



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IMPLEMENTACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE
GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR Y
FARMACORRESISTENCIA PARA LA
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL COMPLEJO *M.*
TUBERCULOSIS, AISLADAS DE MUESTRAS DE
LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR), EN HOSPITAL
GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTAN

**INGRID IRASEMA IDALID DE LEÓN ABUNDIZ.
CORAL VENEGAS GUERRERO.**



MÉXICO, D.F. 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Misael González Ibarra.

VOCAL: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova.

SECRETARIO: Profesor: Heleodora González González.

1er. SUPLENTE: Profesor: Luis Manuel Perea Mejía.

2° SUPLENTE: Profesor: Javier Fernández Torres.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Neumología, Hospital General de México, O.D. “Dr. Eduardo Liceaga”.

ASESOR DEL TEMA: M. en C. Heleodora González González. _____

SUPERVISOR TÉCNICO: Dr. José Armando Martínez Guarneros. _____

SUSTENTANTES:

Ingrid Irasema Idalid De León Abundiz. _____

Coral Venegas Guerrero. _____

ÍNDICE GENERAL.

Índice

Índice	I
ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE GRÁFICAS	V
RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	1
1. Generalidades de las Micobacterias	1
1.1 Características de la pared celular de las micobacterias	2
2. Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
3. Tuberculosis (TB)	5
3.1. Binomio VIH/SIDA- Tuberculosis	9
3.2. Tuberculosis pulmonar	10
3.3. Tuberculosis extrapulmonar	12
3.4. Diagnóstico	12
4. Tuberculosis meníngea	14
4.1. Manifestaciones clínicas	16
4.2. Epidemiología de la tuberculosis meníngea en México	17
4.3. Tratamiento	17
5. Fármacos empleados en el tratamiento de tuberculosis	18
5.1. Fármacos de primera línea.	19
5.1.1. Mecanismos de acción y resistencia	20
5.1.1.1. Isoniazida	23
5.1.1.2. Rifampicina	23
5.1.1.3. Etambutol	24
5.1.1.4. Pirazidamina	24
5.1.1.5. Estreptomina	25
6. Métodos de identificación para <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
6.1. Métodos convencionales	27
6.1.1. Baciloscopia	27
6.1.1.1. Tinción de Ziehl - Neelsen	28
6.1.2. Cultivo	29
6.1.2.1. Medios de cultivo	30
6.1.2.1.1. Medios de cultivo líquidos	30
6.1.2.1.2. Medios de cultivo sólidos	31
6.1.3. Actividad de Adenosina Desaminasa (ADA)	31
6.2. Métodos moleculares	33
6.2.1. IS 6110	33
6.2.2. VNTR - MIRU	34
6.2.3. Espoligotipificación	35
7. Métodos para la detección de farmacorresistencia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36
7.1. Métodos colorimétricos	36
7.1.1. Alamar Azul	36
7.2. Métodos moleculares	37

7.2.1. PCR-Múltiple: katG, mabA-inhA	37
7.2.2. PCR-ARMS	37
JUSTIFICACIÓN	39
HIPÓTESIS	40
OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	42
1. Criterios de Inclusión	42
2. Criterios de Exclusión	42
3. Extracción de DNA	44
4. Caracterización mediante la técnica de VNTR – MIRU	44
5. Caracterización mediante la técnica de Espoligotipificación	45
6. Caracterización de la resistencia a Isoniazida mediante la técnica de PCR – Múltiple.	47
7. Caracterización de la resistencia a Rifampicina mediante la técnica de PCR-ARMS	47
8. Caracterización de la resistencia a fármacos de primera línea mediante la técnica de microensayo colorimétrico de Alamar Azul.	48
RESULTADOS	51
1. Genotipificación de las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	53
1.1. Caracterización mediante la técnica de VNTR – MIRU	53
1.2. Caracterización mediante la técnica de Espoligotipificación	58
2. Identificación de mutaciones relacionadas a la resistencia a Isoniazida y Rifampicina	59
2.1. Caracterización de la resistencia a Isoniazida mediante la técnica de PCR-Múltiple	59
2.2. Caracterización de la resistencia a Rifampicina mediante la técnica de PCR-ARMS	61
3. Caracterización de la resistencia a fármacos de primera línea mediante la técnica de microensayo colorimétrico de Alamar Azul	63
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	73
PERSPECTIVAS	74
REFERENCIAS	75
URLs (Uniform Resource Locators)	83
Apéndice I. MIRU	84
Apéndice II. Alamar Azul	89

