



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLÁN

“ESPOLIGOTIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Mycobacterium tuberculosis* MDR OBTENIDOS EN LA ENCUESTA NACIONAL DE FARMACORRESISTENCIA EN MÉXICO.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ALONSO SALDIVAR TORÍZ

**ASESORES: Dr. SALVADOR FONSECA CORONADO
Dr. JOSÉ ARMANDO MARTÍNEZ GUARNEROS**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**
Espoligotipificación de aislados de *Mycobacterium tuberculosis* MDR obtenidos en la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia en México.

Que presenta el pasante: Alonso Saldivar Toriz

Con número de cuenta: 30332074-4 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A Becerril Osnaya	
VOCAL	Dr. Andrés Romero Rojas	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er SUPLENTE	QFB. Dulce María Ruvalcaba Sil	
2do SUPLENTE	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).

HHA/pm

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bacteriología del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de la Secretaría de Salud; bajo la dirección del Dr. José Armando Martínez Guarneros, en colaboración con el Laboratorio de Inmunobiología de Enfermedades Infecciosas de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, bajo la co-dirección del Dr. Salvador Fonseca Coronado.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**, por abrirme sus puertas, y a la **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**, por empujarme a través de ellas. A ambas les debo mucho.

A mis padres:

Blanca Toríz y **Cruz Saldivar**, por el simple hecho de darme la vida y por guiarme a ser la persona que hoy soy.

A mis hermanas:

Blanca y Bianca por estar con migo cuando las necesito, por su apoyo y por todos los buenos momentos compartidos juntos y soportar mis locuras, y a mis niños **Eileen, Dorian, Jafet y Alondra**, por sus ocurrencias y risas, sin ustedes no sería los mismo; muchas gracias.

A mis asesores:

Dr. Salvador Fonseca Coronado, por las enseñanzas en el aula de clases, por su asesoría, apoyo y sus valiosas sugerencias, pero sobre todo por sembrar en mí el deseo del conocimiento.

Dr. José Armando Martínez Guarneros por compartirme sus conocimientos, por su confianza y apoyo en esta mi primera investigación.

M.C. Carlos Arturo Vázquez Chacón y David Vásquez, por compartir todos sus conocimientos, por el tiempo dedicado, por ayudarme y darme muchos ánimos en mi investigación, y por todas las ocurrencias en el laboratorio, gracias.

A mis amigos:

Gaby, Janet, Grecia, Alfredo, por todos los muy buenos momentos compartidos juntos, por hacer divertida la carrera, por su amistad incondicional y sincera y estar ahí siempre que se necesitan. Y un especial agradecimiento a **Norma, Ana y Valentina**, por su confianza, apoyo y sobre todo por ayudarme a levantar cuando sentí que no lo lograría. Muchas gracias amigos.

La vida nos muestra diferentes formas de llegar al éxito, algunas de ellas se convierten en verdaderas pruebas para consigo mismo, hoy gracias a Dios, a mis padres, a mis hermanos, a mis amigos, docentes y sobre todo a mi mismo porque en este trabajo esta recopilado el esfuerzo y la constancia de años de lucha por alcanzar una meta.

“Cuando se quiere alcanzar algo, hay que tener el valor de anunciarlo. Y una vez que se anuncia es indispensable tener el valor de realizarlo”

Georges Clemenceau

ÍNDICE	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Historia de la Tuberculosis	7
1.2 Agente Etiológico	8
1.3 Membrana Lipídica	10
1.4 Factores de Virulencia	11
1.5 Patogenia	12
1.6 Métodos de diagnóstico de la Tuberculosis	15
1.6.1 Baciloscopía	15
1.6.2 Cultivo de las Micobacterias	16
1.6.3 Nuevos Métodos de Diagnóstico	18
1.7 Epidemiología	20
1.8 Epidemiología Molecular	24
2. ANTECEDENTES	25
2.1 Esquemas de tratamiento contra la Tuberculosis	25
2.2 Farmacorresistencia a medicamentos antituberculosos	29
2.3 Fármacos de Primera Línea	30
2.3.1 Isoniazida	30
2.3.2 Rifampicina	33
2.3.3 Pirazinamida	34
2.3.4 Etambutol	35
2.3.5 Estreptomina	36
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. HIPÓTESIS	39
5. OBJETIVOS	40
6. MATERIAL Y MÉTODOS	41

6.1 Aislados de <i>M. tuberculosis</i>	41
6.2 Resiembra de las muestras en medio Middlebrook	43
6.3 Extracción de DNA Genómico por el método de Lisozima-Proteinasa K	43
6.4 Comprobación de la presencia de DNA genómico	44
6.5 Determinación de las mutaciones que confieren resistencia a Isoniazida por PCR Múltiplex	44
6.6 Determinación de las mutaciones que confieren resistencia a Isoniazida por PCR-RFLP	46
6.7 Comprobación de amplicones generados por las PCR: electroforesis	47
6.8 Caracterización de aislados de <i>M. tuberculosis</i> por Espoligotipificación	48
7. RESULTADOS	50
7.1 Datos Epidemiológicos de las muestras de la ENFR con TB-MDR	50
7.2 Evaluación de la presencia de DNA genómico	53
7.3 Identificación de genes de resistencia por PCR Múltiplex	54
7.4 Identificación de genes de resistencia por PCR-RFLP	53
7.5 Perfil electroforético de la digestión con MspI	55
7.6 Frecuencia de mutaciones	56
7.7 Caracterización Genética por Espoligotipificación	58
8. DISCUSIÓN	63
9. CONCLUSIONES	72
10. BIBLIOGRAFÍA	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Pared celular Micobacteriana	11
2. Lesiones en pulmón y ganglios Linfáticos por <i>M. tuberculosis</i>	14
3. Tinción de Ziehl-Neelsen	16
4. Medios de cultivo para Micobacterias	17
5. Paciente de Mumbai infectado con TB-MDR	21
6. Incidencia de TB en el mundo	21
7. Morbilidad por tuberculosis pulmonar	23
8. Pirámide de Éxito terapéutico	28
9. Blancos de acción de los fármacos de primera y segunda línea frente a TB	36
10. Prevalencia de TB en la Republica Mexicana	41
11. Diagrama general de trabajo	42
12. Fragmentos de DNA generados por la digestión con la enzima MspI	47
13. DR locus (fragmento)	49
14. Distribución de las muestras de la ENFR por grupos de edad	51
15. Distribución de los aislados de TB-MDR por género	52
16. Distribución de los aislados de MTB por resistencia a los fármacos de primera línea	53
17. Electroferograma de DNA genómico de algunos aislados de <i>M. tuberculosis</i>	54
18. Electroferograma representativo de PCR Múltiplex para los genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> en aislados de <i>M. tuberculosis</i> MDR	54
19. Electroferograma representativo de PCR del gen <i>katG</i> previo a su restricción con MspI	55
20. Electroferograma representativo de PCR-RFLP del gen <i>katG</i> digerido con MspI	55
21. Frecuencia de resultados en PCR Múltiplex	56
22. Frecuencia de resultados en PCR RFLP	56
23. Distribución geográfica de mutaciones que confieren resistencia a INH en aislados de <i>M. tuberculosis</i> MDR	57
24. Linajes encontrados de <i>M. tuberculosis</i> en los 32 aislados estudiados	60
25. Diversidad genética de los aislados de <i>M. tuberculosis</i> de los 32 aislados estudiados	60
26. Distribución geográfica y porcentaje de los linajes de aislados de <i>M. tuberculosis</i> en las Entidades Federativas analizadas	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Fármacos antituberculosos de primera línea	26
2.	Fármacos antituberculosos de segunda línea	28
3.	Secuencia de los iniciadores utilizados en la PCR Múltiple	45
4.	Secuencia de los iniciadores utilizados en la PCR-RFLP	46
5.	Secuencia de los iniciadores que amplifican la región DR	49
6.	Distribución de los aislados de TB-MDR obtenidos durante la ENFR	50
7.	Patrón de resistencia a fármacos de primera línea de aislados de <i>M. tuberculosis</i>	52
8.	Distribución de las mutaciones de <i>M. tuberculosis</i> en las distintas Entidades Federativas y el porcentaje total encontrado de cada mutación	57
9.	Espoligotipos de aislados de <i>M. tuberculosis</i> MDR de las Entidades Federativas analizadas en este estudio	58
10.	Espoligotipos de aislados de <i>M. tuberculosis</i> MDR con grupos (clusters) y perfiles de espoligotipos diferentes o semejantes	59
11.	Descripción de mutaciones asociadas con resistencia a Isoniazida y el linaje encontrado por Espoligotipificación en las 32 Entidades Federativas Estudiadas	62

ABREVIATURAS

TB	Tuberculosis
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
STR	Estreptomina
MTC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
Pth	Protionamida
MA	Macrófagos Alveolares
NK	Natural killer cells (por sus siglas en inglés)
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (por sus siglas en inglés)
PRR	Receptores que Reconocen Patrones (por sus siglas en inglés)
TNF	Factor de Necrosis Tumoral (por sus siglas en inglés)
IL	Interleucina
SNC	Sistema Nervioso Central
Cp	Capreomicina
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
IFN	Interferón
OMS	Organización Mundial de la Salud
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
PPD	Derivado Proteico Purificado
BAAR	Bacilo Acido Alcohol Resistente
ARNm	Ácido Ribonucléico mensajero
MDR-TB	Tuberculosis multifármacorresistente
ARN	Ácido Ribonucléico
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio
ENFR	Encuesta Nacional de Farmacorresistencia
IS	Secuencia de Inserción (por sus siglas en inglés)
IREZ	Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Pirazinamida
INH	Isoniazida
RIF	Rifampicina
EMB	Etambutol
PZ	Pirazinamida
CIM	Concentración Inibitoria Mínima
NOM	Norma Oficial Mexicana
Ofl	Ofloxacina
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad resultante de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* y constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial donde el 98% de los decesos ocurre en países en desarrollo. En la actualidad se cuenta con un grupo reducido de fármacos para combatir la enfermedad y el éxito del tratamiento depende del cumplimiento estricto del mismo; sin embargo, han surgido cepas resistentes a los distintos fármacos empleados en la multiterapia. La aparición de nuevas cepas de *M. tuberculosis* de mayor virulencia y que presentan resistencia a los fármacos antituberculosos ha orientado la investigación al registro de la distribución geográfica mundial de las cepas bacterianas que presentan variantes genéticas resistentes, siendo el análisis de espoligotipos una de las estrategias más utilizada para tipificar genéticamente a los miembros del complejo *M. tuberculosis*. En el presente trabajo, se investigó la frecuencia de mutantes resistentes al fármaco de primera línea isoniazida. Para esto, se generó un banco genómico de aislados clínicos de *M. tuberculosis* con muestras obtenidas a partir de la Encuesta Nacional de Farmacorresistencia que se llevó a cabo en México en 8 Entidades Federativas con distinta incidencia de tuberculosis. El perfil de tuberculosis multifarmacorresistente (TB-MDR), está relacionado con la aparición de mutaciones en el gen *katG* e *inhA*; la frecuencia de mutación en los distintos codones obtenidos fueron: *katG315* 41%, *katG463* 25%, *inhA* 22% y *katG315-463* 6%, las muestras que no presentaron ninguna mutación representaron el 41% y se detectó la presencia de un patrón de restricción no reportado previamente para este método en el 3% de las muestras. Los 32 aislados analizados formaron 10 grupos de espigotipos, de los cuales la mayoría se agrupó en el linaje Beijing y Haarlem (15%); también se encontró un número importante de aislados pertenecientes al linaje Bovis en el Estado de México (12%) en tanto que los demás linajes encontrados son de amplia distribución mundial. La presencia de un importante número de aislados perteneciente al grupo de Beijing, concentrados mayormente en el estado de Baja California, sugiere que el flujo de migración de comunidades asiáticas puede estar participando en la diseminación de la enfermedad, en tanto que la presencia del linaje Bovis, mayormente concentrado en el Estado de México, sugiere un problema de zoonosis no controlada en este estado, lo cual podría correlacionar con la frecuencia de casos de pacientes reportados con VIH en la Entidad.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Historia de la Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad muy antigua, se presume que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 150 millones de años. Un antepasado remoto de *M. tuberculosis* fue probablemente contemporáneo de los primeros homínidos de África oriental por lo que se cree que ha existido una co-evolución desde hace tres millones de años y los miembros del actual complejo de *M. tuberculosis* se originaron a partir de un progenitor común hace 15 000 – 35 000 años (Palomino, 2007).

Se ha sugerido que las micobacterias crearon una larga asociación con los animales marinos, y que de *Mycobacterium marinum* se deriva la rama conservadora, sin embargo, *M. tuberculosis* parece tener su origen en un agente zoonótico, *M. bovis*, considerada por muchos como la más antigua de las especies que actualmente integran el complejo *M. tuberculosis*.

Existen referencias específicas a la TB en el Antiguo Testamento que, hasta el descubrimiento de la estreptomycin, había sido la enfermedad más mortífera que hubiera aquejado al género humano. Hipócrates, en el siglo V A.C., fue el primero en designar como tisis a la forma pulmonar, aunque bajo este concepto incluía también al empiema y a la fimia o absceso del pulmón. La descripción del hábito tísico describía a una persona de contextura fina y tierna, con voz aguda, piel delgada y clara, pecho angosto y omóplatos que sobresalen. En el siglo XVII, Franciscus Sylvius de la Bõe, tomó en cuenta como riesgo de contagio el aire, que cita: “el aire aspirado por los consuntivos se acerca a la boca y nariz de otros, penetra y de este modo, las emanaciones dañinas e irritativas van continuamente de la parte afectada a otras, especialmente a los familiares, cuando éstos están finalmente infectados con el mismo veneno, caen también en la tisis” (Ledermann, 2003).

En 1882 Robert Koch con ayuda del microscopio logró descubrir el “carbunco”, causado por *Bacillus anthracis* y posteriormente la revelación del bacilo que provoca la TB, con su observación pudo determinar que *Mycobacterium tuberculosis* es el causante de la TB.

El autor de la tinción de la baciloscopía, fundamentó su método en el carácter ácido-alcohol resistente a la decoloración, propio del bacilo tuberculoso. Para evidenciar al bacilo utilizó ácido nítrico y tinte con violeta de Genciana o Fucsina, en presencia de Anilina disuelta en agua (Caminero, 2003). Dado a conocer el trabajo de Ehrlich sobre la tinción de la baciloscopía, Franz Ziehl, un bacteriólogo alemán, propuso utilizar ácido carbónico en vez de anilina y Karl Adolf Neelsen, un patólogo alemán, cambió la genciana por fucsina y el ácido nítrico por sulfúrico, estos hechos los llevaron a crear la ahora conocida tinción de Ziehl-Neelsen (Ledermann, 2003).

En la primera década del siglo XX, Albert Calmette y Camille Guérin lograron evitar la agregación celular de un cultivo de una cepa virulenta de TB bovina, utilizando un medio a base de patata, glicerina y suplementado con un detergente. Después de 39 pases de esta cepa observaron un cambio en la morfología colonial. Observaron que su inoculación en bovinos, ratones, cobayos y chimpancés evitaba la aparición de la enfermedad aún 30 días después de la infección con bacilo tuberculoso humano o bovino. La cepa obtenida por Calmette y Guérin se convirtió en la primera vacuna viva atenuada contra la TB. En la actualidad, la vacuna BCG previene en niños la mortalidad por las formas graves de la TB (meníngea, miliar) en un 80% y la pulmonar en un 50% (Palomino, 2007).

Tras el descubrimiento de la estreptomycin (STR) por Waksman y Schatz en 1943 y su uso para el tratamiento de la TB humana desde 1944, le siguió la investigación y el descubrimiento de otros antibióticos en los años y décadas posteriores que consiguieron que la TB se convirtiera en una enfermedad curable.

1.2 Agente Etiológico.

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos aerobios estrictos inmóviles y no esporulados en forma de bastón que miden de 2 a 6 μm de largo por 0.3 a 0.6 μm de ancho. Se reproducen en forma binaria en un promedio de 18 a 24 horas por ciclo, por lo que en cultivo crece lentamente (28 a 30 días). Su principal característica es un alto contenido de ácidos grasos en su pared celular (que representa del 20 al 40% de su peso seco) y le confiere la cualidad de ser ácido-alcohol resistente (Koneman, 2008).

Este género incluye diversas especies que están estrechamente relacionadas: *Mycobacterium leprae*, agente causal de lepra; *Mycobacterium tuberculosis* y *bovis* responsables de TB en humanos y bovinos, y micobacterias atípicas. *M. tuberculosis* es miembro del complejo *M. tuberculosis* (MTC, del inglés *M. tuberculosis Complex*), el cual incluye a las especies *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. mungui*, las cuales infectan a diferentes hospederos y causan distintos tipos de lesiones.

Todos los miembros del complejo son muy resistentes al frío, congelación y desecación, siendo, por el contrario, muy sensible al calor, luz solar y luz ultravioleta. Las necesidades nutritivas de las micobacterias requieren una fuente de carbono (glicerol) y nitrógeno (amonio o aminoácidos) así como determinadas sales minerales y su crecimiento se ve estimulado por la presencia de CO₂ y ácidos grasos.

De la estructura química de *M. tuberculosis* forman parte proteínas, carbohidratos, vitaminas del complejo B y ciertos minerales como el fósforo, magnesio y calcio. *M. tuberculosis* no tiene capacidad de producir toxinas, por lo que carece de toxicidad primaria, sin embargo, su componente antigénico es muy elevado y complejo, lo que determina una muy diferente virulencia y capacidad patógena. Otra de sus principales características es su lenta capacidad de división (60 veces inferior a la de un estafilococo), que es el origen de una clínica muy poco específica y de muy lenta instauración, que afecta tanto el diagnóstico como el tratamiento (Caminero, 2003).

El crecimiento de *M. tuberculosis* está condicionado a la presencia de oxígeno y al valor del pH circundante. Las condiciones ideales de multiplicación del bacilo se encuentran a un pH de 7.4 y una presión de oxígeno entre 100 y 140 mm de Hg. Cuando *M. tuberculosis* no encuentra un entorno favorable para su crecimiento, entra en un estado latente, pudiendo demorar su multiplicación desde varios días hasta años. Este estado de latencia es también uno de los condicionantes de la perpetuación de la endemia.

1.3 Morfofisiología.

Aunque este microorganismo carece de cápsula, posee un alto contenido en lípidos, en su mayoría químicamente complejos y que son responsables de varias de sus características biológicas, como la dificultad para ser destruidos por los macrófagos y su resistencia a la desecación.

La membrana lipídica está constituida por cuatro capas. La capa interna de peptidoglicano, con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico, esta capa da rigidez y forma a la bacteria. La segunda posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. Se trata de ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono) de gran importancia taxonómica. La disposición de estos ácidos micólicos es específica de la especie. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como el factor cuerda (factor cord, trehalosa 6,6'-dimicolato) y por mucósidos; la pared celular también contiene proteínas intercaladas, varias de estas proteínas son responsables de la construcción de la pared celular durante la vida del bacilo. En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular, que es responsable, entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de la característica ácido-alcohol resistencia con determinadas tinciones para su visualización microscópica. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomanano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos (Palomino, 2007).

Las Micobacterias también contienen proteínas llamadas porinas que forman canales hidrofílicos que permiten el pasaje pasivo de solutos a través de la capa de ácidos micólicos (Parsons, 1997; Rodríguez, 1882). En la figura 1 se muestran los principales componentes de la pared de las micobacterias.

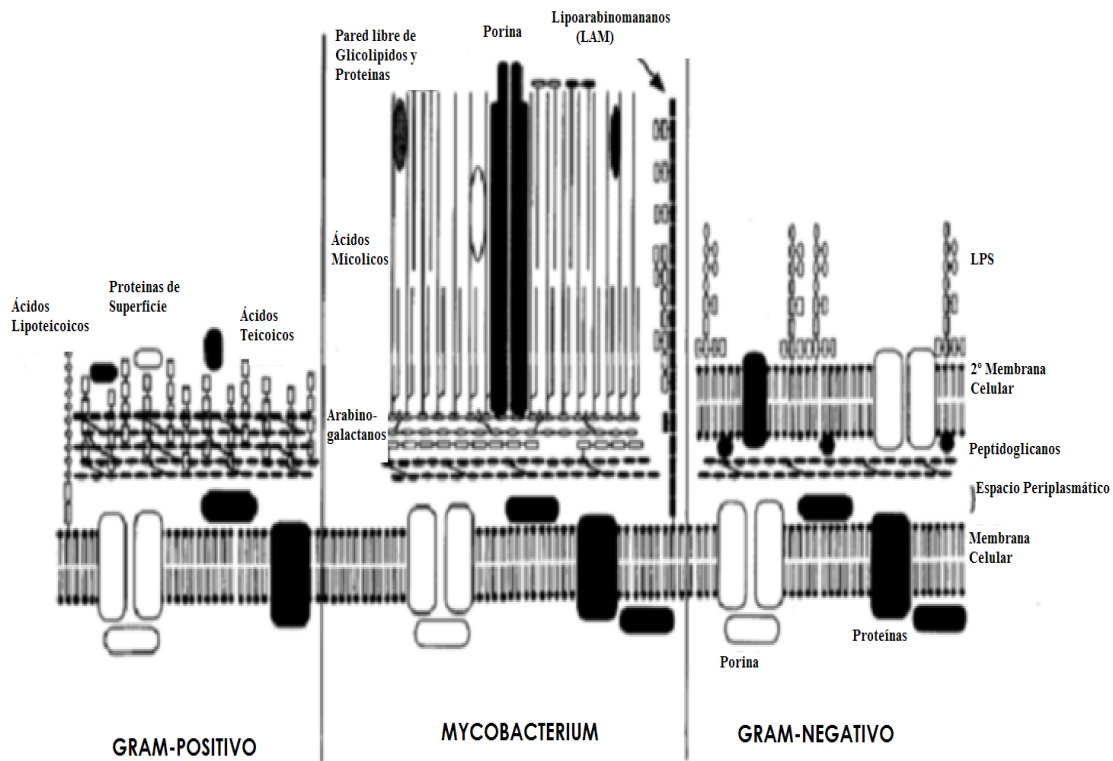


Figura 1. Diferencia de la composición de la pared celular entre las bacterias del grupo Gram. +, Gram. – y *Mycobacterium*, en donde se observa la gran cantidad de ácidos grasos que contiene en comparación con los otros dos grupos de bacterias. Tomada de Parsons, 1997.

