, Rifai M, Bretzel G, Rusch S, Loscher T. Disequilibria in the distribution of *rpoB* alleles in rifampin-resistant *M tuberculosis* isolates from Germany and Sierra Leona. *Microbial Drug Resistance* 1997;3:195-197

-
- ⁸⁸ Matisiata P, Vrioni G, Marinis E. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Greece J Clin Microbiol 1998;36:20-23.
- ⁸⁹ Pozzi G, Meloni M, Iona E, Orru G, Thoresen O, Ricci M y col. *rpoB* mutations in multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Italy. J Clinical Microbiol 1999;17:1197-1199.
- ⁹⁰ Schilke K, Weyer K, Bretzel G, Amthor B, Brandt J, Sticht V, Fourie P, Hass W. Universal pattern of *rpoB* gene mutations among multi-drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. Int J Tuberc Lung Dis 1999;7:620-26.
- ⁹¹ Billington OJ, McHugh TD and Gillespie HS. Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1866-69.
- ⁹² Reynolds M. Compensatory evolution in rifampin resistant *Escherichia coli*. Genetics 2000;156:1471-1481.
- ⁹³ Morlock G, Plikaytis B, Crawford J. Characterization of spontaneous, in vitro-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:3298-3301.
- ⁹⁴ Cheruvu M, Selvakumar N, Narayanan S, Narayanan PR. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. J Clin Microbiol 2001;39:2987-90.
- ⁹⁵ Bodmer T, Zurcher G, Imboden P, Telenti A. Mutation position and type of substitution in the β -subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* J antimicrob Chemother 1995;35:345-348.
- ⁹⁶ Moghazeh S, Pan X, Arain T, Kendall C, Musser J. Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant *mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. Antimicrobial Agents Chemother 1996;40 2655-57.
- ⁹⁷ Lee H, Cho SN, Bang HE, Lee JH, Bae GH, Kim SJ, Kim JD Molecular analysis of rifampin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Korea by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism sequence analysis Int J Tuberc lung Dis 1998;2 585-89.
- ⁹⁸ Lilly K, Yuen W, Leslie D, Coloe PJ. Bacteriological and molecular analysis of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Australia J Clin Microbiol 1999, 37 3844-50.

⁹⁹ Sreevastan S, Pan X, Stockbauer K. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9869-74

¹⁰⁰ Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1075-7

¹⁰¹ Heep M, Odenbreit S, Beck D, Decker J, Prohaska E, Rieger U, Lehn N. Mutations at four distinct regions of the *rpoB* gene can reduce the susceptibility of *Helicobacter pylori* to rifamycins. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1713-5.

¹⁰² O'Neill A, Oliva B, Storey C, Hoyle A, Fishwick C, Chopra I. RNA polymerase inhibitors with activity against rifampin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3163-6.

¹⁰³ Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* 2001;104:901-12.

¹⁰⁴ Hou L, Osei-Hyiaman D, Zhang Z, Wang B, Yang A, Kano K. Molecular characterization of *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China. *Epidemiol Infect* 2000;124:227-232.

¹⁰⁵ Cooksey RC, Morlock GP, Holloway BP, Mazurek GH, Abaddi S, Jackson LK, Buzard GS, Crawford JT. Comparison of Two Nonradioactive, Single-Strand Conformation Polymorphism Electrophoretic Methods for Identification of *rpoB* Mutations in Rifampin-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Diagn* 1998;3:73-79.

¹⁰⁶ Paolo Scarpellini, Sergio Braglia, Paola Carrera, Maura Cedri, Paola Cichero, Alessia Colombo, Rosella Crucianelli, Andrea Gori, Maurizio Ferrari, and Adriano Lazzarin. Detection of Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Double Gradient-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43 2550-2554

¹⁰⁷ AC Whelen, TA Felmlie, JM Hunt, DL Williams, GD Roberts, L Stockman, and DH Persing. Direct genotypic detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance in clinical specimens by using single-tube heminested PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33. 556-561.

-
- ¹⁰⁸ Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, and Crawford JT Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J Clin Microbiol* 1997;35: 1281-1283.
- ¹⁰⁹ Bartfai Z, Somoskovi A, Kodmon C, Szabo N, Puskas E, Kosztolanyi L, Farago E, Mester J, Parsons LM, Salfinger M. Molecular Characterization of Rifampin-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA Sequencing and the Line Probe Assay. *J Clin Microbiol* 2001;39:3736-9.
- ¹¹⁰ Garcia L, Alonso-Sanz M, Rebollo M, Tercero JC, and Chaves F. Mutations in the *rpoB* Gene of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Spain and Their Rapid Detection by PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1813-1818.
- ¹¹¹ Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, Sobolev A, Strizhkov B, Chernyh N, Skotnikova O, Irtuganova O, Moroz A, Litvinov V, I Vladimirovskii M, Perelman M, Chernousova L, Erokhin V, Zasedatelev A, and Mirzabekov A Identification of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by Hybridization, PCR, and Ligase Detection Reaction on Oligonucleotide Microchips. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2531-2540.
- ¹¹² Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, Cros P, Mabilat C. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999;37:49-55.
- ¹¹³ Heep M, Brandstatter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rüscher-Gerdes S, and Niemann S. Frequency of *rpoB* Mutations Inside and Outside the Cluster I Region in Rifampin-Resistant Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *J Clin Microbiol* 2001;39:107-110.
- ¹¹⁴ Jacobs WR Jr, Barletta RG, Udani R, Chan J, Kalkut G, Sosne G, Kieser T, Sarkis GJ, Hatfull GF, Bloom BR Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science* 1993;260:819-822.
- ¹¹⁵ Banaiee N, Bobadilla-Dei-Valle M, Bardarov S Jr, Riska PF, Small PM, Ponce-De-Leon A, Jacobs WR Jr, Hatfull GF, Sifuentes-Osorio J Luciferase Reporter *Mycobacteriophages* for Detection, Identification, and Antibiotic Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J Clin Microbiol* 2001;39:3883-8