ABREVIATURAS

AA	Alamar Azul
ADA	Adenosina desaminasa
ARMS	Del Inglés: Amplification Refractory Mutation System
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
BCG	Bacilo Calmette - Guérin
C	Citosina
CMT	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA	Del Inglés: Deoxyribonucleic acid
DR	Del Inglés: Direct repeats
E	Etambutol
FC	Factor cordón
G	Guanosina
H	Isoniazida
IR	Del Inglés: Indirect repeats
IS	Del Inglés: Insertion sequence
LAM	Lipoarabinomamano
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LJ	Löwenstein-Jensen
MABA	Del Inglés: Microplate – based Alamar Blue Assay
MDR	Multidrogorresistentes (I-R)
MGIT	Del inglés: Mycobacteria Growth Indicator Tube
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MTb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADH	Del Inglés: Nicotinamide adenine dinucleotide
OADC	Ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PANTA	Polimixina B, Anfotericina B, Ácido nalidíxico, Trimetoprim, Azlocilina
PAO	Del Inglés: Pyrazinoic acid
PAS	Del Inglés: Para - aminosalicylicacid
PCR	Del Inglés: Polymerase Chain Reaction
PG	Peptidoglicano
PPD	Del Inglés: Purified Protein Derivate
R	Rifampicina
RES	Resazurina
RNA	Del Inglés: Ribonucleic acid
S	Estreptomina
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SINAVE	Sistema de Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SNC	Sistema Nervioso Central
TAES	Tratamiento Primario Acortado Estrictamente Supervisado
TB	Tuberculosis
TBM	Tuberculosis meníngea
UICTER	Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VNTR-MIRU	Del Inglés: Variable Numbers of Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
XDR	Del Inglés: Extensively drug-resistant
Z	Pirazinamida