1.4 Factores de Virulencia.

Aunque se han descrito diferentes factores de virulencia a la fecha de *M. tuberculosis* involucrados en el desarrollo de la patogenicidad de este microorganismo, aún es un campo que se encuentra en constante investigación.

Entre los factores descritos se encuentra el factor cuerda; las cepas virulentas de bacilos tuberculosos adoptan la forma de cordones constituidos por bacilos que se disponen de forma paralela y compacta, los que provocan granulomas crónicos y lesionan *in vitro* las membranas mitocondriales, no obstante, este factor también ha sido aislado de micobacterias no virulentas. La toxicidad del cord factor se ve aumentada por la acción de los sulfolípidos, considerado también como factor de virulencia, ya que inhibe la fusión lisosoma-fagosoma.

Las Micobactinas y Exoquelinas son considerados también como elementos de virulencia, ya que son esenciales en el desarrollo y crecimiento del bacilo. También se conocen factores de virulencia de naturaleza lipídica, entre ellos los glicolípidos, lipoglicanos y polisacáridos. Se ha descrito que estos compuestos confieren protección, lo cual está basado en hallazgos de que estas moléculas son potentes factores de virulencia que proveen a *M. tuberculosis* ventajas en diferentes ambientes. El lipoarabinomano y los fosfatidilinositol manósidos, son los mayores contribuyentes a la evasión de *M. tuberculosis* a la respuesta inmune del hospedero debido a que ambas moléculas participan en la inhibición de la activación de los macrófagos infectados (Rodríguez, 1882; Koneman, 2008).

1.5 Patogenia.

El mecanismo de transmisión más importante es la vía aérea. El enfermo tuberculoso, especialmente el bacilífero, al hablar, estornudar y, sobre todo, toser, elimina múltiples gotas aerosolizadas y cargadas de bacilos, sin embargo, tan sólo las gotitas de 1-5 μm (gotas de flugger) son las que tienen capacidad infecciosa real, al poder alcanzar la región alveolar. Otros mecanismos de transmisión reconocidos son: a) vía digestiva (segunda en frecuencia), como el caso de *M bovis* a partir del ganado bovino; b) vía urogenital; c) vía cutáneo-mucosa; d) inoculación; y e) vía transplacentaria. Por su tamaño, los bacilos que ingresan pueden llegar fácilmente hasta los alvéolos pulmonares, donde inmediatamente son reconocidos por los componentes de respuesta inmunológica del individuo (Stewart, 2003).

M. tuberculosis posee múltiples *PAMP*'s (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos del inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns), que son los inductores de la respuesta Innata, al igual que numerosos antígenos que son los encargados de activar a la respuesta Adaptativa. La respuesta Innata es la primera que se induce por la actividad de los *PAMP*'s de la micobacteria al ser reconocidos por los receptores *PRR* en la superficie de células del hospedero. Al activarse la respuesta Innata se van a llevar a cabo dos funciones: la primera es constituir una barrera inmediata de ataque contra la micobacteria y la segunda, es la de producir citocinas que modulen la respuesta adaptativa.

Durante la respuesta Innata las células participantes de mayor importancia son los macrófagos, los cuales reconocen y fagocitan micobacterias al mismo tiempo que permiten su multiplicación y realizan la producción de citocinas como el TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23 que son los responsables de la sintomatología. La protección específica contra la micobacteria es llevada a cabo por las citocinas producidas por las células Th1, principalmente el Interferón gamma (IFN- γ), que se encarga de activar macrófagos en su capacidad microbicida, de procesamiento y de presentación así como en la digestión de los bacilos fagocitados, sin embargo *M. tuberculosis* puede evadir la respuesta Innata al bloquear los mecanismos de muerte y digestión intracelular en el macrófago inhibiendo la formación del Fagolisosoma, favoreciendo su multiplicación intracelular y finalmente la lisis de la célula fagocítica.

El éxito en el control inmunológico de la infección termina con la formación de granulomas en los que se ve implicado la participación del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α). Dentro del granuloma pueden quedar bacilos en estado “suspendido” durante años, lo que se conoce como Tuberculosis Latente (Figura 2). La enfermedad se puede reactivar cuando se produce un estado de inmunodeficiencia (desnutrición, VIH, diabetes) que alteran la formación de células Th1 y la producción de IFN- γ (Nicod, 2007). Debido al carácter intracelular de la infección, la respuesta Adaptativa Humoral mediada por las células B mediante la producción de anticuerpos no es relevante en la protección contra la tuberculosis, por lo que su importancia solo recae en el apoyo al diagnóstico serológico de la enfermedad.

Una vez que se ha producido el contagio, tan sólo el 5% de los casos quedará sin control inicial, evolucionando a una tuberculosis primaria, en el resto (95%), los bacilos permanecerán controlados en estado latente, de los cuales, un pequeño porcentaje (5%) presentará la enfermedad años después como un proceso de reactivación. En general, la probabilidad de enfermar dependerá, en gran medida, de diversos factores o condiciones del huésped usualmente asociados a inmunodeficiencia. En los pacientes inmunodeprimidos con SIDA u otros procesos, la reactivación puede suponer cerca de la mitad de los casos (Stewart, 2003).

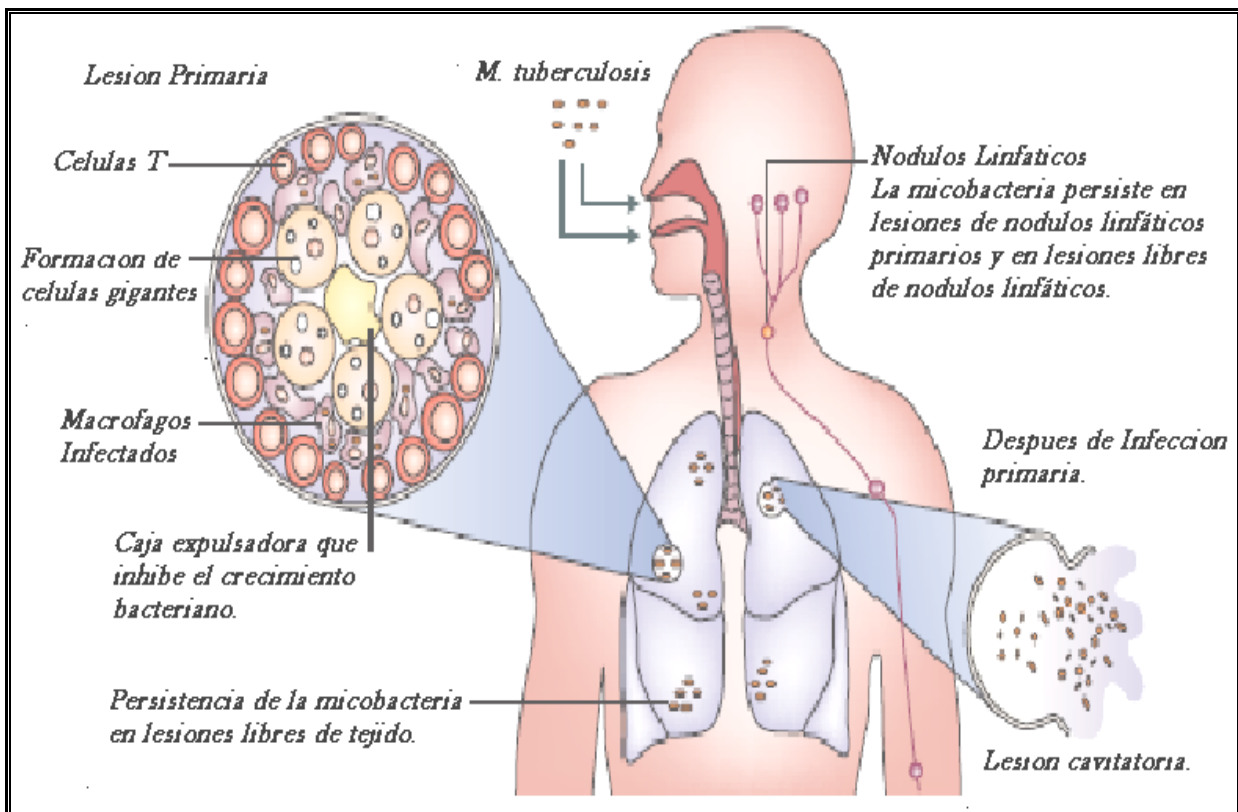


Figura 2. Los estudios de los tejidos de animales e individuos asintomáticos han demostrado presencia de *M. tuberculosis* viables en las lesiones primarias en el pulmón y también en ganglios linfáticos. A pesar de que las lesiones primarias pueden ocurrir en cualquier parte del pulmón, después de la enfermedad primaria se desarrolla más en la región apical. Tomado de Stewart, 2003.

Las manifestaciones clínicas de una tuberculosis pulmonar primaria en la mayoría de los casos es asintomática, o bien, la sintomatología es leve y se puede confundir con una infección de las vías respiratorias superiores. Cuando hay síntomas, se presenta fiebre de predominio vespertino de una a dos semanas de duración, anorexia y astenia. En los casos avanzados puede encontrarse neumonía, bronquitis, derrame pleural y atelectasia.

En una tuberculosis pulmonar posprimaria, que es la forma más frecuente en el adolescente y el adulto, el paciente manifiesta anorexia, pérdida de peso, fiebre vespertina y tos. El examen clínico de los campos pulmonares puede ser normal o revelar estertores alveolares en las zonas apicales (URL 1).

1.6 Métodos de Diagnóstico de la Tuberculosis.

El diagnóstico de la tuberculosis se ha basado fundamentalmente en la identificación bacteriológica del bacilo, el análisis radiológico de pacientes, y la aplicación del test de la tuberculosis o PPD. El diagnóstico microbiológico convencional de la TB se basa en cuatro etapas sucesivas: la tinción de la muestra para la visión directa a través del microscopio (baciloscopia), el cultivo en medio sólido, la identificación por técnicas bioquímicas y las pruebas de sensibilidad a fármacos.

1.6.1 Baciloscopia.

La Baciloscopia juega un papel importante en el diagnóstico temprano en infecciones con tuberculosis porque la mayoría de las micobacterias se desarrollan lentamente y los resultados del cultivo se tienen disponibles solo después de semanas de incubación. La Baciloscopia es a menudo el único método de diagnóstico disponible en países en desarrollo (Palomino, 2007).

Las técnicas empleadas, Ziehl-Neelsen y Kinyoun, utilizan fucsina básica en etanol como colorante primario. En ambos casos, los Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR) se ven como pequeños bastones curvados de color rojo sobre un fondo de tono azulado. En la técnica de Ziehl –Neelsen se debe recurrir al calor para lograr la penetración del colorante primario, una vez dentro, el colorante no podrá ser extraído tras la exposición al alcohol-ácido. En contraste, la técnica de Kinyoun, emplea cuerpos tensoactivos, sin necesidad de calentar el colorante.

Hay métodos que utilizan como colorante primario determinados fluorocromos (auramina o auramina-rodamina) donde los microorganismos que son BAAR, bajo la luz ultravioleta, aparecen fluorescentes de color amarillo o naranja dependiendo del filtro empleado (Alcaide, 2005).

La baciloscopia es la técnica de elección en el diagnóstico de la TB, en todos los medios, por su sencillez y reproductibilidad en cualquier medio, rapidez, bajo costo y elevada especificidad.

La gran limitación de baciloscopia es su relativamente baja sensibilidad, que hace que la gran mayoría de los casos que se detectan por esta técnica sean bastante avanzados (Caminero, 2003).

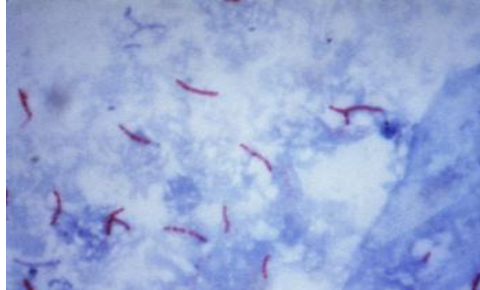


Figura 3. Imagen representativa de una baciloscopia con tinción de Ziehl-Neelsen donde se observan los bacilos de color rojo sobre un fondo de tono azulado.

1.6.2 Cultivo de las Micobacterias.

El cultivo complementa la baciloscopia ya que permite poner en evidencia bacilos viables presentes en escasa cantidad en una muestra de lesión, caracterizarlos para certificar que sea el bacilo de la tuberculosis y conocer si es sensible o resistente a los fármacos antituberculosos. (Barrera y col., 2008)

Existen diferentes medios de cultivo en uso para el aislamiento de las micobacterias. El cultivo de las micobacterias es el único método que puede asegurar un diagnóstico de certeza de TB (con la identificación correspondiente) y el único que es completamente válido para evaluar el seguimiento del enfermo y asegurar la curación. El cultivo produce resultados tardíamente pero es más sensible que la baciloscopia. Puede evidenciar un mínimo de 10 a 100 BAAR presentes en una muestra si es realizado en forma adecuada, y permite detectar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos (Palomino, 2007).

El bacilo de la tuberculosis puede crecer utilizando glicerol como fuente de carbono, y asparagina, iones de amonio como fuente de nitrógeno y micronutrientes al tiempo que metaboliza el glicerol a piruvato. Otro componente clave para el desarrollo del bacilo es la albúmina, habitualmente incorporada en los medios de cultivo con el agregado de huevo o seroalbúmina (Barrera y col, 2008).

El medio de Lowenstein-Jensen (LJ) es el más utilizado en la mayoría de los laboratorios clínicos de diagnóstico, el cual es un medio selectivo que no permite el desarrollo de otras bacterias y hongos ya que contiene 0.025 g/100 ml de verde de malaquita, cicloheximida, lincomicina, y ácido nalidíxico como inhibidores. Además de contener huevos enteros coagulados, sales, glicerol y fécula de papa, en este tipo de medio sólido *M. tuberculosis* presenta colonias secas, rugosas y friables. El medio Stonebrink tiene una composición similar al medio Lowenstein-Jensen con la excepción de que el glicerol es remplazado por 0.5 % de piruvato de sodio (Koneman, 2008).

Los medios de Middlebrook que contienen agar son transparentes y permiten la detección temprana del crecimiento después de 10 a 12 días, esto se debe parcialmente a la inclusión de OADC (Oleico, Albúmina, Dextrosa y Catalasa) para estimular el restablecimiento de los bacilos dañados en las muestras clínicas; de éstos los más utilizados son el 7H9 que es un medio líquido donde los bacilos tienden a permanecer paralelos unos con otros y formar largas cadenas o “cordones”, y los que contienen agar 7H10 y 7H11 que son utilizados para el aislamiento y las pruebas de susceptibilidad a fármacos de primera línea (Isoniazida, Rifampicina, Etambutol, Estreptomicina, y Pirazinamida) que además contienen sales, vitaminas, cofactores, ácido oleico, albúmina, catalasa, glicerol, glucosa e inhibidores que varían como el verde de malaquita, cicloheximida, lincomicina, ácido nalidíxico, carbanicilina, anfotericina B, polimixina B y lactato de trimetoprim. (Koneman, 2008).



Figura 4. Se muestra algunos de los medios de cultivo para micobacterias. A la derecha se observa el medio Lôwenstein-Jensen (LJ) en donde se puede observar el crecimiento de las micobacterias. A la izquierda, se observa el agar Middlebrook 7H10.

El tiempo de detección de crecimiento de una micobacteria puede acortarse gracias al uso de un sistema de cultivo líquido automatizado o semiautomatizado que puede detectar crecimiento mucho antes que lo que se puede observar a simple vista. (Watterson y col, 2000). En la última década, diversos medios de cultivo fueron introducidos, tal como los son el Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT), Bract/Alert, ESP Mice, BACTEC MGIT960, y Bactec 460. Estos sistemas emplean un medio de cultivo líquido semisintético 7H12 de Middlebrook (caldo 7H9 de Middlebrook enriquecido con albúmina, catalasa e hidrolizado de caseína), una mezcla de selectiva de PANTA (polimixina B, azlocilina, ácido nalidíxico, trimetoprim, y anfotericina B) y un suplemento de enriquecimiento de estearato de polioxietileno (POES) (Hines y col, 2006; Manterola, 2004).

1.6.3 Nuevos Métodos de Diagnóstico.

También durante la última década se han desarrollado una serie de técnicas de biología molecular que permiten la amplificación de secuencias de ADN y de ARN específicas del complejo *M. tuberculosis* las cuales permiten generar, a partir de una única copia de ADN o ARN, mediante un proceso enzimático, millones de copias de un fragmento específico de ácido nucleico, facilitando de esta forma la detección de *M. tuberculosis*. Estas tecnologías que se mencionan a continuación han logrado solventar los principales problemas inherentes a las técnicas microbiológicas convencionales, permitiendo establecer diagnósticos rápidos (entre 2 y 8 horas) y mejorar la sensibilidad de los métodos de cultivo tradicional.

- *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).*

La PCR se puede aplicar para la detección específica de secuencias de genes de micobacterias en muestras clínicas y cultivos ofreciendo una alta sensibilidad a la prueba y un rápido diagnóstico. El diagnóstico por PCR de micobacterias puede estar dirigido a la amplificación de secuencias específicas de género seguido de una exploración de oligonucleótidos para dar una prueba específica de especie y por último la amplificación de secuencias específicas de especie. El gran potencial de la PCR en el diagnóstico de la tuberculosis está relacionado con la velocidad y la sensibilidad de la técnica (Hart y col, 1996).

- *Espoligotipificación.*

Este método está basado en la tipificación del polimorfismo de los espaciadores del ADN en un particular locus cromosomal llamado “región de Repetición Directa (DR)” que se encuentra únicamente presente en las bacterias del complejo *M. tuberculosis*. La presencia o ausencia en la región DR de 43 espaciadores de secuencia conocida puede ser detectado por hibridación de ADN amplificado por PCR para un conjunto de oligonucleótidos que representan cada una de las secuencias de ADN únicas del espaciador, este método se conoce como *spoligotyping*. Los iniciadores utilizados se encuentran en la región DR y amplifican hasta 43 regiones espaciadoras únicas que están entre cada secuencia DR. El método es especialmente útil para detectar de forma simultánea el tipo de bacteria del complejo *M. tuberculosis* en muestras clínicas. La ventaja que presenta la Espoligotipificación es que no requiere de un análisis sofisticado facilitándolo mediante una base de datos y su tiempo de ejecución es de un solo día. (Oelemann y col. 2007; Kamerbeek y col. 1997; URL 2).

- *VNTR-MIRU TYPING.*

VNTR-MIRU del inglés variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units, son unidades de repetición intergénica de 40 a 100 pb que se encuentran como repeticiones contiguas dentro del genoma del complejo *M. tuberculosis*. La técnica de VNTR-MIRU se basa principalmente en la amplificación de 12 loci independientes con la determinación de su longitud en pb. y provee una indicación del número de repeticiones de cada locus. (Supply y col, 2006; Oelemann y col 2007; Alonso-Rodríguez y col, 2008).

- *RFLP (Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción).*

Este método está basado en la ruptura enzimática del ADN por enzimas de restricción que cortan en puntos específicos según la secuencia de bases. Para el caso de TB, la secuencia de inserción (IS) es la denominada IS6110. El genoma de *M. tuberculosis* contiene entre 5 y 20 copias de IS6110, localizadas en posiciones variables a lo largo del cromosoma, debido a su capacidad de transposición. Esta secuencia tiene una alta conservación y se encuentra presente típicamente en múltiples copias de *Mtb*, que con esto se incrementa la sensibilidad de detección.

La enzima PvuII (*Proteus vulgaris*) reconoce una secuencia interna de la IS6110, dichos cortes provocan que la IS presente un alto polimorfismo en los patrones de bandas de los aislados de *M. tuberculosis* obteniéndose diferentes patrones genéticos para cada cepa (Caminero y col. 2001; Eilers y col. 2004).

Las técnicas anteriormente descritas han aportado valiosa información para: a) conocer el patrón epidemiológico general en una población, b) en el control de epidemias, c) en la diferenciación de las recaídas de las reinfecciones exógenas, y d) en el estudio de contaminaciones cruzadas en el laboratorio. Sin embargo, los resultados obtenidos por estas técnicas siempre deben ser evaluados conjuntamente con lo que aporta la epidemiología convencional. La desventaja que presentan estos métodos es su alto costo y complejidad, así como la elevada transmisión de TB que existe en los países con escasos o medios recursos económicos, contraindica su utilización en estos países.