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 . Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> .	3
Figura 2 . Estructura molecular del factor cordón.	3
Figura 3 . Progresión de la tuberculosis.	11
Figura 4 . Radiografías comparativas de tórax.	13
Figura 5 . Prueba de la tuberculina.	13
Figura 6 . Escala de Glasgow.	16
Figura 7 . Mecanismos de acción de fármacos aprobados y experimentales para la quimioterapia de infecciones por micobacterias.	20
Figura 8 . Mecanismos de resistencia de las micobacterias de diferentes fármacos empleados en la actualidad para el tratamiento de la tuberculosis.	22
Figura 9 . Extendido teñida mediante la técnica de Ziehl-Neelsen.	28
Figura 10 . Sistema BACTEC MGIT.	30
Figura 11 . Medio de cultivo Löwenstein-Jensen.	31
Figura 12 . La función biológica del ADA.	32
Figura 13 . Reacción de la determinación de Adenosina desaminasa (ADA).	32
Figura 14 . Posición de los 41 MIRU en el cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> .	34
Figura 15 . Estructuras de las formas oxidada, semireducida y reducida de la resazurina	36
Figura 16 . Principales mutaciones para detectar resistencia a Isoniazida.	37
Figura 17 . Esquema general de trabajo.	43
Figura 18 . Diseño de microplaca de 96 pozos para la técnica de Alamar Azul.	50
Figura 19 . Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci de la cepa CI40.	53
Figura 20 . Electroferograma de VNTR-MIRU I.	54
Figura 21 . Electroferograma de VNTR-MIRU II.	54
Figura 22 . Obtención código MIRU.	54
Figura 23 . Polimorfismo de los VNTR- MIRU de las cepas del CMT.	56
Figura 24 . Análisis filogenético de los aislados de <i>M. tuberculosis</i> .	57
Figura 25 . Placa de espoligotipos cepas CI01-CI40.	58
Figura 26 . Comparación de los espoligotipos de las cepas <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> .	58
Figura 27 . Diversidad de linaje de aislados CMT.	59
Figura 28 . Electroferograma de la PCR-Múltiple.	60
Figura 29 . Electroferograma de PCR-ARMS I.	62
Figura 30 . Electroferograma de PCR-ARMS II.	62
Figura 31 . Interpretación de los resultados del microensayo Alamar Azul.	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 . Complejo <i>M. tuberculosis</i> .	4
Tabla 2 . Sistema de clasificación de la tuberculosis, según la Sociedad Americana del Tórax.	5
Tabla 3 . Tratamiento Primario Acortado Estrictamente Supervisado (TAES).	17
Tabla 4 . Acciones de los agentes antituberculosos de primera línea.	19
Tabla 5 . Mutantes resistentes según población bacilar.	22
Tabla 6 . Tipo de lesión carga bacilar y resistencia.	23
Tabla 7 . Medicamentos antibacterianos de primera línea y genes asociados a TB - MDR.	26
Tabla 8 . Lectura de Baciloscopias.	27
Tabla 9 . Escala para el informe de resultados de Baciloscopia.	29
Tabla 10 . Secuencia de los iniciadores específicos y polimorfismo de los MIRU de <i>M. tuberculosis</i> .	35
Tabla 11 . Asignación de código numérico de acuerdo al número de copias encontradas en cada locus de <i>M. tuberculosis</i> .	45
Tabla 12 . Iniciadores para Espoligotipificación.	46
Tabla 13 . Iniciadores utilizados para detectar resistencia a Isoniazida por medio de PCR-Múltiple.	47
Tabla 14 . Iniciadores para detectar resistencia a Rifampicina.	48
Tabla 15 . Concentraciones de fármacos empleados ($\mu\text{g}/\text{mL}$).	49
Tabla 16 . Datos generales de los pacientes de los cuales se aislaron las cepas de <i>M. tuberculosis</i> .	52
Tabla 17 . Datos epidemiológicos de pacientes fallecidos.	53
Tabla 18 . VNTR-MIRU de 12 loci de los aislados de <i>M. tuberculosis</i> y patrón de susceptibilidad acorde a Alamar Azul.	55
Tabla 19 . Detección de mutaciones para la resistencia a Isoniazida en cepas de <i>M. tuberculosis</i> MDR.	60
Tabla 20 . Detección de mutaciones para la resistencia a Rifampicina de cepas de <i>M. tuberculosis</i> MDR.	61
Tabla 21 . Resultados del microensayo Alamar Azul.	64
Tabla 22 . Patrón de resistencia de aislados de <i>M. tuberculosis</i> obtenidos por el método de Alamar Azul.	65
Tabla 23 . Tabla general de resultados genotípicos y fenotípicos.	66
Tabla 24 . Tabla General de Resultados y datos epidemiológicos.	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 . Poblaciones con mayor susceptibilidad a la tuberculosis.	6
Cuadro 2 . Síntomas TB pulmonar.	11
Cuadro 3 . Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades por micobacterias.	14
Cuadro 4 . Poblaciones Bacilares.	19

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 . Distribución y tendencia de los casos nuevos de tuberculosis por año 2000 – 2010.	8
Gráfica 2 . Distribución y tendencia de los casos nuevos de tuberculosis entre personas de diferente sexo, en el periodo de 2000 – 2010.	9
Gráfica 3 . Distribución de casos nuevos de tuberculosis por grupos de edad, 2000 – 2010.	9
Gráfica 4 . Distribución de aislados de CMT de pacientes infectados con VIH.	51
Gráfica 5 . Distribución de aislados de CMT, por grupos de edad de los pacientes.	52
Gráfica 6 . Distribución de aislados de CMT por género de los pacientes.	52
Gráfica 7 . Distribución de aislados de CMT por resistencia obtenidos por el método Alamar Azul.	65

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa prevenible y curable si se detecta a tiempo, es causada por el bacilo *M. tuberculosis*, y es considerada una de las enfermedades reemergentes más importantes en el mundo, agravada por la epidemia de VIH y por el incremento de la farmacorresistencia. La OMS en 2012 estimó 8,7 millones de casos nuevos, y 1.4 millones fallecieron por esta enfermedad. *M. tuberculosis* puede diseminarse a cualquier parte del organismo, puede afectar a cualquier órgano o tejido, aunque la localización más frecuente es la pulmonar. La tuberculosis meníngea (TBM) es una de las formas más severas de la enfermedad; causa la muerte o un déficit neurológico severo en más de la mitad de los afectados a pesar de la terapia antituberculosa. El diagnóstico de TBM es difícil debido a la baja cantidad de micobacterias en el líquido cefalorraquídeo (LCR). El desarrollo de las técnicas moleculares incrementa la oportunidad del resultado en menor tiempo, favoreciendo la implementación de tratamientos adecuados de manera oportuna. El objetivo principal de este trabajo es implementar en el Laboratorio de Neumología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" técnicas moleculares de identificación y caracterización de especies que conforman al Complejo *M. tuberculosis* (CMT), con la finalidad de prevenir brotes infecciosos y detectar cepas tanto virulentas como multifarmacorresistentes (MDR). Para llevar a cabo el objetivo se resembraron los aislados de muestras clínicas de LCR en distintos medios. La caracterización molecular de *M. tuberculosis* se realizó mediante: VNTR-MIRU y Espoligotipificación; las técnicas empleadas para la identificación de resistencia molecular a Isoniazida (H) y a Rifampicina (R) fueron PCR-Múltiple y PCR-ARMS respectivamente, así como la técnica de Alamar Azul, para la identificación de la resistencia fenotípica a fármacos de primera línea. Las técnicas de VNTR-MIRU y Espoligotipificación se utilizaron para identificar el genotipo de cada cepa y se observó que existe mayor polimorfismo genético en los MIRU 10, 16, 23, 26 y 40, en comparación con los loci 2, 4, 20, 24, 27, 31 y 39 con menor polimorfismo. En la caracterización genotípica se identificaron el 87 % de los aislados dentro de las siguientes familias: T 21 %, LAM 10 %, Haarlem 10 %, X 11 %, Manu 5 %, para las familias S y U se encontró un 3% para cada una, y finalmente el 24 % de los aislados identificados corresponde a la familia Bovis, el 13 % de los aislados presentó un patrón único. El PCR-Múltiple nos muestra la presencia de una mutación en el gen *katG* o en el gen *inhA*, en este estudio no se observó ningún aislado con mutación en *katG* y solo el 5.3 % presentó mutación en *inhA*; mientras que la PCR- ARMS nos muestra las principales mutaciones específicas en los codones 516, 526 y 531 del gen *rpoB* estas mutaciones solo se presentaron en el 8% de los aislados. La técnica de Alamar Azul se utilizó para identificar la resistencia fenotípica a fármacos de primera línea, encontrándose un 32 % de cepas MDR. La implementación de estas técnicas de forma rutinaria en el laboratorio logrará una identificación adecuada y oportuna de las cepas pertenecientes al CMT, al igual que la identificación de las cepas MDR.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de las Micobacterias

Las micobacterias son un grupo de especies que conforman la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*; las bacterias se clasifican en el género *Mycobacterium* en función de:

- Su capacidad de ácido resistencia,
- Por tener ácidos micólicos con 70 – 90 átomos de carbono en su pared, y
- Un elevado contenido (61 - 71 %) de guanosina + citosina (G+C) en su ácido desoxirribonucleico (DNA).

Otras especies de bacterias pueden ser ácido resistentes por ejemplo *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* y *Gordonia*, aunque estas se tiñen con menor intensidad (ácido resistencia parcial) y las cadenas de sus ácidos micólicos son más cortas.

Las micobacterias son bacilos delgados, rectos o ligeramente curvos, de 1 – 10 µm de longitud, a veces ramificados, que pueden presentar crecimiento filamentosos y que se tiñen con dificultad. Son bacilos aerobios obligados sin motilidad y no esporulados. La pared celular contiene peptidoglicano similar al de otros organismos Gram positivos, sin embargo estos microorganismos no se tiñen con los reactivos utilizados en la coloración de Gram. La mayoría de las especies son de crecimiento lento, debido a su superficie celular hidrofóbica, lo cual provoca que se aglomeren y limita la permeabilidad de los nutrientes dentro de la célula. Por lo cual se necesitan semanas de incubación para observar las colonias. Otras especies son de crecimiento rápido y las colonias se forman en unos cuantos días.