1.7 Epidemiología.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* y en riesgo de desarrollar la enfermedad. Calcula asimismo, que anualmente hay una ocurrencia superior a los 10 millones de casos nuevos con dos millones de defunciones (URL3). La resistencia a los antimicrobianos usados en el tratamiento de las enfermedades infecciosas es un mecanismo natural de defensa de los microorganismos que generalmente es desencadenado por el hombre. El uso de monoterapia en el tratamiento de la tuberculosis, la falta de apego del paciente al tratamiento por diversos factores, el empleo de regímenes de tratamiento inadecuados, el abastecimiento incompleto de los medicamentos antituberculosos, así como el empleo de medicamentos de mala calidad, si bien evita el crecimiento del bacilo, permite la multiplicación de cepas resistentes. Estos son algunos de los principales causales de que la tuberculosis farmacorresistente se haya convertido en un problema global de Salud Pública (Figura 6) (Mendoza y col. 2007).

En el Plan Mundial para detener la TB, la meta para el 2015 es disminuir las tasas de prevalencia y mortalidad registradas. Al respecto América Latina, Asia Suroriental y

el Pacífico occidental están en dirección correcta para alcanzar dichas metas, lo que no sucede en África y los países del Mediterráneo oriental (URL 4).

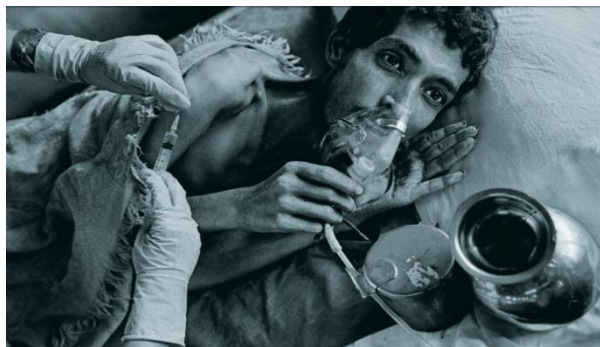


Figura 5. Cada año, la tuberculosis mata a 2 millones de personas e infecta alrededor de 8 millones más. Esta imagen muestra un paciente de Mumbai, India, infectado con TB-MDR.

Las enfermedades más frecuentemente asociadas a tuberculosis son: diabetes mellitus, desnutrición, alcoholismo, y VIH/ SIDA; asimismo, la desnutrición en niños alcanza hasta un 24% (URL 4); estos factores asociados con la infección de TB presentan un alto riesgo de muerte (Millet y col.2011).

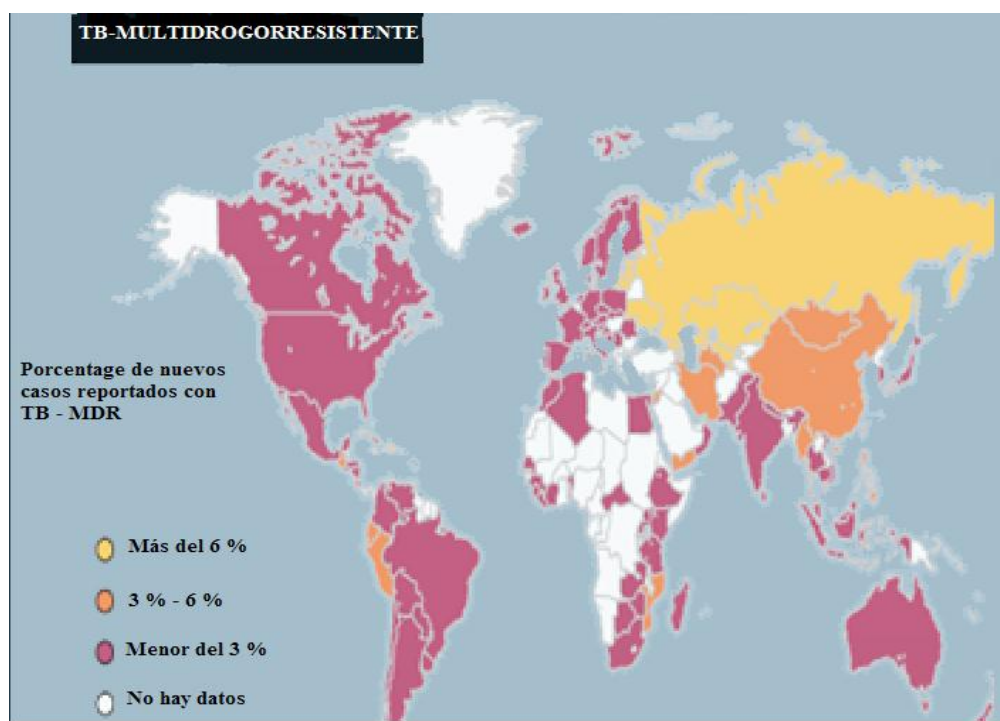


Figura 6. La tuberculosis se produce en casi todos los países del mundo, aunque es más frecuente en los países en desarrollo. Peor aún es la prevalencia de TB-XDR, que hasta el 2008, 49 países habían confirmado casos. En el mapa se observa la incidencia en porcentaje de casos de casos con TB-MDR: más del 6%(amarillo), 3-6%(naranja), menor de 3%(rosa).Tomada de Barry y col. 2009.

El VIH es el factor de más peso para incrementar el riesgo de TB. El impacto del VIH en el comportamiento epidemiológico de la tuberculosis depende directamente del tamaño de la superposición entre las poblaciones infectadas. A mayor número de infectados, la posibilidad de que exista una interacción entre las dos patologías es mayor, con el consiguiente aumento en el riesgo de contraer la infección. El aumento de casos de tuberculosis en personas viviendo con VIH, plantea el riesgo de transmisión a la población en general. Por su parte, la tuberculosis acelera la multiplicación del VIH y conduce a una rápida progresión a SIDA (URL 3). A finales de 2003 se calculó una prevalencia de infección por el VIH de 1.3% de los pacientes con tuberculosis en América. Asimismo, en el mundo existen alrededor de 13 millones de personas que viven coinfectadas con VIH y TB. La información internacional sugiere que por lo menos una de cada tres personas vive en estas condiciones; de éstas, 40 a 60% desarrollarán tuberculosis activa. Aproximadamente 11% de dichas personas morirá como resultado de la coinfección y sus complicaciones (URL 4).

A pesar de los avances en medicina, todavía hace 100 años los estudios postmortem sugerían que casi la mitad de enfermos de diabetes moría con Tuberculosis Pulmonar (TBP). La incidencia de la enfermedad varía de país a país, así, se conocen cifras de 0.9 a 14% de Jamaica a Hong Kong, respectivamente; 2.8 en África y 5.8 en India. En general, el riesgo de diabetes y tuberculosis se incrementa desde dos hasta 6 veces para tuberculosis. La enfermedad tuberculosa puede desarrollarse entre el primer y quinto año de la diabetes y ser motivo de descompensación metabólica persistente (URL 3).

Los estudios de tamizaje a usuarios de sustancias (alcohol, tabaco y otras drogas), repetida o consistentemente, han mostrado un mayor riesgo de desarrollar tuberculosis, comparado con la población general. La tuberculosis es un serio problema de salud entre las personas con adicciones, mostrando un mayor riesgo de infectarse y elevada prevalencia de tuberculosis latente. Aunque la relación entre alcoholismo y tuberculosis es ampliamente conocida, el abuso de drogas se ha identificado como factor asociado a un incremento del riesgo de infección y enfermedad tuberculosa; sin embargo, no se ha podido establecer si el riesgo es sólo por la adicción a drogas o por la elevada prevalencia del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) o bien por desnutrición, indigencia o mendicidad, además de otras condiciones sociales a que el usuario de

drogas intravenosas puede estar expuesto. En México, la mortalidad por tuberculosis pulmonar ha mostrado una tendencia descendente en los últimos ocho años, presentándose una tasa de 2.1 defunciones por TB pulmonar por cada 100,000 habitantes, lo que corresponde 2,837 defunciones en el año 2000, comparada con una tasa de 1.8 muertes por TB pulmonar por 100,000 habitantes, lo que corresponde a 1,950 defunciones por esta causa durante 2008. Lo anterior refleja un descenso de la tasa de mortalidad de 14% (URL 4).

En el último reporte de la OMS en el año 2010, México está considerado entre los países con incidencia estimada de tuberculosis en todas sus formas menor a 24 por 100 mil habitantes. En nuestro país se registran cada año cerca de 15 mil casos nuevos de tuberculosis pulmonar y cerca de dos mil defunciones por esta causa, lo que representa una importante pérdida de años potenciales de vida saludable y, por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de México, ya que el promedio de edad de muerte por este padecimiento es de 54 años. La situación de la TB pulmonar en las entidades federativas presenta patrones de concentración bien definidos de estados con tasas de incidencia elevadas, principalmente en occidente y Golfo de México y con menor incidencia en los estados del centro. Cabe señalar que Baja California, Guerrero y Tamaulipas duplican la tasa nacional (13.8), y junto con Veracruz, Chiapas, Nuevo León, Jalisco, Sinaloa, Nayarit, Guerrero, Sonora, Oaxaca y Chihuahua, concentran 70% de los casos identificados.

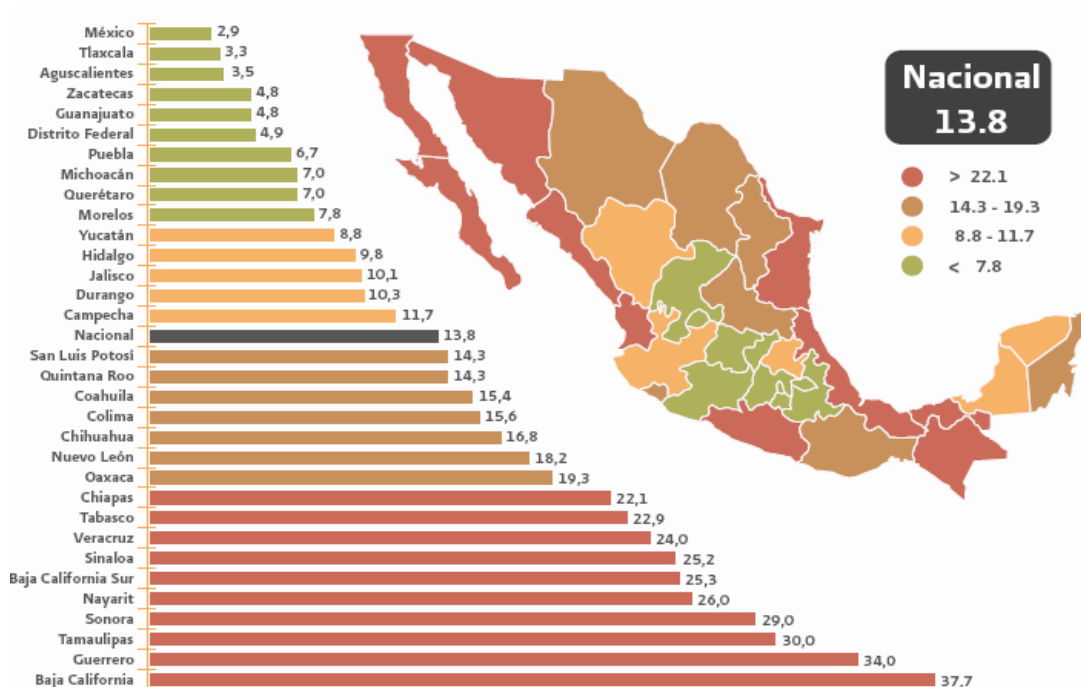


Figura 7. Morbilidad por tuberculosis pulmonar (Tasa por 100, 000 habitantes) (URL3).

La TB sigue siendo más frecuente en los varones (razón hombre: mujer 5:1), aunque varía de un estado a otro, lo que puede deberse a factores sociales y de comportamiento, ya que en la edad pediátrica prácticamente no existe diferencia (URL 3).

En cuanto a la relación Diabetes mellitus y Tuberculosis, la información existente en México indica que se relacionan en 5.3% y los índices estimados de tuberculosis para pacientes con diabetes, en comparación con los no diabéticos, es de 20.9 vs. 30.7 por 100,000 personas al año. Por tanto, la comorbilidad diabetes/tuberculosis puede entorpecer el pronóstico en personas que presentan formas pulmonares complicadas.

1.8 Epidemiología Molecular.

Hace 2 décadas, la irrupción y el posterior desarrollo de las técnicas de biología molecular en el mundo de la microbiología clínica han supuesto un gran avance en el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Esto ha sido especialmente relevante en todos aquellos apartados donde la metodología convencional ha evidenciado sus mayores limitaciones, como han sido la virología y determinadas infecciones fúngicas y parasitarias.

La epidemiología molecular ha comenzado a desarrollarse recientemente a partir de la integración de la biología molecular en la investigación epidemiológica. Su objeto de estudio son los factores de riesgos genéticos y ambientales de nivel molecular en la etiología, la distribución y la prevención de las enfermedades. Puede abarcar estudios descriptivos y analíticos para evaluar las interacciones huésped-ambiente en las enfermedades; investigaciones sobre estrategias de control de las enfermedades de origen bacteriano, parasitario y vírico a través del diagnóstico molecular; y desarrollo de métodos de evaluación de riesgos y localización de individuos susceptibles mediante programas genéticos de detección aplicados a la prevención de enfermedades no transmisibles y trastornos genéticos.

Uno de los aspectos más relevantes y controvertidos sobre la aportación de la biología molecular en el diagnóstico de la TB es la detección directa de *M. tuberculosis* de la muestra clínica. Es indudable que el diagnóstico rápido (de 24-48 h) de la TB activa

representa uno de los mayores retos en el control de la enfermedad, ya que posibilita una intervención epidemiológica (aislamiento y estudio de contactos) y tratamiento precoz, que incrementa las posibilidades de interrupción de la transmisión infecciosa (Alcaide, 2009).

Con el advenimiento de las técnicas moleculares y su aplicación a la epidemiología de la TB se han conocido los fenómenos de transmisibilidad entre cepas virulentas y su relación con los grupos de riesgo, principalmente cuando se asocian a farmacorresistencia. Estas técnicas tienen mayores ventajas en comparación con las técnicas de diagnóstico clásicas, debido a que la identificación y determinación de los patrones de *M. tuberculosis* por las técnicas de laboratorio convencionales es lenta, requiriendo entre tres a seis semanas con la amplificación terapéutica que conlleva.

La introducción de técnicas moleculares en el campo de la TB en conjunto con la epidemiología clásica ha abierto nuevas vías en el estudio de la dinámica de la transmisión de la enfermedad, así como la diseminación de la farmacorresistencia en distintas poblaciones (Baldeviano y col, 2003).

La huella genética de Mtb permite establecer la relación genética de las cepas clínicas aisladas. En el contexto de los datos epidemiológicos es posible aportar sobre la transmisión entre personas con TB activa. (Hernández-Garduño y col. 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1 Esquemas de tratamiento contra la Tuberculosis.

Mycobacterium tuberculosis tiene un tiempo de generación prolongado y la capacidad para entrar en períodos de latencia con una actividad metabólica limitada, lo cual dificulta la acción de los antimicrobianos. Respecto al tratamiento existen poblaciones de bacilos diferentes en función de su localización y actividad. Así, los bacilos presentes en las cavidades pulmonares se multiplican de forma activa en un ambiente aerobio; en el interior de los macrófagos lo hacen en un ambiente microaerofílico que induce la

latencia, y los que se encuentran en el interior de una lesión caseosa cerrada tienen sólo ocasionalmente un ciclo replicativo (crecimiento intermitente). Por otra parte, *M. tuberculosis* puede multiplicarse en los tejidos, donde la penetración de los antibióticos es fácil, o bien encontrarse en cavidades pulmonares, pus o material caseoso, en donde la penetración de los antibióticos resulta más difícil. Finalmente, hay que señalar que el pH del material caseoso y el del interior de los macrófagos es muy bajo, lo cual condiciona la actividad de los distintos fármacos (Pere, 2009).

El tratamiento primario de la tuberculosis en México se realiza utilizando la combinación de los medicamentos de primera línea; se les denomina fármacos de primera línea porque son los más eficaces, los mejor tolerados, los que conllevan a un menor número de reacciones adversas o efectos secundarios, y, además, son los más accesibles (Tabla 1). Es por ello que no existe ninguna justificación para utilizar otros fármacos sin haber agotado previamente éstos, además, para facilitar la adherencia y mejorar la tolerancia, todos deben darse juntos en una sola toma diaria (Caminero, 2003).

Fármaco	Dosis diaria	Dosis 2/semana	Efectos secundarios	Control	Interacciones	Acción
Isoniacida	5 mg/kg Hasta 300	15 mg/kg	Neuritis Hepatitis Hipersensibilidad	GOT GPT	Fenitoína	Bactericida extra e intracelular
Rifampicina	10 mg/kg hasta 600	10 mg/kg hasta 600	Hepatitis Reacción febril Púrpura	GOT GPT	Inhibe anticonceptivos orales Quinidina	Bactericida todas poblaciones Esterilizante
Pirazinamida	15-30 mg/kg hasta 2 g	50 mg/kg	Hiperuricemia Hepatitis	Acido úrico GOT GPT		Bactericida intracelular Esterilizante
Etambutol	15-20 mg/kg	50 mg/kg	Neuritis óptica	Discriminación rojo-verde Agudeza visual		Bacteriostático extra e intracelular
Estreptomina	15-20 mg/kg hasta 1 g	25-30 mg/kg hasta 1 g	Lesión VIII par hipersensibilidad	Función vestibular Audiograma Creatinina	Bloqueante neuromuscular	Bactericida extracelular

GOT = serum glutamate oxalacetic transferase; GPT = serum glutamate piruvic transferase

Tabla 1. Fármacos antituberculosos de primera línea. Mecanismo de acción, población bacilar sobre la que actúan, posología, efectos secundarios e interacciones farmacológicas mas frecuentes. Tomado de Caminero, 2003.

Desafortunadamente, más del 50% de los pacientes sometidos al tratamiento antituberculoso con duración mayor o igual a 6 meses abandonaban el tratamiento, representando un riesgo por la propagación de la enfermedad, recaídas, la aparición de bacilos resistentes a los fármacos y en casos extremos la muerte. Generalmente los lugares en donde se da más la deserción son en las zonas marginales, en las regiones étnicas y con personas que tienen problemas de alcoholismo, drogadicción o problemas mentales. (URL 4, URL 5, URL 6).

Como respuesta a esta problemática, fue diseñada a inicios de los años noventa la estrategia del DOTS (del inglés: “Directly Observed Treatment, Short-Course”) que se traduce en español como TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado), adoptada en ese entonces por 148 países, incluido México. El DOTS ha permitido grandes avances demostrando ser la estrategia más eficiente, a través de la cual, es posible curar al 85% de los enfermos tratados bajo este esquema (URL 6). El DOTS consiste en la observación del paciente de deglutir el medicamento por parte de un trabajador de la salud. Como resultado se observa la eficacia del tratamiento con la curación de más del 90% de los enfermos y reducción del abandono de tratamiento a menos del 5%, en comparación con el promedio nacional (Ferreira y col. 2001). El DOTS está regido por cinco medidas básicas que consisten en la implementación de una serie de estrategias rígidas, sencillas, y operativas que permiten su ejecución con la esperanza de mejorar el cumplimiento con el tratamiento (Davies, 2000., URL 4):

- Intervención organizada y sostenida.
- Identificación de casos temprana y precisa.
- Quimioterapia eficaz y fácil para el paciente.
- Manejo eficaz de los medicamentos.
- Monitoreo basado en los resultados.

A pesar de este esfuerzo, existe una incidencia progresiva de resistencia y multirresistencia a fármacos, que refleja que la estrategia no es suficiente para hacer efectivo el tratamiento, lo que representa un reto operativo de control muy complejo; con ello surgió la estrategia DOTS-Plus, creada por la OMS con el fin de manejar la tuberculosis fármacorresistente (TB-FR) (URL 7). Esta estrategia utiliza fármacos de segunda línea como quinolonas, aminoglucósidos y las tiamidas, este tratamiento es

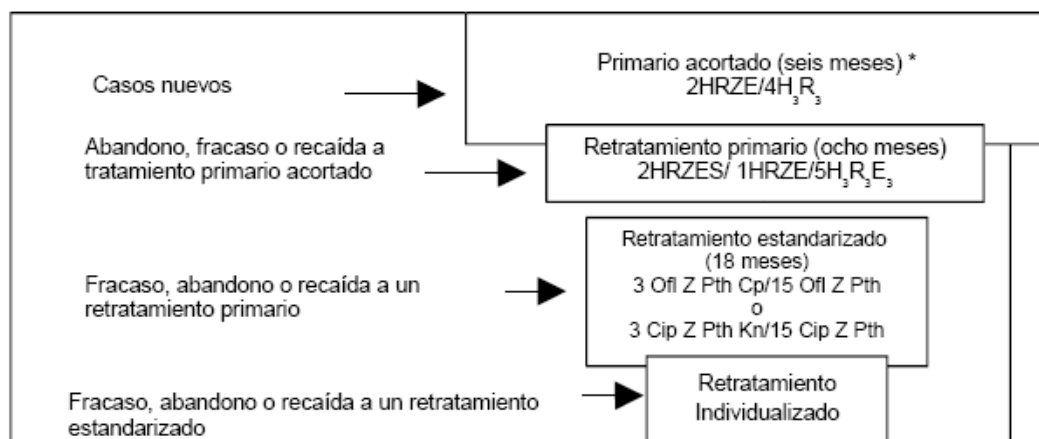
prescrito de manera individual y administrado por el personal de salud estrictamente supervisado. En la tabla 2 se muestran las principales características de estos fármacos.

Fármaco	Dosis diaria	Efectos secundarios	Test efectos 2	Interacción	Notas
Capreomicina	15-30 mg/kg hasta 1 g	Lesión VIIIp nefrotóxic.	Func. vesti. audio. BUN.	Bloqueantes neuromusc.	Bactericida extrace.
Kanamicina	15-30 mg/kg hasta 1 g	Lesión VIIIp nefrotóxic.	Func. vesti. audio. BUN.	Bloqueantes neuromusc.	Bactericida extrace.
Etionamida	15-30 mg/kg hasta 1 g	Trastorn. hepatotóx.	G-I GOT		Bactericida extra e int.
PAS	150 mg/kg hasta 12 g	Trastorn. hepatotóx.	G-I GOT		Bactericida extracelu.
Cicloserina	10-20 mg/kg hasta 1 g	Psicosis convulsión rash	Test psicol.	alcohol	Bactericida extra e int.

Test efectos 2 = test de control de efectos secundarios; trastorn. G-I = trastornos gastrointestinales; GOT = serum glutamate oxalacetic transferase; GPT = serum glutamate piruvic transferase

Tabla 2. Dosis diaria, efectos secundarios e interacciones farmacológicas de los principales fármacos anti-tuberculosos de segunda línea. Tomada de Caminero, 2003.

En México, se han definido las pautas para el tratamiento y retratamiento de la tuberculosis, según la NOM-006-SSA2-1993, como se muestra en la figura 8.



* Excepto formas graves: meníngea, ósea y miliar (diseminada)

Figura 8. Pirámide de éxito terapéutico. Adaptado de la Norma Oficial Mexicana (NOM-006-SSA2-1993). NOTA: Los números cocientes indican el número de meses y los subíndices el número de veces al día en que debe tomarse el medicamento. H: Isoniazida, R: Rifampicina, Z: Pirazinamida, E: Etambutol, OfI: Ofloxacina, Cp: Capreomicina, Cip: Ciprofloxacina, Kn: Canamicina Tomada de URL 6.

2.2 Farmacorresistencia a medicamentos antituberculosos.

La aparición de la resistencia a los medicamentos antituberculosis y en particular la tuberculosis multifármacorresistente (MDR-TB) se ha convertido en un problema importante de salud pública y se estima que cada año los casos en esta condición representan el 2.5 %, motivo por el cual se incluyen, en el Programa Nacional para la Prevención y Control de la Tuberculosis (PNT), estrategias específicas orientadas al diagnóstico, tratamiento, seguimiento y vigilancia epidemiológica de esta enfermedad (URL 8).

La Farmacorresistencia antituberculosis se ha clasificado según las siguientes definiciones:

-Monorresistencia. Es la tuberculosis presente en aquellos pacientes a los que se les identifico cepas infectantes de *M. tuberculosis* que son resistentes *in vitro* a un medicamento de primera línea.

-Polirresistencia. Tuberculosis presente en pacientes a los que se les detecta cepas infectantes de *M. tuberculosis* y que son resistentes *in vitro* a más de un medicamento antituberculoso de primera línea excepto a la Isoniazida y a la Rifampicina simultáneamente.

-Multifarmacorresistencia (TB-MFR). Tuberculosis presente en aquellos pacientes con cepas infectantes de *M. tuberculosis* y que son resistentes *in vitro* como mínimo a la Isoniazida y a la Rifampicina simultáneamente.

-TB con resistencia Extendida (TB-XDR). Cepas de *M. tuberculosis* que se detecta a pacientes con resistencia a isoniazida y rifampicina (MFR) más una quinolona y uno o más de los inyectables de segunda línea (Kanamicina, amikacina y capreomicina) (URL 4).

Actualmente se sabe que para que aparezca una mutación espontánea natural resistente a isoniazida se requiere de 10^5 - 10^7 y una mutante resistente a rifampicina de 10^7 - 10^9

bacilos, por lo tanto, al administrar dos o tres fármacos, la probabilidad de aparición de resistencia es prácticamente nula (10^{18}), ya que se necesitaría de una población bacilar que por su peso y volumen, es imposible que pueda alojarse en el cuerpo humano. Por lo anterior, la resistencia natural es aquella que presentan las cepas salvajes, como fruto de su multiplicación continua que hace que al alcanzar un determinado número de bacilos se produzca una mutación genética en un bacilo, mutación que afecta al lugar donde interviene alguno de los fármacos.

Estudios genéticos han demostrado que la resistencia a los fármacos antituberculosos se debe a mutaciones cromosómicas espontáneas en los genes que codifican el blanco del fármaco o enzimas implicadas en la activación del fármaco. Se han descrito mutaciones puntuales, deleciones o inserciones responsables de resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea o a algunos de segunda línea. No obstante, no se conoce una alteración genética que, por sí misma, dé lugar al fenotipo de multiresistencia (definido como la asociación de resistencias como mínimo a INH y RIF) (Almeida Da Silva y Palomino 2011).

Este fenotipo multiresistente se debe a la adquisición secuencial de mutaciones en diferentes *loci* de genes independientes. Se sabe que también la resistencia se puede deber a la carencia de alguna estructura que inhibe el antibiótico, por modificar el mecanismo del antibiótico inactivándolo, que la bacteria contenga bombas de eflujo que bombeen al exterior al antibiótico, o por alterar la molécula blanco del medicamento (Pere, 2009).

2.3 Fármacos de Primera Línea.

2.3.1 Isoniazida.

La isoniazida (INH, forma hidracida del ácido isonicotínico) es un antibiótico de alta efectividad contra la tuberculosis y parece tener varios blancos dentro de la célula micobacteriana (Parsons, 1997). Este fármaco actúa como un agente bactericida contra el metabolismo activo del bacilo y como un agente bacteriostático contra el resto de los bacilos. INH inhibe específicamente la síntesis de los ácidos micólicos que constituyen uno de los componentes principales de la envoltura de la célula micobacteriana y

contribuyen, en gran medida, a su impermeabilidad (Iglesia y col., 2006). La activación de la INH se lleva a cabo por la enzima catalasa-peroxidasa codificada por el gen *katG* (Pere, 2009).

- *Farmacorresistencia a INH.*

La resistencia de la micobacteria a la INH se empezó a investigar a partir de 1954, cuando Middlebrook observó que las cepas de *M. tuberculosis* altamente resistentes a INH carecían o tenían una importante disminución en la actividad de la catalasa. Este descubrimiento y evidencia bioquímica implicando a la catalasa-peroxidasa en la actividad antituberculosa de la INH, llevó a una serie de investigaciones sobre el gen *katG* que codifican para esta enzima (Luna, 1998). Los aislados clínicos de *Mtb* que exponen resistencia a isoniazida, están asociadas con mutaciones puntuales, deleciones, inserciones o pérdida del gen *katG* (Cade y col. 2010). Las mutaciones causantes de la resistencia a INH están dispersas en el gen *katG* (catalasa-peroxidasa), la región promotor de *ahpC* (alquil hidropoxidasa), *inhA* (enoil-acil reductasa), *kasA* (β -ketoacil ACP sintasa), *mabA* (3-cetoacil reductasa) y *ndh* (NADH deshidrogenasa) (Araya y col. 2011).

Entre el 40 y el 95% de los aislados clínicos de INH resistente, tienen una mutación en el gen *katG*, y de 0 a 5% tienen una mutación en el operón *mabA-inhA*. Las demás mutaciones que se presentan en los otros genes o promotores son muy poco frecuentes, incluso raras aunque si se consideran pues pueden generar importantes resistencias a INH (Hazbón y col. 2006).

- *Gen KatG.*

Como ya se ha mencionado, el gen *katG* codifica para la enzima catalasa peroxidasa de *M. tuberculosis*, y es responsable de la activación del pro-fármaco INH. Cuando se genera una mutación en el gen *katG* puede generar resistencia a INH e inhabilitar la activación del pro-fármaco INH. En gen *katG* es un homodimero funcional y cada monómero está compuesto por dos dominios α -hélices, el dominio N-terminal que contiene un sitio heme y el dominio C-terminal que carece de grupo heme (Hiroki y col. 2010). Los altos niveles de resistencia a INH están asociados con una mutación localizada en la región que conecta el dominio N-terminal y el dominio C-terminal

Se cree que el foco de la mutación en el gen *katG* se encuentra encerrado en un sitio activo, y esta probablemente relacionado con los procesos de activación de INH (Cade y col. 2010). Se han reportado un total de 280 diferentes mutaciones en el gen *katG*, de las cuales hay dos que son las que más predominan, Ser315Thr y Arg463Leu (Hiroki y col. 2010; Van Doorn y col. 2001). Se encuentra reportado que de las 280 mutaciones encontradas, al menos 4 están asociadas con altos niveles de resistencia a INH (D419H, M420T, D542H y R632C) y al menos 3 mutaciones están asociadas con bajos niveles de resistencia (H97R, N133T y P232S). No se conoce si la mutación Ser315Thr confiere altos niveles de resistencia a INH (Hiroki y col. 2010).

-Ser315thr.

A pesar de que se han descrito una gran cantidad de mutaciones en el gen *katG*, la más frecuente es la Ser-315Thr, que se encuentra en aproximadamente el 40% de las cepas resistentes. La mutación se genera por una substitución dada por AGC (Ser)-ACC (Thr). Se ha reportado que esta mutación no solo se da por el cambio del aminoácido Ser-Thr, pues también se da la mutación 315 con los siguientes cambios de aminoácidos: AGC (Ser)-ACG (Leu), AGC (Ser)-AAC (N), en donde la mutación siempre se va a observar por un cambio del aminoácido Serina. La falta de atenuación asociada con la sustitución S315T y su alta frecuencia entre los aislados clínicos resistentes a INH sugieren que la mayoría de estos aislados tienden a conseguir virulencia. Se ha demostrado que las cepas resistentes a INH que presentan una mutación *katG* poseen un MIC de ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$. (Dalla-Costa y col. 2009).

- Arg463Leu.

Esta mutación es la segunda más frecuente después de ser315thr en el gen *katG* y encontrar una mutación Arg463Leu (CGG \rightarrow CTG) en el gen *katG* no está estrictamente asociado con una resistencia a INH, sin embargo se ha descrito que un gran número de aislados clínicos han mostrado tener resistencia a INH (Ahmand y col. 2001). Se ha descrito que esta mutación es un polimorfismo y que se encuentra en aislados de *Mycobacterium beijing*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti*. Estas especies de micobacterias son en general menos susceptibles a INH y en previos estudios se ha demostrado que la

mutación en el codón 463 se encuentra en un 3-61% de los aislados de *M. tuberculosis* susceptibles a INH (Van Doorn y col. 2001., Abe y col. 2008).

-Región promotora inhA (enoil-acil-reductasa).

El gen *inhA* (ORF) codifica una proteína enoil-acil-reductasa involucrada en la síntesis de ácidos grasos. Estos ácidos grasos son el blanco de acción de los derivados de INH. La región promotora del gen *inhA* regula la expresión de la proteína enoil-acil-reductasa. La mutación en esta región puede disminuir el nivel de expresión de la proteína. Todas las mutaciones ocurren en una región reguladora de la región promotora del gen *inhA* con un cambio de los aminoácidos C a T en la posición 15, es en esa región en donde se ha asociado resistencia a INH (Dalla-Costa y col. 2009). Este tipo de mutación le confiere a la micobacterias bajos niveles de resistencia a INH, esto es debido a que *inhA* es una enzima esencial y, por lo tanto, sólo puede soportar una cierta cantidad de reemplazos de aminoácidos sin alterar su función enzimática (Iglesia y col.,2006).

2.3.2 Rifampicina.

La RIF es un antimicrobiano semisintético que al igual que las demás rifamicinas, es un potente inhibidor de la síntesis de ARN mensajero (ARNm), y, por tanto, de la transcripción genética, al unirse a la polimerasa de ARN dependiente de ADN de los procariontes. La RNA polimerasa es un complejo oligomérico compuesto por cuatro subunidades (α , β , β' , y σ) que se encuentran codificadas respectivamente por *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *ropD*. Además de un efecto bactericida sobre las células de *M. tuberculosis* metabolitamente activas, la RIF también posee una excelente acción esterilizante de las bacterias en estado de latencia, tanto en los focos necróticos como en el interior de los macrófagos.

- Fármacorresistencia a RIF.

El desarrollo de resistencia a Rifampicina está agrupada en una pequeña zona del gen *rpoB* e involucra solo 8 de los 23 aminoácidos presentes en una región de 81-bp (27 codones) del gen *rpoB* que corresponde a la región de los codones del 507-533 que codifican para la subunidad del RNA polimerasa de *M. tuberculosis* (Paluch-Oles y col.2009). Se han descrito mutaciones puntuales, inserciones y deleciones que afectan

una región de 100-bp. Kapur y colaboradores detectaron polimorfismos en la zona correspondiente a los 23 residuos de aminoácidos mencionados (Iglesia y col., 2006; Kapur y col. 1994).

A pesar de que se han descrito 35 variantes alélicas, con ligeras variaciones en su distribución geográfica, las mutaciones más comunes (531 o 526) dan lugar a una resistencia de alto nivel con incrementos entre 100 y 400 veces (CIM > 32 µg/ml). Por el contrario cambios polimórficos en los residuos 511, 512, 515, 521 y 529 apenas tienen incidencia en los niveles de CIM (Iglesia y col., 2006).

Todas las mutaciones reportadas en este gen, están causadas por un simple cambio de aminoácidos, y la mutación más frecuente es la que se observa en el codón 531 (42 %) con un cambio de aminoácidos de Ser-Leu. Otras mutaciones se han encontrado con diferentes frecuencias observadas en los codones 526 (18%) y 516 (10.5%) (Chen y col.2010), sin embargo, la resistencia a RIF puede causarse por mutaciones en otras partes del gen *rpoB* fuera de la región de 81-bp, como lo es el codón 176 en el dominio N-terminal, y también los codones 541 y 553. Es importante considerar la posibilidad de mecanismos de resistencia alternativos, como son las bombas de eflujo, encargadas de eliminar gran variedad de compuestos del citoplasma de las bacterias (Mokrousov, 2003).

2.3.3 Pirazinamida.

La PZA es un derivado sintético de la nicotinamida. Posee un potente efecto esterilizante sobre los bacilos tuberculosos latentes en el interior de los macrófagos, no obstante, carece de actividad frente a las demás micobacterias incluyendo otros componentes del complejo tuberculosis. La PZA es un profármaco que es convertido a su forma activa, en ácido piracinoico, por la enzima micobacteriana piracinamidasa. La PZA difunde pasivamente al interior de los macrófagos, donde es convertida en ácido piracinoico que se acumula intracelularmente por un sistema ineficiente de bombeo. El ácido piracinoico actúa sobre su blanco, una enzima implicada en la síntesis de los ácidos micólicos, que actúa disminuyendo el pH intracelular por debajo de los límites tolerados por la enzima (Pere, 2009).

- *Fármacorresistencia a PZA.*

Se ha observado que entre el 72 y el 97% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la PZA posee mutaciones puntuales dispersas del gen estructural (*pncA*) o del promotor de la piracinamidasa. No obstante, existen cepas resistentes a la PZA sin mutaciones del gen *pncA*, en las que esta resistencia se debe a otros mecanismos relacionados con la permeabilidad o el eflujo. Tanto *M. bovis* como *M. bovis* BCG, son constitutivamente resistentes a la PZA debido a una mutación puntual, C → G en el codón 169, del gen *pncA* (Pere, 2009).

2.3.4 Etambutol.

El Etambutol (ETB) etilen-diamino-dibutanol, es un producto isomérico derivado de la etilendiamina. Este fármaco es usado para el tratamiento de la Tuberculosis y de otras infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas como lo es *Mycobacterium kansasii*. Tiene una actividad variable sobre las demás especies de micobacterias de crecimiento lento y su actividad es mucho menor en las especies de crecimiento rápido. El ETB inhibe de forma específica la biosíntesis de la pared micobacteriana (Pere, 2009).

- *Fármacorresistencia a ETB.*

La resistencia al ETB se asocia a cambios en una región genómica definida, el operón *embCAB*, que codifica arabinosil transferasa relacionada con la síntesis de componentes de la pared celular, como el arabinogalactano y el lipoarabinomanano. La resistencia de alto nivel (420 mg/ml) se debe a un proceso múltiple que incluye como primer paso una sobreexpresión de las proteínas *Emb*, para posteriormente añadirse mutaciones en la región *EmbB* o cambios adicionales en los niveles de expresión.

Entre el 47 y el 69% de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes presentan mutaciones en la región *EmbB*. En las cepas que no presentan mutaciones en la región *EmbB* la resistencia suele ser menor, con CIM inferior a 10 mg/ml. La resistencia en *M. tuberculosis* se observa con una frecuencia de 10^{-5} (Pere, 2009).

2.3.5 Estreptomicina.

La Estreptomicina (STR) es un antibiótico producido por algunas cepas de *Streptomyces griseus*, fue el primer fármaco que se desarrolló con actividad contra la tuberculosis. La STR es un antibiótico aminoglucósido que interfiere en la síntesis proteica bloqueando la traducción del ARNm, tanto en su inicio como en la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica (Pere, 2009).

- *Fármacorresistencia a STR.*

El mecanismo conocido de resistencia es por alteración de la diana sobre la que actúan como consecuencia de mutaciones cromosómicas (mutaciones puntuales). Estas mutaciones afectan a los genes que codifican el 16S ARNr (*rrs*) y la proteína ribosómica S12 (*rpsL*).

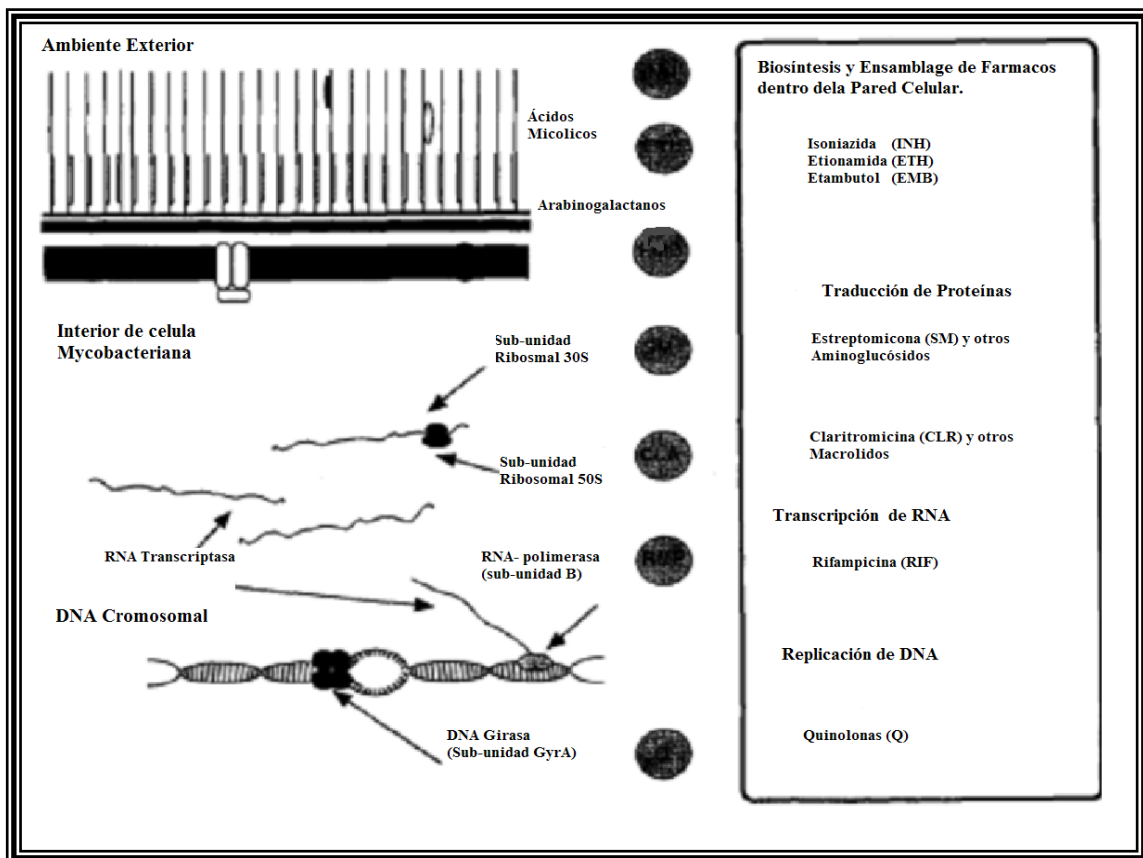


Figura 9. Se muestra los diferentes blancos de acción de los fármacos de primera y segunda línea frente a TB.

Tomada de Parsons y col. 1997.

Diversos estudios indican que la TB-MDR es más difícil de curar y por lo tanto, representan un aumento en el costo del tratamiento. Los índices de curación entre los pacientes con TB-MDR varían entre el 6 y el 59 %. El último estudio realizado en México que estima la prevalencia de TB-MDR en 2.4% en casos nuevos y de 22.4% en pacientes previamente tratados. Dentro de las acciones específicas para el diagnóstico, tratamiento, seguimiento y vigilancia epidemiológica de la TB-MDR se integró un Comité Estatal de Farmacorresistencia (COEFAR) en cada entidad federativa, que sesiona y discute cada uno de los casos registrados en el estado; y se constituyó el Grupo Nacional de Asesoría en Farmacorresistencia (GANAFAR), integrado por médicos de las principales instituciones del país con amplia experiencia en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis, coordinado por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y el Programa Nacional (Mendoza y col 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

En México, la resistencia bacteriana a uno o más de los medicamentos antituberculosos es un factor limitante para garantizar la curación del 100 % de los pacientes y por ende el control de la enfermedad. Debido a esto, México inicio su primera Encuesta Nacional de Fármacorresistencia (ENFR) en marzo del 2008 a marzo del 2009 para poder conocer el impacto de la TB-MDR en México.