El bacilo de la TB se divide cada 18 a 24 horas, se multiplica mejor cerca de los 37°C, la velocidad de desarrollo disminuye al alejarse de esa temperatura, muy difícilmente crece por debajo de los 34 °C y puede morir por encima de los 40 °C, puede crecer utilizando glicerol como fuente de carbono (metaboliza glicerol a piruvato), y asparagina e iones de amonio como fuente de nitrógeno y

micronutrientes. *M. bovis* raramente crece a partir de una muestra clínica en un medio con glicerol porque no puede procesar este compuesto o lo hace con mucha dificultad, en este caso es preferible un medio con piruvato o glutamato de sodio. Otro componente clave para el desarrollo del bacilo es la albúmina, habitualmente incorporada en los medios de cultivo con el agregado de huevos de gallina o seroalbúmina bovina.

Algunas de las micobacterias son patógenas para el hombre, mientras que otras son oportunistas, debido a que solamente producen enfermedad en circunstancias en las que se encuentra una depresión del sistema inmune.

Se conocen más de 140 especies de micobacterias, de las cuales 25 se han aislado de infecciones en el hombre. El complejo *M. tuberculosis* (CMT) es un patógeno muy importante para los humanos, el complejo *M. avium* y otras micobacterias atípicas con frecuencia infectan a pacientes positivos al virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y también producen enfermedad en pacientes con un sistema inmune normal. A excepción de *M. leprae*, las otras micobacterias sin incluir el CMT se conocen como micobacterias no tuberculosas (MNT). ^[1, 2, 3]

1.1 Características de la pared celular de las micobacterias

Las micobacterias poseen una pared celular compleja y rica en lípidos, la cual es responsable de muchas de las propiedades características de las bacterias, por ejemplo su ácido resistencia, crecimiento lento, resistencia a detergentes, resistencias a los antibacterianos frecuentes, antigenicidad, y formación de agregados, entre otras.

La estructura básica de la pared celular es característica de las bacterias Gram positivas: una membrana citoplásmica interna cubierta con una gruesa capa de peptidoglicanos (PG) y carente de una membrana externa. La estructura de la pared celular micobacteriana es notablemente más compleja que la de cualquier otra bacteria Gram positiva. En la membrana plasmática se anclan proteínas, monósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomanano (LAM).

La pared de las micobacterias está conformada por tres capas, en las cuales encontramos ácidos micólicos, cera D (grupo de peptidogucolipidos unidos por enlaces covalentes), glucolipoproteínas, trehalosa 6',6 dimicolato, sulfátidos y micósidos, entre otros. El 60% del total de la pared son lípidos. Ningún componente por sí sólo puede considerarse como un factor de patogenicidad. Ver Figura [1].