Dentro de las actividades de la ENFR se encuentra la caracterización molecular de los aislados obtenidos de 8 estados que participaron en la ENFR con alta, media y baja incidencia de TB. Esto proveerá datos relevantes para conocer la epidemiología molecular de *M. tuberculosis* MDR y poder apoyar en la implementación de mejores estrategias de prevención y control de los grupos de riesgo involucrados en la diseminación de cepas farmacorresistentes dentro del país y de esta forma contribuir al control de la TB-MDR en México.

4. HIPÓTESIS

Mediante el análisis de los patrones genéticos de espigotipos de aislados de pacientes con TB-MDR obtenidos en la ENFR, se determinara la distribución y diseminación de linajes de bacilos MDR y su relación con grupos de riesgo en los estados estudiados.

5. OBJETIVOS.

5.1 General.

- ❖ Determinar los patrones genéticos del perfil de farmacorresistencia de aislados de *M. tuberculosis* MDR y correlacionar con los factores de riesgo del hospedero para identificar los factores del agente y de los pacientes que intervienen en la diseminación de los bacilos farmacorresistentes en la República Mexicana.

5.2 Particulares.

- ❖ Seleccionar muestras de *M. tuberculosis* MDR provenientes de los estados que participaron en la ENFR en Tuberculosis durante los años 2008-2009.
- ❖ Determinar el origen de la farmacorresistencia a Isoniazida (*katG*, *inhA*) mediante PCR Múltiples y PCR-RFLP.
- ❖ Caracterizar genéticamente los aislados de *M. tuberculosis* MDR, mediante la técnica de Espoligotipificación.
- ❖ Analizar la distribución de los patrones genéticos de los aislados farmacorresistentes con respecto a los lugares de su origen, sexo y edad de los pacientes que participaron en la encuesta.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Aislados de *M. tuberculosis*.

Para el presente trabajo, se emplearon 32 aislados de micobacterias farmacorresistentes a partir de la ENFR. Las Entidades Federativas que participaron se seleccionaron con alta, mediana y baja incidencia de TB remitidos al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) a través de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública. Entre los criterios de selección se incluyeron todos los casos de nuevo registro de TB pulmonar con baciloscopía positiva en individuos mayores de 18 años. La determinación fenotípica de la susceptibilidad de las cepas de *M. tuberculosis* a los fármacos de primera línea (SIREZ) se llevó a cabo por medio del método radiométrico BACTEC TB 460. Todos los aislados que se utilizaron eran muestras de esputo y se identificaron mediante las pruebas bioquímicas para catalasa a 68°C, niacina y nitratos.

Los aislados estudiados provenían de los estados de Baja California y Sinaloa con incidencia alta, Chihuahua, Guanajuato, Estado de México y Yucatán con mediana incidencia y Morelos y Querétaro con baja incidencia (URL 8).

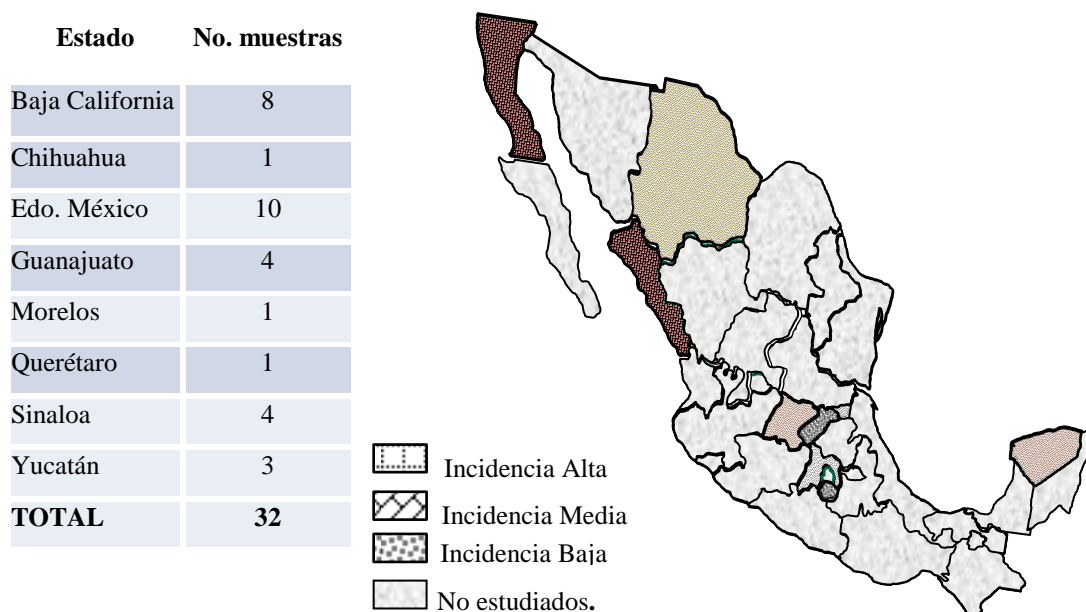


Figura 10. Esquema de la Republica Mexicana mostrando las Entidades Federativas que participaron en la ENFR, así como la prevalencia de TB en cada estado.

El aislamiento de las 32 muestras fue realizado en medio Middlebrook 7H9 y Middlebrook 7H10 para la posterior obtención de ADN genómico por el método de lisozima-proteínasa K con el fin de ser caracterizados a nivel molecular mediante la técnica de Espoligotipificación, así como para la identificación de los genes que le confieren resistencia a Isoniazida (*katG* e *inhA*) mediante las técnicas de PCR.

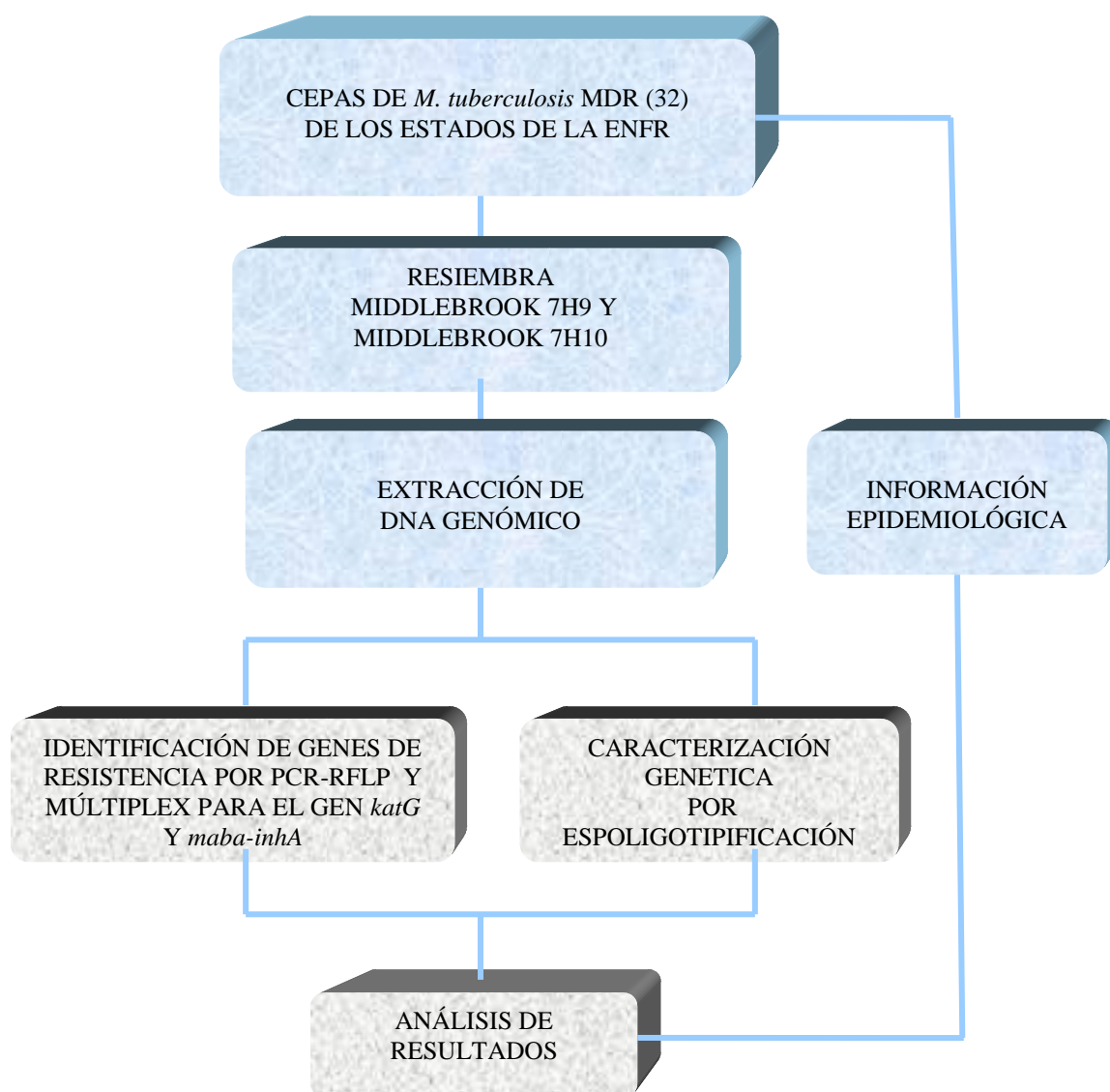


Figura 11. Diagrama general de trabajo

6.2 Resiembra de las muestras en medio Middlebrook.

El proceso de resiembra de las muestras, se realizó únicamente en la cabina de bioseguridad, con el equipo de protección personal adecuado para este tipo de actividad. Los medios empleados fueron placas con medio Middlebrook 7H10 y tubos con caldo Middlebrook 7H9.

Las placas con medio Middlebrook 7H10, se sembraron por pipeteo directo de un inóculo de 200 μ l, cuidando de que la muestra difundiera uniformemente sobre toda la superficie del medio y evitando la formación de grumos. La resiembra de las cepas en caldo Middlebrook 7H9, se realizó inoculando directamente 200 μ l de la suspensión de bacilos en un tubo que contenía 5 ml de medio. Inoculados ambos medios, el caldo se almacenó en una incubadora bacteriológica a la temperatura de 37° C, y las cajas con agar se almacenaron dentro de un cuarto de incubación a 37 ° C, dentro de bolsas estériles para evitar la desecación del medio. El periodo de incubación de los bacilos varió de 2 a 4 semanas.

6.3 Extracción de ADN Genómico por el método de Lisozima-Proteínasa K.

Para el proceso de extracción de ADN, las cepas fueron recolectadas del medio Middlebrook 7H10, las cuales se encontraban preferentemente en la fase exponencial de crecimiento. Las cepas recolectadas se resuspendieron en 500 μ l de TE (1x) dentro de tubos Eppendorf y se calentaron a 90° C por 30 min, enfriándolos a -40 ° C para la inactivación de las cepas. Posteriormente, se agregaron 50 μ l de lisozima (100 mg/ml, resuspendida en agua), se agitaron en vortex durante 30 seg. y se incubaron a 37° C durante toda la noche. Al siguiente día se agregaron 70 μ l de SDS 10 % y 6 μ l de proteínasa K (10 mg/ml resuspendida en agua), se agitaron en vortex y se incubaron a 65° C durante 10 min. Se adicionaron 100 μ l de NaCl 5M y 80 μ l de CTAB/NaCl (previamente calentado a 65° C), se agitaron en vortex hasta obtener un líquido lechoso y se incubó a 65° C durante 10 min. A partir de este paso se trabajó en hielo.

Se agregó 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vortex y se centrifugó a 12000 rpm a 5° C durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio sin tomar la interfase; al sobrenadante se le agregó 600 µl de isopropanol y se colocó a -20° C por 30 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 8 000 xg a 5° C por 10 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 600 µl de etanol al 70 % frío, se agito suavemente y se centrifugo a 8 000 xg a 5° C por 10 min. Nuevamente el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 600 µl de alcohol absoluto y se centrifugo nuevamente. Finalmente, se decantó el sobrenadante y la pastilla se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en aproximadamente 20 µl del amortiguador TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) (Van Soolingen y col. 1991).

6.4 Comprobación de la presencia de DNA genómico.

Para demostrar la presencia y la calidad de DNA obtenido, se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. El buffer con el que se preparó el gel y el buffer de corrimiento fue TBE 1X. Para la electroforesis, cada pozo se cargó con 3 µl de ADN y 1 µl de colorante de corrimiento (glicerol 20%, EDTA 100 mM, Tris mM, azul de bromofenol 0.25 %), y utilizando como marcador de peso molecular DNA de 100 pb. La electroforesis se llevó a cabo por 40 min. a 100 V. Finalmente se visualizó y se realizó la captura de la imagen a través del Fotodocumentador de Imágenes del Laboratorios de Micobacterias del InDRE. El DNA se almaceno a -20° C para su posterior uso.

6.5 Determinación de las mutaciones que confieren resistencia a Isoniazida por PCR Múltiplex.

La determinación de mutaciones en isoniazida se llevó a cabo mediante una PCR Múltiplex que detecta la mutación puntual del codón 315 del gen *katG* Ser → Thr (AGC → ACC), así como la mutación en la posición -15 del extremo 5` de la región promotora *mabA-inhA* (Herrera-León y col., 2005).

Esta PCR utiliza 3 pares de iniciadores, un par amplificara un fragmento de 296 pb con la cual se detectara una mutación en el codón 315 de *katG*, si existe la mutación *inhA*, otro par de iniciadores amplificaran un fragmento de 143 pb, y un tercer par que amplificara una región del gen de la girasa que amplifica un fragmento de 1020 pb, el cual sirve como un control interno de reacción, lo que significa que la ausencia de este producto invalida el análisis de la PCR.

Gen	Iniciador	Secuencia 5' → 3'	Tamaño de amplicon (pb)
<i>gyrB</i>	MTUBf MTUBr	TCGGACGCGTATGCGATATC ACATACAGTTCGGACTTGCG	1020
<i>katG</i>	Katg0f R315 mut	GCAGATGGGGCTGATCTACG TCCATACGACCTCGATGCCAG	296
<i>mabA-inhA</i>	MabAF inhARmut	CGAAGTGTGCTGAGTCACACCG AGTCACCCCGACAACCTATTA	143

Tabla 3. Secuencia de los iniciadores utilizados en la PCR Múltiplex.

La reacción de amplificación por PCR se llevó a cabo a un volumen final de 50 µl de una mezcla de reacción que contenía:

Buffer (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl 25 mM, pH 9)

Deoxinucleósido trifosfato (DNTPS 200 mM)

Iniciador katg0f (20 µM)

Iniciadores gen *gyrB* (40 µM)

Iniciadores gen *mabA-inhA* (40 µM).

Taq polimerasa (2.5 U)

Las condiciones de reacción empleadas fueron 5 min. de desnaturalización inicial a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min. a 95 °C (desnaturalización), 1 min a 68 °C (alineamiento) y 45 segundos a 72 °C (extensión). El ciclo de extensión final ocurrió durante 10 min. a 72 °C. Concluida la reacción, las muestras se almacenaron a – 20 °C.

6.6 Determinación de las mutaciones que confieren resistencia a Isoniazida por PCR-RFLP.

La PCR-RFLP o Reacción en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción, es una técnica que radica en el corte de endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR. El análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) es empleado para detectar mutaciones en los codones 315 y 463 dentro del gen *katG*. Esta PCR se realizó con el fin de poder amplificar una región del gen *katG* de 620 pb para posteriormente analizar este fragmento mediante el análisis de RFLP con el empleo de una enzima.

La región de 620 pb del gen *katG*, fue amplificada utilizando los iniciadores indicados en la tabla 4.

Iniciador	Secuencia 5' → 3'
katG904	AGCTCGTATGGCACCGCAAC
KatG523	TTGACCTCCCACCCGACTTG

Tabla 4. Secuencia de los iniciadores utilizados en la PCR-RFLP.

Una vez terminada la amplificación del fragmento del gen *katG* de 620 pb, 10 µl del producto generado por la PCR fueron digeridos con la enzima *MspI* durante toda la noche a temperatura constante de 37 °C. La reacción se detuvo al colocar las muestras en congelación a -20 °C.

Con el uso de la enzima *MspI* se crearon sitios de restricción observándose fragmentos de 202 pb cuando se encuentra una mutación en el codón 463, un fragmento de 132 pb cuando ocurre una mutación en el codón 315 del gen *katG*, y un fragmento de 153 pb en aquellas muestras tipo silvestre (Wild Type) para el gen *katG*, e decir, aquellas que no presentan ninguna mutación en este gen. Por esta metodología es posible también identificar aquellas muestras que presenten una doble mutación (codón 315+ codón463) (figura 12).

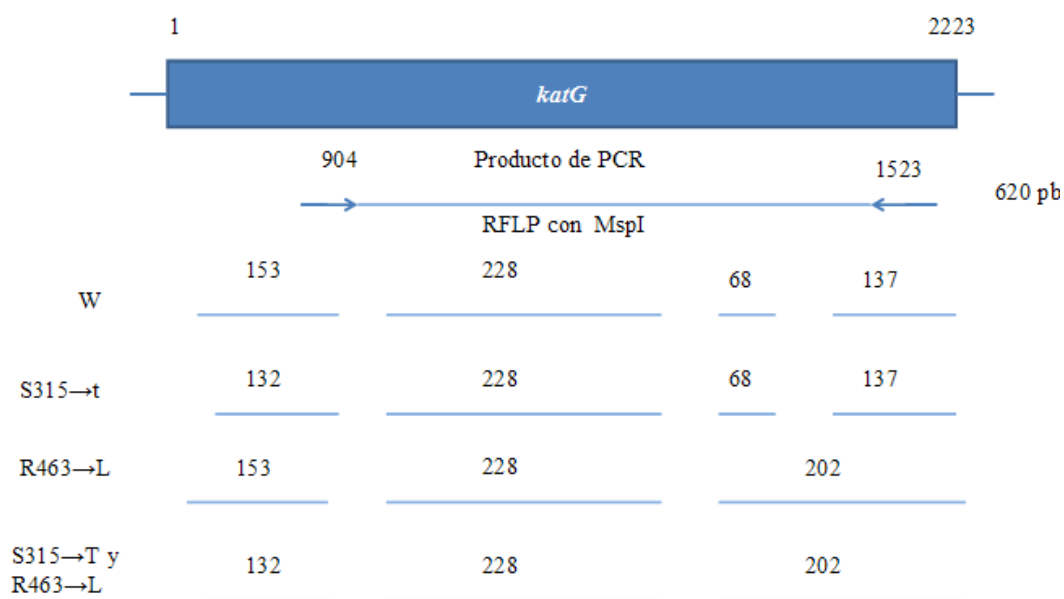


Figura 12. Fragmentos de DNA generados por la digestión con la enzima MspI. Los fragmentos generados dentro del gen *katG* están asociados con la resistencia a Isoniazida. (Adaptada de Uhl y col., 1996).

6.7 Comprobación de amplicones generados por las PCR: electroforesis.

Una vez concluidas las PCR, los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, para la PCR Múltiplex y para el fragmento de 620 pb generado por la PCR-RFLP, en buffer TBE 1X, durante 40 minutos a 100 V, para posteriormente teñir el gel con bromuro de etidio. Los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador de luz UV digitalizando la imagen obtenida.

Para observar los productos generados por la enzima de restricción MspI, la electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida, debido a que los fragmentos generados son de tamaños muy similares y en este tipo de geles se mejora la resolución. Los geles de poliacrilamida se prepararon al 13 % empleando como buffer de corrimiento TBE 1X. Para este proceso la electroforesis se realizó en una cámara vertical a una corriente de 90 V durante 2 horas, posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio. Los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador de luz UV digitalizando la imagen obtenida.

6.8 Caracterización de aislados de *M. tuberculosis* por Espoligotipificación.

La caracterización genética de los aislados de *M. tuberculosis* MDR, se llevó a cabo por la técnica de Espoligotipificación. El método de Espoligotipificación descrito por Kamerbeek y colaboradores (1997) esta basado en el polimorfismo del ADN que presentan las cepas del complejo *M. tuberculosis* en un locus cromosomal en particular, denominado “DR” (regiones de repetidos directos) (Kamerbeek y col. 1997).

Se ha encontrado que la Espoligotipificación discrimina ampliamente aislados de *M. tuberculosis* sobre las bases del polimorfismo genético en la región cromosomal de la región de repetición directa (DR), los cuales presentan secuencias de espaciadores DR idénticos y únicos (Gori y col 2005). Dentro de la ventaja que presenta esta metodología, es que no requiere un análisis sofisticado facilitando la información en una base de datos (Oelemann y col 2007); el código numérico obtenido en la Espoligotipificación permite la caracterización por linajes de *M. tuberculosis*.

Por esta técnica, se amplificó por PCR la región DR, un locus único altamente polimórfico presente en el cromosoma de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (O-Viegas y col. 2010). La reacción de PCR se llevó a un volumen final de 50 µl de una mezcla de reacción que contenía:

Buffer Tth (Tris-HCl 5 mM, KCl 5 mM, MgCl 0.7 mM, pH 9)

Deoxinucleósido trifosfato (DNTPS 200Mm)

Iniciador Dra. Biotilnado en 5' (20 pmol)

Iniciador DRb (20 pmol)

Taq polimerasa (0.5 U)

DNA (10 ng)

La PCR se desarrolló bajo las siguientes condiciones: 3 min. a 96° C de desnaturalización inicial, seguida de 20 ciclos de desnaturalización de 1 min. a 96° C, alineamiento de 1 min. a 55° C y 30 seg, de extensión a 72° C, finalmente 5 min. de extensión a 72° C.

Iniciador	Secuencia 5' → 3'
DRa biotinilado.	GGTTTTGGGTCTGACGAC
DRb	CCGAGAGGGGACGGAAAC

Tabla 5. Secuencia de los iniciadores que amplifican la región DR.

Los productos amplificados se hibridaron con una serie de 43 oligonucleótidos, inmovilizados y unidos covalentemente a una membrana, correspondientes a cada secuencia de DNA espaciador, dentro del locus DR.



Figura 13. DR locus (fragmento). 43 oligonucleótidos (espaciadores) usados para la Espoligotipificación. DVR: Variantes de la región de Repetición Directa.

Para la hibridación, se preparó el siguiente buffer a la siguiente concentración:

20X SSPE:

0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

3.6 M NaCl

20 mM EDTA

Se diluyeron 20 μl de los productos amplificados por PCR, en 150 μl de una solución de SSPE 2X-SDS 1 %, esta se realizó a 60° C durante 1 hora. La membrana se lavó 2 veces en 250 ml de una solución de SSPE 2X-SDS 0.5%, a 60° C por 10 min. Posteriormente se agregó un conjugado estreptavidina-peroxidasa diluido 1: 4000 a 42° C de 45-60 min. y se lavó con una solución de SSPE 2X a temperatura ambiente por 5 min.

La detección de la hibridación del DNA se realizó utilizando el líquido de detección quimioluminiscente ECL (GE Healthcare Limited). Se incubó la membrana por 1 min. en 15 ml de ECL. Finalmente se expuso con placas fotográficas de forma análoga (Driscoll, 2009; URL 2).

7. RESULTADOS.

7.1 Datos Epidemiológicos de las muestras de la ENFR con TB-MDR.

De los 32 aislados obtenidos de los Estados de la Republica a través de la ENFR, 12 muestras provenían de estados con alta incidencia de TB, 18 muestras de estados de mediana incidencia y 2, muestras provenientes de estados con baja incidencia. El número de aislados obtenidos por cada estado, mostró que la mayoría de ellos se concentraba en Baja California y el Estado de México con un 25% y 31.2% respectivamente. Los estados que presentaron un porcentaje intermedio fueron los estados de Sinaloa y Guanajuato con un porcentaje de 12.5% y Yucatán con 9.4%. Los estados que enviaron un menor porcentaje de muestras fueron Chihuahua, Morelos y Querétaro, con un porcentaje de 3.1%.

Estado	No. Muestras	%
Baja California	8	25
Chihuahua	1	3.1
Edo. México	10	31.2
Guanajuato	4	12.5
Morelos	1	3.1
Querétaro	1	3.1
Sinaloa	4	12.5
Yucatán	3	9.4
TOTAL	32	100

Tabla 6. Distribución de los aislados de TB-MDR obtenidos durante la ENFR

La edad de los pacientes estuvo comprendida entre los 18 a 74 años, con un promedio de 45 años. El 8.8 % de los pacientes tuvieron una edad menor a los 26 años, el 59.8% de los pacientes tuvieron entre 26 y 55 años que se encuentran en una etapa económicamente activa, y el 31.04% de los pacientes presentaron una edad mayor a los 56 años.

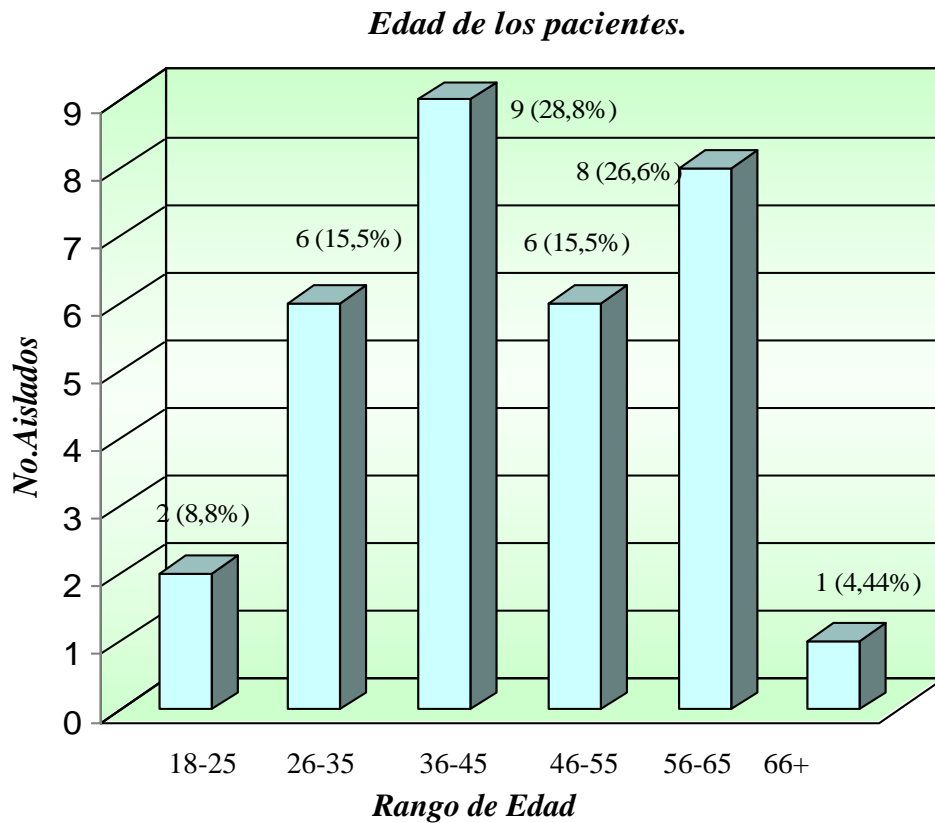


Figura 14. Distribución de las muestras de los pacientes que participaron en la ENFR por grupos de edad.

La población de estudio estuvo integrada por pacientes del sexo femenino y masculino. El 69% pertenecían al sexo masculino, y el 31 % pertenecían al sexo femenino (Fig.15).

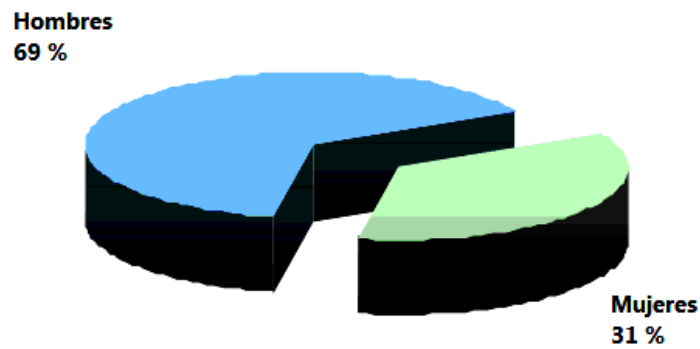


Figura 15. Distribución de los aislados de TB-MDR por género de los pacientes de la ENFR.

De los 32 aislados correspondientes a cada población de estudio, se evaluaron por las pruebas de susceptibilidad a fármacos de primera línea (SIREZ), por el método radiométrico BACTEC 460. Este estudio mostró que la resistencia varío desde dos fármacos, hasta los 5 fármacos de la primera línea, de los cuales 11 (34%) aislados solo fueron MDR.

Las pruebas de susceptibilidad, mostraron un patrón de resistencia del 34 % con dos, 37 % con tres, 16 % con cuatro y finalmente 13 % con cinco resistencias (tabla 7).

Resistencias	No.	%	Patrón de resistencia.
2	11	34	IR
3	12	37	IR+E; IR+S; IR+Z
4	5	16	IR+EZ; IR+SE; IR+SZ
5	4	13	IR+SEZ
	32	100	
I: Isoniazida, R: Rifampicina, E: Etambutol, S: Estreptomina, Z: Pirazidamina			

Tabla 7. Patrón de resistencia a fármacos de primera línea de aislados de *M. tuberculosis*

En los aislados con tres resistencias la distribución fue IR+E con un 25%, IR+S con 58% e IR+Z con un 17 %. En los aislados con cuatro resistencias, las distribución fue IR+EZ con 40 %, IR+SE con 40 % e IR+SZ con 20 % y por último, se presentó un 13% para los aislados que presentaron cinco resistencias.

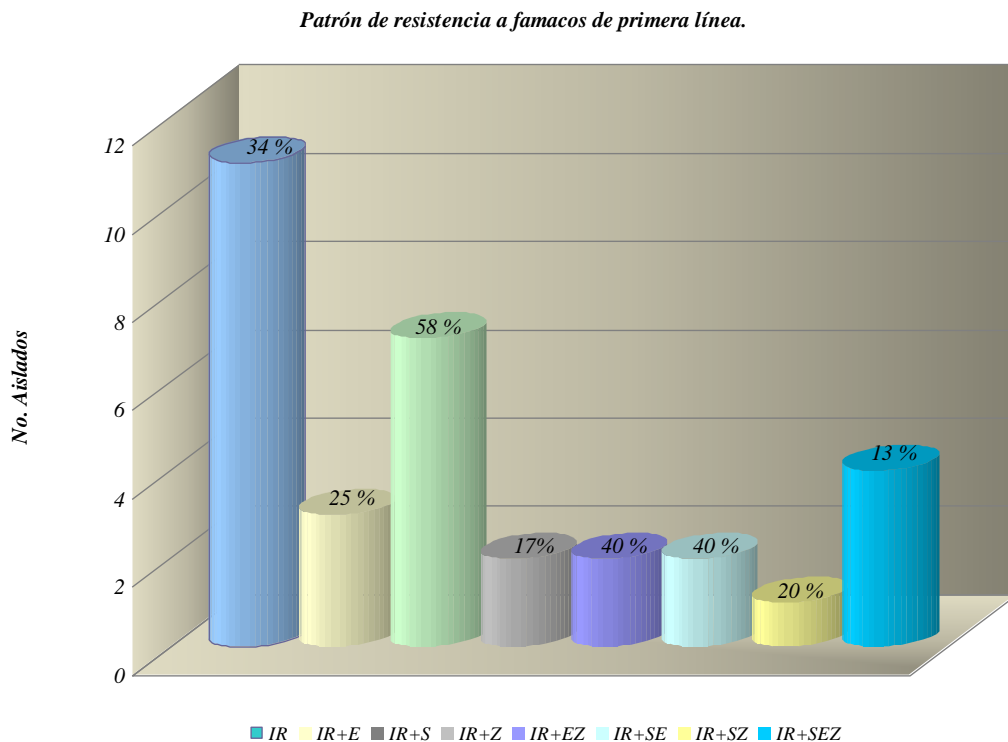


Figura 16. Distribución de los aislados de MTB por resistencia a los fármacos de primera línea (SIREZ).

7.2 Evaluación de la presencia de DNA genómico.

Se obtuvo el DNA genómico de los 32 aislados y se evaluó su calidad a través de la visualización en geles de agarosa al 2 %. El DNA que mostró ser de buena calidad (no degradado) se utilizó para detectar mutaciones en el gen *katG* y para realizar la técnica de Espoligotipificación.

La siguiente imagen muestra los resultados obtenidos luego del análisis electroforético para determinar la presencia del DNA obtenido por la técnica de Lisozima-Proteinasa K.



Figura 17. Electroferograma de DNA genómico de algunos aislados de *M. tuberculosis* MDR en gel de agarosa al 2 %.

7.3 Identificación de genes de resistencia por PCR Múltiplex.

Los 32 aislados fueron evaluados por la técnica de PCR Múltiplex para determinar la presencia de mutaciones encontradas dentro del gen *katG* e *inhA*.

A través de la visualización en geles de agarosa al 2 %, se pudo observar una amplificación correspondiente al gen *gyrB*, el cual es utilizado como testigo de reacción. A 13 muestras (41%) presentaron un fragmento de 296 pb que corresponde a una amplificación de la mutación del codón 315 del gen *katG*, 7 (22%) presentaron un fragmento de 143 pb correspondientes a la mutación del gen *inhA* y 12 (37%) no presentaron ninguna mutación por esta técnica.

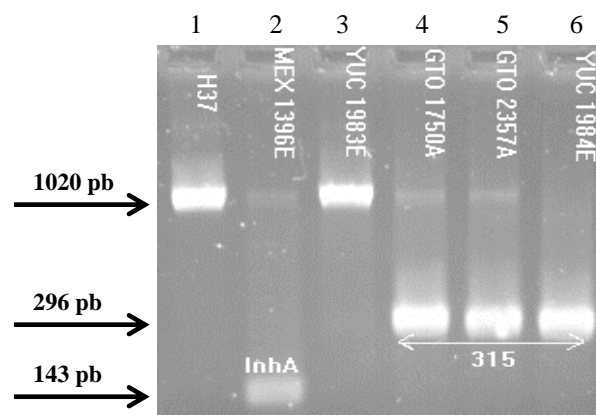


Figura 18. Electroferograma representativo de PCR Múltiplex para los genes *katG* e *inhA* en aislados de *M. tuberculosis* MDR. Carril 1: Testigo, muestra Sensible; Carril 2: mutación -15C-T en la región promotora del operón *mabA-inhA*; Carril 3: muestra sensible; Carril 4-6: mutación AGC-ACC en codón *katG315*.

7.4 Identificación de genes de resistencia por PCR-RFLP.

Se realizó la amplificación de un fragmento de 620 pb correspondiente al gen *katG*, mediante la técnica de PCR-RFLP, el producto se visualizo en geles de agarosa al 2% (figura 19).

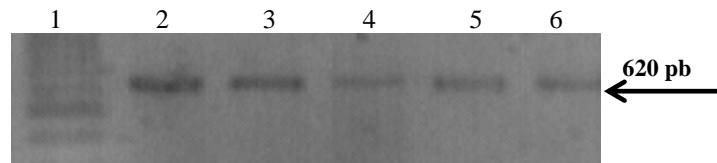


Figura 19. Electroferograma representativo de la PCR del gen *katG* previo a su restricción con *MspI* de diferentes cepas. Carril 1: marcador de talla de 100 bp, carriles 2-6: banda de 620pb de una región de *katG*.

7.5 Perfil electroforético de la digestión con *MspI*.

Los productos de la PCR-RFLP, fueron digeridos con la enzima *MspI* y el resultado fue visualizado mediante electrofóresis en geles de poliacrilamida al 13%. Después de la digestión del fragmento de 620 pb, se encontraron mutaciones en el codón 463 y 315 para el gen *katG* y también se encontraron cepas tipo silvestre (Wild type), que estas son aquellas que no presentaron ninguna mutación para este gen.

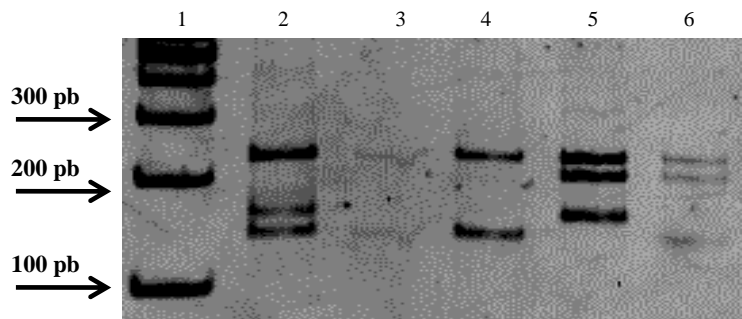


Figura 20. Electroferograma representativo de PCR-RFLP del gen *katG* digerido con *MspI*. Carril 1: marcador de talla de 100 bp, Carril 2: cepa tipo silvestre (Wild Type), Carril 3,4: mutación S315; Carril 5: mutación R463; Carril 6: mutación S315 y R463.

7.6 Frecuencia de mutaciones.

Se realizaron graficas de los valores de las frecuencias totales de cada mutación encontrada en cada una de las PCR realizadas. Para la PCR múltiplex se identificaron 2 tipos de mutaciones, en el gen *katG* que es la que presento un mayor porcentaje y la mutación en el gen *inhA*, también se identifico aquellas muestras que no presentaron mutación en ninguno de estos genes (figura 21).

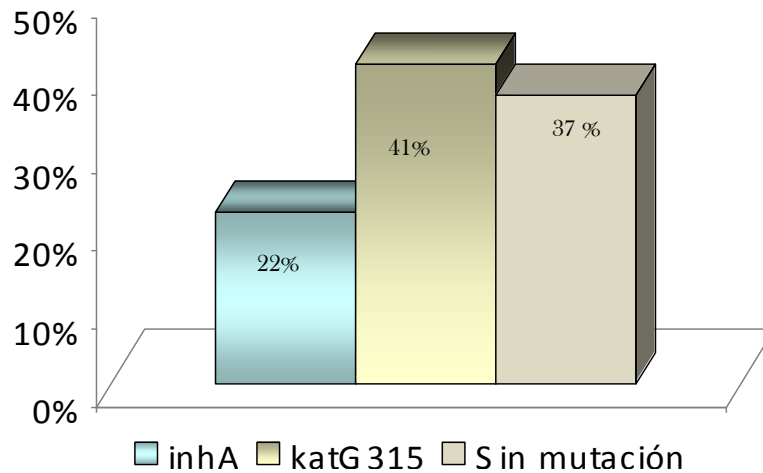


Figura 21. Frecuencia de resultados en PCR Múltiplex

Por la técnica de PCR-RFLP, se identificaron 4 tipos de mutaciones dentro del gen *katG*, en los codónes 315 y 463 donde se encontró la mayoría de las mutaciones, un porcentaje menor de aquellas muestras que presentaron una mutación doble, y un porcentaje aun más pequeño de una mutación no identificada por esta PCR, también se identificaron aquellas muestras que no presentaron alguna mutación en los codónes 315 o 463 dentro del gen *katG* (figura 22).

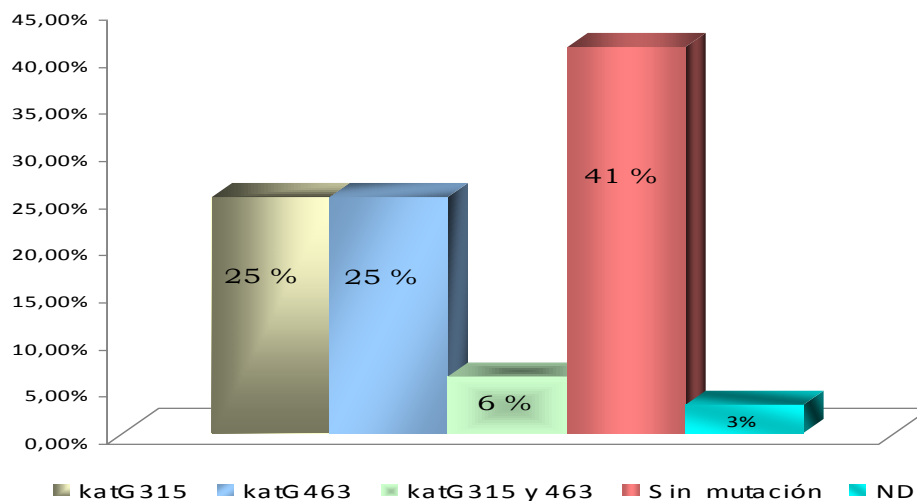


Figura 22. Frecuencia de resultados en PCR RFLP.

Todas las mutaciones encontradas presentes en las muestras de estudio, se agruparon según Entidad Federativa de procedencia, con el fin de identificar el porcentaje de mutaciones y el tipo de mutación presente en cada estado.

Estado	Mutación											
	katG 315		katG 463		katG 315-463		inhA		WT		ND	
	Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%	Recuento	%
BC	2	20	2	28,6	2	67	2	33,3	1	16,6	0	0
CHIH	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16,6	0	0
GTO	1	10	0	0	1	33	2	33,3	0	0	0	0
MEX	1	10	4	57,1	0	0	2	33,3	3	50	0	0
MOR	0	0	1	14,3	0	0	0	0	0	0	0	0
QRO	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16,6	0	0
SIN	4	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
YUC	2	20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100
TOTAL	10	100	7	100	3	100	6	100	6	100	1	100

Tabla 8. Distribución de las mutaciones de *M. tuberculosis* en las distintas Entidades Federativas y el porcentaje total encontrado de cada mutación.

Se realizó una distribución geográfica de los aislados de *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida, con la finalidad de observar la propagación de estas mutaciones en los estados analizados en este estudio (figura 23).



Figura 23. Distribución geográfica de mutaciones que confieren resistencia a INH en aislados de *M. tuberculosis* MDR . K: Mutación en *katG*: 315, 463; I: mutación en el gen *inhA*; ND: Mutación no identificada, SM: Sin mutación. N=32

El análisis de spoligotyping arrojó, del total de 32 aislados analizados mas 2 controles, un total de 29 grupos (clusters) con perfiles de espoligotipos diferentes. El perfil encontrado con mayor frecuencia correspondió al espoligotipo de Beijín seguido del espoligotipo de Bovis (tabla 10).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	No. de aislados con idéntico Espoligotipo	Porcentaje	Linaje						
																																														5	15 %	Beijín			
																																																2	6 %	Bovis	
																																																	1	3 %	Bovis
																																																	1	3 %	Bovis
																																																	1	3 %	EAI
																																																	1	3 %	EAI
																																																	1	3 %	Ghana
																																																	1	3 %	Haarlem
																																																	1	3 %	Haarlem
																																																	1	3 %	Haarlem
																																																	1	3 %	Haarlem
																																																	1	3 %	Haarlem
																																																	1	3 %	LAM
																																																	1	3 %	LAM
																																																	1	3 %	ND
																																																	1	3 %	ND
																																																	1	3 %	ND
																																																	1	3 %	ND
																																																	1	3 %	ND
																																																	1	3 %	ND
																																																	1	3 %	ND
																																																	1	3 %	ND
																																																	1	3 %	ND
																																																	1	3 %	S
																																																	1	3 %	S
																																																	1	3 %	Uganda
																																																	1	3 %	X
																																																	1	3 %	X
																																																	1	3 %	H37rv
																									TOTAL	34	100 %																								

Tabla 10. Espoligotipos de aislados de *M. tuberculosis* MDR con grupos (clusters) con perfiles de espoligotipos diferentes o semejantes.

A pesar de encontrarse con 29 grupos (clusters) diferentes, la base de datos detecto solo 10 linajes distintos para los 32 aislados de las Entidades Federativas (figura 24).

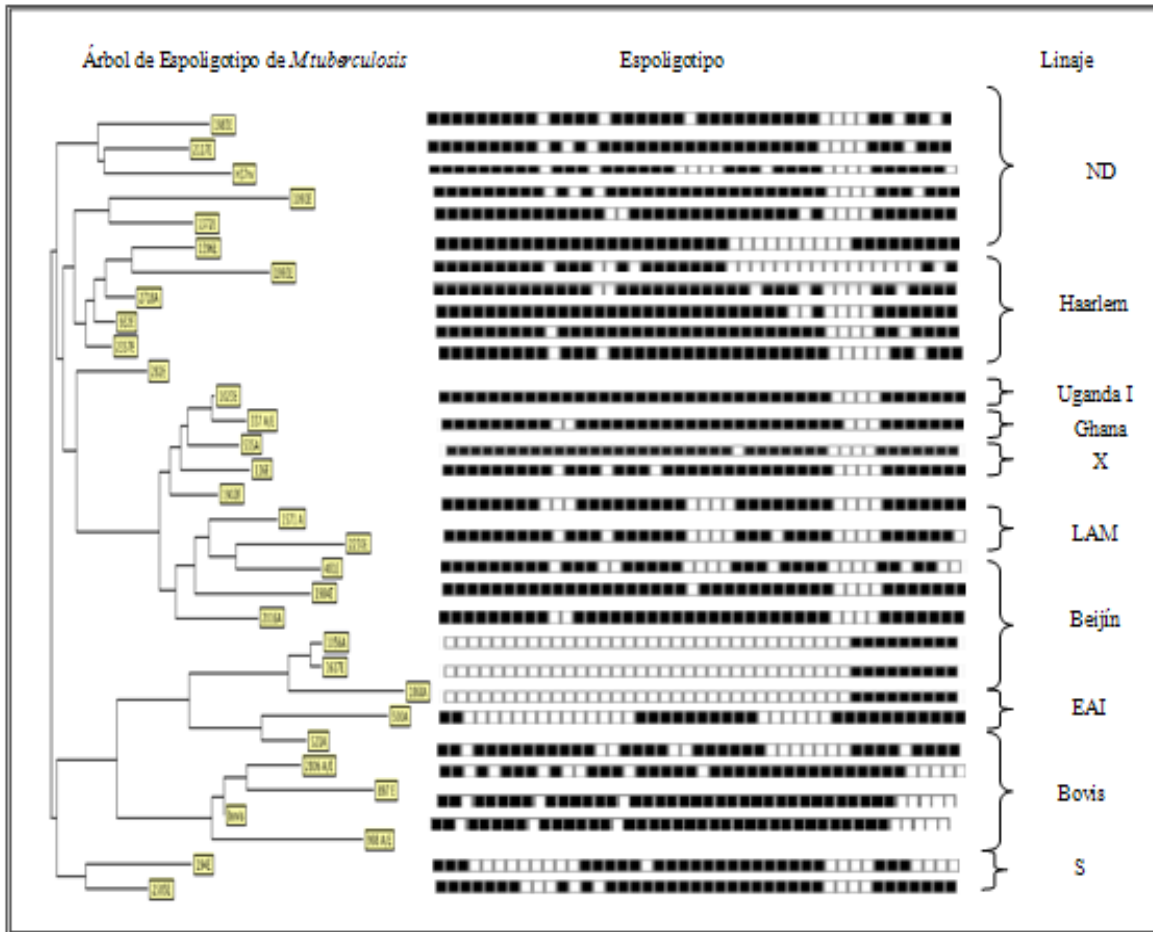


Figura 24. Linajes encontrados de *M. tuberculosis* de los 32 aislados estudiados. ND: No Determinado, LAM: Mediterránea-Latinoamericana, EAI: Indoesteafrica.

De los 32 aislados estudiados, el 27 % la base de datos no pudo determinar el linaje al cual pertenecen por la técnica de Espoligotipificación, los linajes que más se detectaron fueron Beijing y Haarlem (figura 25).

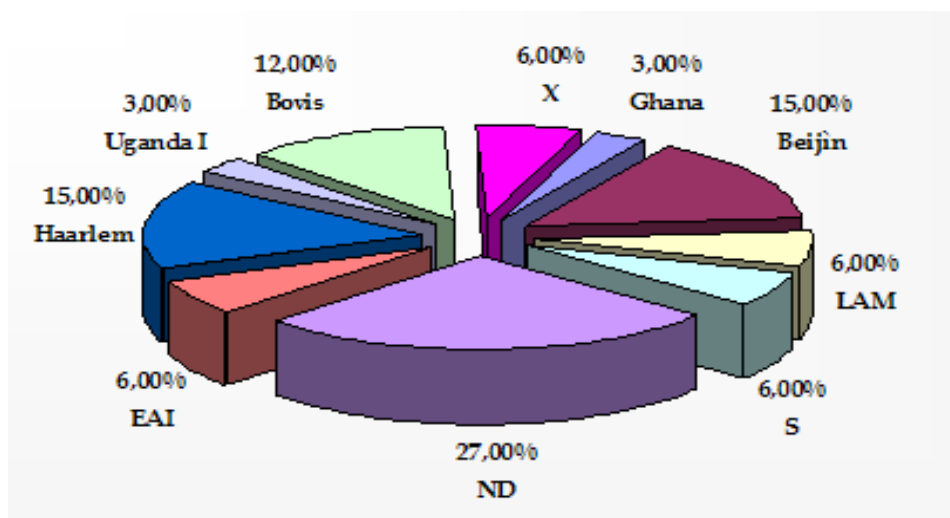


Figura 25. Diversidad genética de los aislados de *M. tuberculosis* de los 32 aislados estudiados. ND: No Determinado, LAM: Mediterránea-Latinoamericana, EAI: Indoesteafrica.

Se realizó una distribución geográfica de los distintos linajes encontrados por Espoligotipificación para llevar a cabo un análisis epidemiológico-molecular de las Entidades Federativas analizadas en este estudio (figura 26).

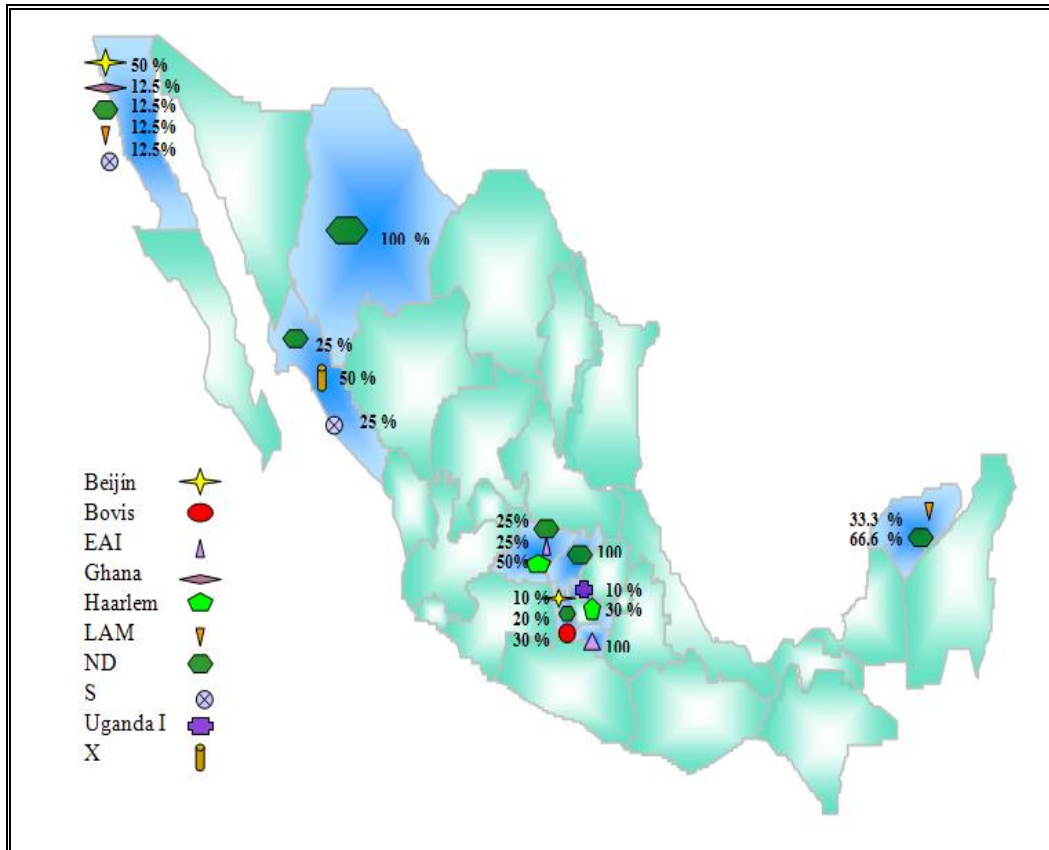


Figura 26. Distribución geográfica y porcentaje de los linajes de aislados de *M. tuberculosis* en las Entidades Federativas analizadas.

Una vez identificados los diversos linajes encontrados en cada uno de los estados que participaron en la encuesta, se procedió a relacionarlos de acuerdo a la presencia de alguna mutación encontrada en el gen *katG* e *inhA* en Isoniazida por las técnicas de PCR, para así poder correlacionar las mutaciones encontradas en algún gen o codón, con algún linaje en específico (tabla 11).

Estado	Código Octal Spoligotyping	Linaje	Mutaciones en Isoniacida
BC 535	77777773760771	Ghana	Gen <i>katG</i> -315
BC 1868	00000000003771	Beijin	Gen <i>katG</i> -315-463
BC 2230	777357607360770	ND	Sin Mutación
BC 481	777347607360660	LAM	Gen <i>katG</i> -315
BC 1942	00000000001771	Beijin	Gen <i>katG</i> -315-463
BC 1078	00000000003771	Beijin	Gen <i>katG</i> -463
BC 2585	77425777760771	S	Gen <i>inhA</i>
BC 1056	00000000003771	Beijin	Gen <i>inhA</i> + Gen <i>katG</i> -463
CHIH 2117	77725777760731	ND	Sin Mutación
GTO 1993	777345770000021	ND	Gen <i>inhA</i>
GTO 521	677747477003671	EAI	Gen <i>katG</i> -315-463
GTO 2357	77737777760671	Haarlem	Gen <i>katG</i> -315
GTO 2718	777747776720671	Haarlem	Gen <i>inhA</i>
MEX 1617	00000000003771	Beijin	Gen <i>katG</i> -463
MEX 1372	77776377720771	ND	Gen <i>inhA</i>
MEX 337	77717777770771	Uganda I	Sin Mutación
MEX 194	70007677760700	Haarlem	Sin Mutación
MEX 1023	77777777760771	Haarlem	Gen <i>katG</i> -463
MEX 897	67677377777600	Bovis	Sin Mutación
MEX 2806	65647373777600	Bovis	Gen <i>katG</i> -463
MEX 1396	77777770003771	Haarlem	Gen <i>inhA</i>
MEX 932	77777777620771	Haarlem	Gen <i>katG</i> -315
MEX 998	26406377777600	Bovis	Gen <i>katG</i> -463
MOR 500	600003776017771	EAI	Gen <i>katG</i> -463
QRO 2016	77717777760771	ND	Sin Mutación
SIN 1091	77777077760731	ND	Gen <i>katG</i> -315
SIN 1902	77735677760771	X	Gen <i>katG</i> -315
SIN 136	77777777760671	S	Gen <i>katG</i> -315
SIN 282	77735777760331	X	Gen <i>katG</i> -315
YUC 1571	776177607760771	LAM	ND
YUC 1983	777367737760661	ND	Gen <i>katG</i> -315
YUC 1984	77777677760771	ND	Gen <i>katG</i> -315

Tabla 11. Descripción de mutaciones asociadas con resistencia a Isoniazida y el linaje encontrado por Espoligotipificación en las 32 Entidades Federativas Estudiadas.

8. DISCUSIÓN

La TB-MDR representa un problema grave de salud Pública en México, en este trabajo se reporta un estudio completo de la distribución de los diversos linajes de *M. tuberculosis* basado en espigotipificación. Los aislados utilizados para este estudio fueron provenientes de 8 Entidades Federativas con distinta incidencia en Tuberculosis de las cuales se consideran de baja incidencia aquellos estados en los que se presentan de 0-300 casos participando 2 estados: Morelos y Querétaro con 1 aislado cada uno, aquellos estados que se consideran de mediana incidencia (301-600 casos) entre los que participaron 4 estados con esta incidencia, Chihuahua, Guanajuato, Estado de México y Yucatán, con 1,4,10 y 3 aislados, respectivamente. Finalmente aquellos estados con alta incidencia en TB son aquellos que presentan de 601-900 casos como es el caso de Baja California y Sinaloa que participaron en este estudio con 8 y 4 aislados respectivamente.

Previamente, se obtuvo el perfil de farmacorresistencia a los medicamentos de primera línea por el método radiométrico BACTEC 460, mediante el cual se observó que las muestras utilizadas en este estudio habían mostrado como mínimo resistencia a los fármacos isoniazida y rifampicina, sin embargo, también presentaron otros patrones de farmacorresistencia frente a los medicamentos antituberculosos de primera línea (SIREZ).

La población de estudio, estuvo integrada por individuos de ambos sexos, sin embargo, se observó una relación de aproximadamente dos hombres por una mujer. Una posible explicación es que los varones a partir de la edad adulta tienen, con mayor frecuencia, factores de riesgo para el desarrollo de la TB una vez infectados (laborales, neumoconiosis, tabaquismo, uso de drogas, infección con VIH, etc.) que las mujeres. Las edades de los pacientes variaron desde los 18 a los 74 años, con una edad promedio de 45 años, este dato nos refiere a que la población se encuentra económicamente activa.

La resiembra de las muestras en la mayoría de las veces fue satisfactoria, ya que se pudo obtener un buen crecimiento bacteriano en los medios Middlebrook utilizados. Para la obtención del material genético, se empleó la técnica de lisozima-proteinasa K, la cual al comprobar la obtención del DNA realizando una electroforesis en geles de agarosa, se observó una banda de tamaño superior a los 1600 bp (North y Yu-Jin Jung, 2004) correspondiente al tamaño de DNA genómico de *M. tuberculosis* (figura 16).

El banco genómico de los aislados clínicos de MTB-MDR sirvió para poder llevar a cabo la genotipificación de aislados de *M. tuberculosis* farmacorresistentes de manera sencilla, oportuna y económica basada en una PCR; además de que al mantenerse bajo congelación a -20 °C, las muestras continuaron viables y pueden ser de gran utilidad para posteriores estudios.

Los aislados clínicos de *M. tuberculosis* que presentaron resistencia a Isoniazida, presentaron mutaciones localizadas en diversos genes, sin embargo, las más comunes se encontraron dispersas dentro del gen *katG*, encargado de codificar para la enzima catalasa-peroxidasa y en el gen *mabA-inhA* que codifica para la proteína acarreadora enoil-acil reductasa. Dentro del gen *katG*, la frecuencia de mutación en el codón 315 fue la más alta, identificada en 41 % de los aislados estudiados por PCR Múltiple, y en un 25 % de los aislados por PCR-RFLP, tal y como lo reportan otras regiones del mundo (Bostanabad y col., 2008). El predominio de esta mutación indica que la mayoría de los aislados estudiados presentan una disminución en la actividad de la catalasa evitando la conversión del pro-fármaco INH a su forma activa, por lo tanto, estos aislados presentan una alta resistencia a INH y pueden tener una mayor virulencia (Dalla-Costa y col. 2009).

La mutación en el codón 463, fue la segunda más frecuente observada dentro del gen *katG* con un 25 %, y a pesar de no estar asociado estrictamente con una resistencia a INH, en este estudio, se identificaron 6 casos (19%) que presentaron al codón 463 como única mutación capaz de conferir resistencia a INH. Asimismo, se encontraron 3 aislados (9%) que presentaron la mutación en el codón 315 como en el codón 463. Las implicaciones de la presencia de esta mutación serán descritas más adelante.

La mutación en el gen *inhA* es la segunda mas comúnmente observada en distintas partes del mundo, reportando frecuencias desde 8 al 24.2% (Hazbón y col 2009). En el presente estudio, se encontró en un 22 % de los aislados estudiados. Este tipo de mutación le confiere a la micobacteria bajos niveles de resistencia a INH (Iglesia y col., 2006).

De los 32 aislados analizados, en solo 6 (19%) no fue posible caracterizar la mutación a través del análisis de los genes estudiados, estos aislados fueron identificados como cepas tipo silvestre (Wild type), sin embargo, se cree que la mutación se encuentre en otra parte dentro del mismo gen *katG* ya que en este gen se han reportado un mayor número de polimorfismos (Hiroki y col. 2010), los cuales podrían ser analizados mediante técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos. La mutación puede encontrarse en los codones ya antes mencionados D419H, M420T, D542H, R632C, H97R, N133T y P232S, que aunque no es muy común encontrarlas, es muy probable que en las muestras que resultaron ser de tipo silvestre (Wild type), tal vez la mutación se encuentre en alguno de estos codones.

Mediante las técnicas de PCR utilizadas en el estudio, fue posible identificar un aislado que presentaba una mutación no descrita por ninguna de las metodologías aquí estudiadas, la mutación de este aislado fue identificada como ND (no determinada), e igual que las cepas Wild type, podría ser analizada mediante técnicas de secuenciación.

Al agrupar las mutaciones por su estado de procedencia, se observó que la frecuencia de distribución para las mutaciones en el gen *katG* solo se concentró en los estados de SIN y MOR; para el caso de las mutaciones en el gen *inhA* no se observó una concentración total en ninguno de los estados estudiados, los estados que presentaron ambas mutaciones se concentraron en BC, GTO, Estado de México y YUC, los estados a los que no se le pudo determinar el tipo de mutación por estas técnicas fueron CHIH y QRO.

Las mutaciones encontradas en este el presentan una distribución desde el sur de México hasta el norte, lo que podría sugerir que estas mutaciones tienen una relación con la diseminación de aislados a través de la migración.

Los estados que reportan una incidencia alta en TB (URL 8), que corresponden a los estados de BC y SIN, presentaron una mayor parte de mutación en el gen *katG* lo que podría indicar que además de tener un alta incidencia de TB podría presentar también aislados con resistencia alta a INH y además virulentos; los estados que presentan una incidencia media en TB, CHIH, GTO, EDOMEX, YUC (URL 8), también presentaron en la mayor parte mutaciones en el gen *katG*, los de baja incidencia QRO y MOR (URL 8), la frecuencia de mutación en el gen *katG* no es tan elevada como en los demás estados; esto nos confirma que la mutación en el gen *katG* es comúnmente encontrada en los aislados MDR.

Mediante la figura 23, se puede observar que la mayor concentración de mutaciones encontradas en el gen *katG* se encuentra en dirección hacia el norte de México, lo que puede indicar que las mutaciones en los aislados farmacorresistentes tienen una relación con el flujo de migración del sur de México hacia Norteamérica.

En México, se han realizado pocos estudios acerca de la resistencia al fármaco INH. Uno de los estudios realizados, muestra que durante el año 1998, la resistencia a INH y RIF era similares a las reportadas para los países desarrollados, sin embargo, en nuestro país a aumentado el número de casos de tuberculosis MDR con mutaciones encontradas en INH, a partir del último estudio realizado por la OMS (Sifuentes-Osorio y col 1995). En el año 2010, un estudio más reciente realizado en México, muestra que la mutación en el codón 315 esta siendo más frecuentemente encontrada en México y aunado a esto, la prevalencia se encuentra en personas infectadas con VIH (Merchand y col. 2010).

La técnica de *spoligotyping*, es utilizada en el mundo como herramienta en investigaciones epidemiológicas y desarrollo de programas de prevención. Una importante ventaja de esta metodología, es que permite analizar, de manera simultánea, un número importante de cepas. Una segunda ventaja es la disponibilidad de las bases de datos internacionales, VNTR-PLUS, la cual contiene la colección más completa y actualizada de los espoligotipos de *M. tuberculosis* encontrados en distintos países.

El análisis comparativo de los espoligotipos, muestra que de los 29 *clusters* identificados, 5 pertenecen al perfil que caracteriza a las cepas de la familia Beijín, 4 pertenecen a la familia Bovis, de los cuales 2 de ellos presentan el mismo espoligotipos, 2 pertenecen a la familia Indoesteafriana (EAI), 5 pertenecen a la familia Haarlem, 2 a la familia Latinoamericana mediterránea (LAM), 2 pertenecen a la familia X, 2 a la familia S y un *clusters* pertenece a la familia Ghana y Uganda; y fueron encontrados 9 *clusters* que la base de datos no pudo caracterizar dentro de alguna familia.

Una de las cepas de mayor distribución mundial es la perteneciente a la familia Beijín, asociada a resistencias a fármacos antituberculosos e importantes brotes de tuberculosis (Mancilla y col. 2006), y en efecto, la variante genética de *M. tuberculosis* encontrada con mayor frecuencia es este trabajo (15%) correspondió al espoligo perteneciente de la familia Beijín y Haarlem.

La cepa Beijín, es muy común encontrarla en muchas partes del mundo, sin embargo, es muy raramente reportada en México o en otras regiones de Latinoamérica. En este estudio, se encontraron 5 espoligotipos de la cepa Beijín, de los cuales 4 se encuentran en el estado de Baja California, y uno en el Estado de México. Un estudio realizado en ciudades pertenecientes al estado de Houston, una de ellas Texas, mostró una alta incidencia de aislados de Beijín (25% del total de aislados estudiados), y en el año 2009, en el estado de Monterrey se encontró que uno de los espoligotipos más encontrados en su estudio pertenecía a la familia Beijín (25%) (Molina y col. 2010); esto nos puede indicar que una pequeña población de Asiáticos está erradicando en el Norte del país, en los estados fronterizos con Estados Unidos y que, a su vez, los estados fronterizos de EUA con México también se encuentran una pequeña, pero importante población de asiáticos, portadores de la cepa Beijín diseminándola por el resto del país.

La cepa de Beijín encontrada en EDOMEX puede ser debido igualmente al flujo de migración de sur a norte, ya que como se observa en la figura 26, el linaje se concentra en el norte del país.

Los espoligotipos encontrados pertenecientes a la familia Haarlem, solo se concentraron en el centro del país, en los estados de GTO y EDOMEX, estos espoligotipos se han encontrado en otros países incluidos Brasil, África y Polonia, lo que indica que este linaje probablemente se encuentre circulando alrededor del mundo (Merchand y col. 2010).

El 9% de los *clusters* encontrados pertenecen a la familia de *M. bovis*, estos espoligotipos se concentraron principalmente en el Estado de México. En el plano mundial, 3.1% de los casos de tuberculosis en humanos son causados por *M. bovis*. En el año 2006 se detectaron 36 casos de zoonosis en pacientes de EUA, debido al consumo de queso fresco proveniente de México (Mancilla y col. 2006). Un estudio realizado en México durante el 2010, muestra que el 13.4% de sus aislados, fueron identificados como *M. bovis* (Merchand y col. 2010).

La prevalencia de tuberculosis bovina con al menos un animal reaccionante, alcanza grandes porcentajes de infección. Cabe mencionar que *M. bovis* es altamente virulenta. El hecho de encontrar *M. bovis* solo en el estado de México, nos puede indicar que hay un problema de control zoonótico en este estado.

Los linajes encontrados LAM (Latinoamericana-mediterránea), EAI (Indoesteaficana) S y X, se obtuvieron en un 6 % de los *clusters* encontrados. La familia LAM se encontró distribuida en los estados de BC y YUC, este linaje, se encuentra más comúnmente en el continente Americano y solo una 3ª parte de Europa predomina este espoligotipo.

El linaje de la familia X y S se concentro en el estado de SIN, estos linajes predominan más en el norte de América, particularmente en Texas y el norte de México, de ahí que solo se encuentra en el estado de Sinaloa que se encuentra más al norte de México.

El linaje S se encuentra generalmente en el Norte de América, sin embargo, también se ha encontrado en Suiza y España (Mancilla y col. 2006).

Para el linaje EAI, este se concentro en los estados de MOR y QRO, este linaje se encuentra más comúnmente en países de Asia, tal como lo es Indonesia o Filipinas, donde se encuentran altos porcentajes de aislados de *M. tuberculosis*. Este linaje se piensa llego a México durante los años de 1565 a 1821 durante los cuales se transportaban galones de especies desde Filipinas a Acapulco, en donde posiblemente durante este periodo algunos casos de tuberculosis fueron importados de Filipinas a México (Molina y col. 2010).

Los aislados con linajes de Uganda, Ghana, se encontraron en un 3% de los *clusters* obtenidos, concentrándose en el Estado de México (Uganda) y BC (Ghana). Los linajes de las familia Uganda y Ghana, son muy raros encontrarlos en el continente Americano, y a pesar de haberse encontrado en menor cantidad (1 aislado), pude deberse que se encuentren en México, al flujo de migración del continente Africano a EUA, pasando por nuestro país.

De los *clusters* encontrados 9 (27%) no fue posible identificar el linaje de la familia a la cual pertenecen, esto es debido a que la caracterización genética solo por espoligotipificación no es suficiente para identificarlos, y es necesario su identificación en conjunto con otras técnicas como lo son MIRU-VNTR y RFLP.

Algunos linajes encontrados en el mundo, están asociados con presentar resistencia a los fármacos antituberculosos, además de poseer una elevada virulencia. La mutación presente en el codón 463 en el gen *katG* es un polimorfismo que generalmente se encuentra en linajes de *Mycobacterium beijing*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti.*, (Van Doorn y col. 2001). En este estudio, combinando los linajes obtenidos por espoligotipificación, con las mutaciones presentes en INH, muestran que se encontraron 10 mutaciones dentro del codón 463, de las cuales 5 pertenecen al linaje de la familia Beijín y de estas 4 se encuentran ene le estado de BC y una en el estado de México.

Las demás mutaciones en el codón 463 pertenecen a la familia del linaje de Bovis (2 aislados) encontrados todos en el estado de México, a la familia EAI (2 aislado) en GTO y MOR, y la familia Haarlem (1 aislado) en el estado de México. Como se puede observar en la tabla 11, los linajes de la familia Bovis y Beijín, son la que se presentaron con un mayor porcentaje sobre aquellos aislados que presentaron la mutación en el codón 463, tal como se esperaba por lo establecido por Van Doorn y col.

La mutación presente en el codón 315 del gen *katG*, se encontró con mayor frecuencia en linajes de la familia Haarlem y X con 2 aislados cada uno y Ghana y LAM con un aislado. También se encontraron 2 aislados con mutación en este codón que por espoligotipificación no se pudo obtener su linaje.

Las mutaciones dentro del gen *inhA* se encontraron principalmente dentro de los linajes de la Familia S y con un mayor porcentaje, Haarlem. Se encontraron con 2 aislados con esta mutación pero con linaje no identificado por esta técnica.

Para los aislados a los que no se les pudo identificar el tipo de mutación por las técnicas de PCR empleadas en este estudio, se encontraron perteneciendo a linajes de las familias Uganda, Haarlem y Bovis, cada uno con un aislado encontrado. Sin embargo, a la mayoría de los aislados a los que no se les pudo determinar la mutación, tampoco se les pudo determinar el linaje al cual pertenecen. Para este tipo de muestras es preciso el uso de otro tipo de técnicas, para poder determinar su mutación y su familia a la cual pertenecen, como lo es la secuenciación de ácidos nucleicos.

La tabla 11, muestra que la familia Haarlem presenta mutaciones en ambos genes (*katG* e *inhA*) lo cual sugiere que este tipo de linaje puede presentar niveles altos como bajos de resistencia a INH. Por otro lado, la familia X presento mutación solo dentro del gen *katG-315* lo que nos puede indicar que este linaje puede presentar altos niveles de resistencia a INH ya que generalmente este tipo de mutación presenta un alto nivel de resistencia a INH. Para los linajes encontrados pertenecientes a la familia Ghana, S y Uganda, a pesar de tener solo un tipo de mutación encontrada; en el codón 315, en el gen *inhA*, y una mutación no identificada respectivamente; no se puede sugerir que presenten un alto o bajo nivel de resistencia a INH debido a que estos linajes

se encontraron en solo un aislado y no es posible deducir algo con tan pocos resultados, sería preciso disponer de más aislados que pertenezcan a este tipo de familia para poder deducir que tipo de mutación que generalmente presentan para el fármaco INH y no hay estudios reportados acerca de estos linajes y el tipo de resistencia que generan en INH.

Los linajes probablemente más virulentos y raros encontrarlos en el país, obtenidos en el estudio, pertenecen a la familia Beijín, EAI y no tan raro su presencia en el país pero si su elevada virulencia, *M. bovis*. De esos el numero de aislados con esta familia y que se concentren la mayoría en un solo estado, pertenecen al linaje Beijín, y esto es alarmante debido a que los resultados pueden indicar que hay un problema en el norte del país con el flujo de migración hacia EUA y muy probablemente existan poblaciones asiáticas que se encuentren diseminando la enfermedad.

Así mismo, también es alarmante el número de aislados encontrados de *M. bovis*, concentrados en el mismo estado y esto se agrava con el advenimiento de VIH, pues la tuberculosis bovina representa un riesgo adicional. La tuberculosis pulmonar o extrapulmonar causada por *M. bovis* sobreestimada debido a que los factores resultados de la infección, son indistinguibles a los causados por *M. tuberculosis*.

Los demás linajes encontrados, aunque igualmente de importantes, su presencia en el país, así como en el resto del mundo, es común encontrarlos ya que probablemente se encuentren circulando alrededor del mundo.

9. CONCLUSIONES

- ✦ La mayoría de las mutaciones identificadas en este estudio se presentaron en el gen *katG*, y dentro de los linajes más virulentos de *M. tuberculosis* (familias Beijín y Haarlem) concentrándose mayoritariamente en dirección al norte de México, esto tiene una relación con el flujo de migración, así como con poblaciones de individuos que habitan dentro del país o en las fronteras que al estar en contacto con otros factores de riesgo para el desarrollo de la TB (laborales, neumoconiosis, tabaquismo, uso de drogas, infección con VIH, etc.) una vez infectados, podrían ser diseminadores de la enfermedad en el resto del país.

- ✦ La siguiente mutación reportada en frecuencia fue para el gen *inhA*, mutación que se asocia a bajos niveles de resistencia a INH; se encontró también mutación no reportada previamente que requiere ser secuenciada para su identificación.

- ✦ Las mutaciones en el gen *katG* se concentraron principalmente en los estados con alta incidencia de TB. Las mutaciones en el gen *inhA* se encontraron en mayor proporción en los estados con mediana y baja incidencia en TB.

- ✦ El Estado de México, considerado de mediana incidencia, se observó la circulación de la familia *Micobacterium bovis*, probablemente implicada en transmisión zoonótica, con todas las mutaciones en el codón *katG* 463 lo que le confiere altos niveles de resistencia a INH.

10. BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, S., Mokaddas, E., Abalb, A.T., Araj, G.F., Faresd, E., Mustafa, A.S. 2001. Genetic Polymorphism at Codon 463 in the katG Gene in Isoniazid-Sensitive and Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the Middle East. **10**:129–134.

Alcaide, F. 2009. ¿Qué aporta la biología molecular al diagnóstico de la tuberculosis? **(9)**:493– 495.

Alcaide, F.F., Esteban, M.J., González, M.J., Palacios, G.J. 2005. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas. **9**:97.

Almeida Da Silva PE, Palomino JC. 2011. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother.* **66**:1417-30.

Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Herránz M, Sanchez-Benitez M, Barroso P, INDAL-TB group, Bouza E, Garcia de Viedma D. 2008. Evaluation of the new advanced15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *MBC. Microbiol.* **8**:1186-1196.

Araya P, Velasco M, Tognarelli J, Arias F, Leiva T, Scapatticio A, Alviz P, Fernández J. 2011. Detección de mutaciones asociadas a cepas multidrogo resistente de *Mycobacterium tuberculosis* en Chile. **139**: 467-473.

Baldeviano C, Quispe TN, Bonilla AC, Gastiaburu D, Pro CJ, Llanos-Zavalaga FL. 2003. Perfiles genéticos (RFLP-IS6110) y resistencia a drogas en aislamientos de *M. tuberculosis* de pacientes internados en un hospital referencial del callao, Perú. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* **20**:72-77.

Barrera Lucia. 2008. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Cultivo. Edit. OPS. pp.11-24.

Barry, E.C., and Cheung, S.M. 2009. New Tactics Against Tuberculosis. Scientific American, Inc.

Bostanabad, S.Z., Titov, L.P., Bahrmand, A. y Nojourni, S.A. 2008. Detection of mutation in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from tuberculosis patients in Belagur. *Indian Journal of Medical Microbiology*. **26**(2).143147.

Cade E.C, Dlouhy C.A, Medzihradzky F.K, Salas –Castillo S.P, Ghiladi R.A.2010. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* katG: Catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. **19**:458—474.

Caminero, J.A., 2005. Management of multidrug-resistant tuberculosis and patients in retreatment. *Eur Respir Journal*. **25**:928-936.

Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, García I, Cabrera P, Lafoz C, Samper S, Takiff H, Alfonso O, Pavón JM, Torres JM, Van-Soolingen D, Enarson DA, Martin C. 2001. Epidemiological Evidence of the Spread of a *Mycobacterium tuberculosis* Strain of the Beijing Genotype on Gran Canaria Island. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. **164**:1165-1170.

Chen, L., Gan, X., Li, N., Wang, J., Li, K., and Zhang, H. 2010. rpoB gene mutation profile in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guizhou, one of the highest incidence rate regions in China. 1299-1301.

Dalla Costa, E.R., Ribeiro, O.R., Silva, S.N.M., Arnold, S.L., Rostirolla, C.D., Cafrune, I.P., Espinoza, C.R., Palaci, M., Telles, A.M., Ritacco, V., Suffys, N.P., Lopes, L.M., Campelo, C.L., Miranda, S.S., Kremer, K., Almeida da Silva, P.E., Fonseca, L.S., Kritski, A.L., and Rossetti, L.R.M. 2009. Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. **9**(39):1-11.

Davies PD, 2000. Tuberculosis: The global epidemic. *J. Indian. Med. Assoc.* **98**:100-102

Driscoll, R.J. 2009. Spoligotyping for Molecular Epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **551**: 117-128.

Eilers HCP, van-Soolingen D, Lan TNN, Warren MR, and Borgdorff WM. 2004. Transposition Rates of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2461–2464.

Gori, A., y cols. 2005. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Infec. Dis.* **11**:1242-1248.

Hart, C.A., Beeching, N.J., and Duerden, B.I. 1996. Tuberculosis into the next century. *Rev. Med. Microbiol.* **44**:1-34.

Hazbón, H.M., Brimacombe M., Bobadilla, M., Cavatore, M., Guerrero I.M., Varma-Basil, M., Billman-Jacobe, H., Lavender, C., Fyfe, J., García-García L., León, C.L., Bose, B., Chaves, F., Murray M., Eisenach D.K., Sifuentes-Osornio J., Cave, M.D., Ponce de León, A., y Alland, D. 2006. Population Genetics of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **50**:2640-2649.

Hernández-Garduño, E., Cook, V., Cook, V., Kunimoto, D., Elwood, R.D., Black, W.A., and Fitzgerald, J.M. 2004. Transmission of tuberculosis from smear negative patients: a molecular epidemiology study. **59**:286-290.

Herrera-Leon ., Molina T., Sáez-Nieto., Jiménez M . S. 2005. New Multipléx PCR for Rapid Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **49**(1):144-147

Hines, N., Payeur, J.B., Hoffman, L.J. 2006. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. *Vet Diagn Invest.* **18**: 243-50.

Hiroki, A., Kondo, Y., Suetake, T., Toyota, E., Kato, S., Mori, T., and Kirikae, T. 2010. Identification of katG Mutations Associated with High-Level Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **54**:1793-1799.

Iglesia, A.I., y Morbidoni, H.R., 2006. Mecanismos de acción de resistencia a rifampicina e isoniazida en *Mycobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Rev. Arg. Microb.* **38**:97-109.

Kamerbeek, J., y cols. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **35**:907-914.

Kapur, V., Li, L.L., Iordanescu, S., Hamrick, M.R., Wanger, A., Kreiswirth, B.N., et al. 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain from New York City and Texas. *J Clin Microbiol.* **32**:1095-8.

Koneman, W.E., Winn, C.W., Allen, D.S., Janda, M.W., Procop, W.G. 2008. *Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color.* **6**:1696.

Ledermann, D.W. 2003. La tuberculosis antes del descubrimiento de Koch. **13** (4):46-47.

Ledermann, D.W. 2003. La tuberculosis después del descubrimiento de Koch. **13**(4):48-50

Luna, A. M. 1998. Determinación de la Frecuencia de Mutaciones en los genes katG y/o rpoB de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* resistentes a Isoniazida y/o Rifampicina del Noroeste de México. Grado de Maestría en Ciencias. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Mancilla M.E., Martínez H. A., Palavecino B. C., León R. G., Zárraga O. A. 2006. Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la Xª Región de Chile. *Microbiología Clínica*. **23**(3):220-225.

Manterola, M.M. 2004. Nuevas Aportaciones al Diagnóstico de las Enfermedades Causadas por las micobacterias. Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina. Departamento de Genética y Microbiología. p: 777.

Mendoza, M.W., Medina, T.A., Peña, B.B. 2007. Tuberculosis Farmacorresistente: un problema emergente en México.

Merchand J.A, Alvarez, L.R., Cerna C.J., Gutierrez R.S., Repetto H.A., Pando H.R. 2010. First insights into the genetic Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-INFECTED Mexican patients and mutations Rausing multidrug resistance. *BMC Microbiology*. **10**:82:1471-2180.

Millet, J.P., Orcau, A., Rius, C., Casals, M., Garcia de Olalla, P., Moreno, A., Nelson, L.P., and Cayla, A.P. 2011. Predictors of Death among Patients Who Completed Tuberculosis Treatment: A Population-Based Cohort Study. **6**: 25315.

Mokrousov, I., Otten, T., Vyshnevskiy, B., and Narvskaya, O. 2003. Allele-Specific rpoB PCR Assays for Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum Smears. **47**: 2231–2235.

Molina T. A., Torres M. E., Ocampo C. J., Kremer. K, Nalin R., Welsh O., Cabrera V. L. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes in Monterrey, México. *Journal of Clinical Microbiology*.**48**(3):448-455.

Nicod, P.L. 2007. Immunology of tuberculosis. *Swiss Med WKLY*. **137**: 357-362.

North, R.J., and Jung, Yu-Jin. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22:599-623.

O. Viegas, S., Machado, A., Groenheit, R., Ghebremichael, S., Pennhag, A., Gudos, P.S., Cunas, Z., Miottos, A., Hill, V., Marrufo, T., Cirillos, M.D., Rastogi, N., Källenius, G., and Koivula, T. 2010. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mozambique. *BMC Microbiology*. **10**:195.

Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Hass W, Rüsç-Gerdes S, Loch C, Niemann S and Suppy P. 2007. Assesment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing system combined with Spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **45**:691-697.

Palomino, J. Leão, C. y Ritacco, V. 2007. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. Institute of tropical medicine Antwerp. Primera Edición.

Paluch-Oles, J., Kozioł-Montewka, M., and Magrys, A. 2009. Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Eastern Poland. **32**:147-152.

Parsons M.L, Driscoll R.J, Taber W. H, Salfinger M. 1997. Drug Resistance in Tuberculosis. **11**:4.

Pere, Coll. 2009. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Servicio de Microbiología. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona. España. **(6)**:299-308.

Rodríguez, C.G. 1882. Género *Mycobacterium*. 1-10.

Salazar Quirós A, Sáenz Campos D. 2005. Tratamiento de Tuberculosis en el Primer y Segundo Nivel de Atención. Departamento de Farmacoepidemiología, Caja Costarricense de Seguro Social. Costa Rica. 14-17.

Sifuentes-Osorio, J., Ponce de León, A.L. y Camacho, E. 1995. Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes mexicanos. *Rev inv Clin.* **47**(4):273-281.

Smith. I. ¿Qué es el DOTS? **275**:280

Stewart, R.G., Robertson, D.B., and Young B.D. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. **1**:97-105.

Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C and van-Soolingen D. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**:4498-4510.

Uhl J. R., Sandhu G.S., Cockerill F. R. 1996. "PCR Protocols for Emerging Infections Diseases. A supplement to Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications". *Library or Congress.* EUA.

Van Doorn, H. R., Kuijper E. J., Ende. V.D., Welten, A.G., Soolingen, D.V., Haas, P. E. W., and Dankert, J. 2001. The Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and the Arg3Leu Mutation at Codon 463 of katG Are Not Associated. **39**: 1591–1594.

Van Soolingen, D., Hermans, W.M., De Haas, E.W., Soll, D.R., and Van Embden, D.A. 1991. Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. **29**(11):2578.

Watterson, S.A., Drobniewski, F.A 2000. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *J. Clin. Pathol.* **53**:727-732.

URLs.

URL 1. Practica Médica Efectiva. Tuberculosis Pulmonar.

<http://bvs.insp.mx> Página consultada en noviembre de 2011.

URL 2. SPOLIGOTYPING. A PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria.

www.moleculartb.org. Pagina consultada en noviembre de 2011.

URL 3. Guía para la atención de pacientes con tuberculosis multifarmacorresistente. SSA/CENAVECE/PNTB.

www.cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/tuberculosis.html. Página consultada en octubre de 2011.

URL 4. Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México. Secretaría de Salud.

www.cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/tuberculosis.html. Página consultada en noviembre de 2011.

URL 5. The Stop TB Strategy. Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals.

WHO/HTM/TB/368 www.stoptb.org/ Página consultada en octubre de 2011.

URL 6. Modificación a la Norma Oficial Mexicana para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud. México: Secretaría de Salud NOM-006-SSA2-1993.

www.sesa-dgo.gob.mx/006SSA23.doc. Página consultada en octubre de 2011.

URL 7. Estrategias de Tratamiento Contra la Tuberculosis.

www.cenavece.gob.mx/tuberculosis/.../farmacorresistencia.asp. Página consultada en octubre de 2011.

URL 8. Boletín Caminando a la Excelencia Nacional.

www.cenavece.gov.mx/caminando2008. Página consultada en diciembre de 2011.