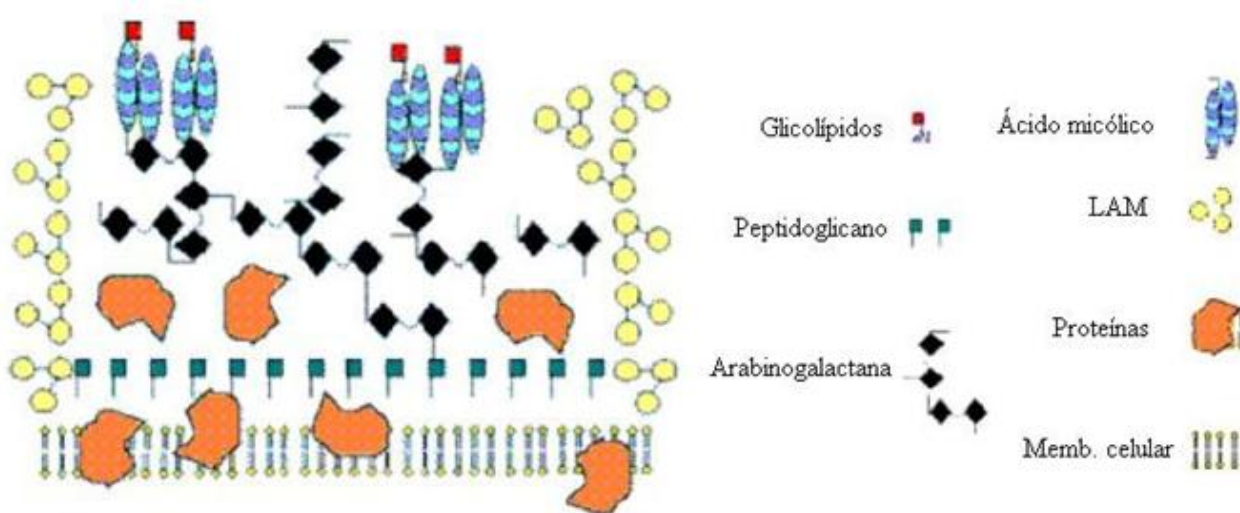


Figura 1 . Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. La bacteria está envuelta dentro de una bicapa lipídica de membrana citoplasmática que permanece abajo del peptidoglicano rígido (PG). Cierta número de proteínas se encuentran en asociación con PG y entre la membrana. Los PG y algunas de ellas pueden ser inmunogénicas. ^[URL 1]

Mycobacterium tuberculosis (MTb), no produce exotoxinas ni endotoxinas. Sin embargo, el factor cordón (FC), ver Figura [2], que causa la agrupación de estos bacilos, compuesto por la trehalosa 6',6-dimicolato, está estrechamente relacionado con las cepas virulentas. Además se ha encontrado que es el responsable de la inhibición de la migración de polimorfonucleares al sitio de colonización e induce la formación de granulomas.

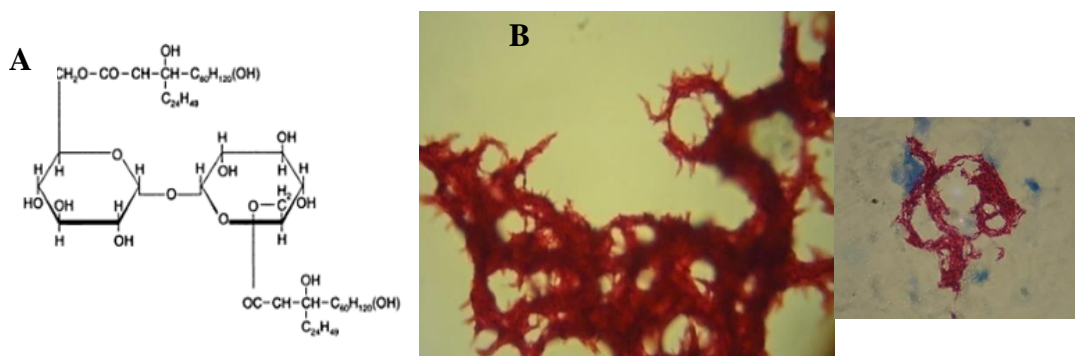


Figura 2 . A. Estructura molecular del factor cordón (Trehalosa 6,6'- dimicolato) producido por *M. tuberculosis*. ^[5] B. Imagen factor cordón.

Los sulfátidos son glucolípidos localizados de forma periférica, no son tóxicos por si mismos pero se considera que el efecto que producen es reforzar la acción del FC en la formación de granulomas. La membrana citoplásmica sirve como base para enlazar componentes de la pared celular. El peptidoglicano se une a una capa de arabinogalactano en la que se acoplan ácidos micólicos, formando un complejo de pared. Los ácidos micólicos o micósidos son ácidos grasos de cadena larga que se encuentran esterificados con los polisacáridos de la pared, y se considera que se asocian con el ácido resistencia. [1,6]

2. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

La clasificación de las micobacterias se ha basado en aspectos fenotípicos. Actualmente la clasificación se basa en técnicas moleculares (identificación de las secuencias específicas de DNA de las diferentes especies).

El CMT incluye *M. bovis* (bacilo tuberculoso bovino que en forma característica es resistente a pirazinamida), el cual fue causa importante de tuberculosis (TB) transmitida por leche no pasteurizada, y que a la fecha es responsable de un pequeño porcentaje de casos en todo el mundo, *M. caprae* (relacionado con *M. bovis*), *M. africanum* (aislado en casos en África oriental, central y occidental), *M. microti* (el "bacilo de campañol", un microorganismo poco virulento y rara vez encontrado), *M. pinnipedii* (un bacilo que afecta a focas y leones marinos en el hemisferio sur y que se ha aislado de seres humanos), y *M. canettii* (rara vez aislado en el este africano, produce colonias lisas en medios sólidos); ver Tabla [1]. De las especies patógenas que forman parte del CMT, el agente más importante y frecuente de enfermedad en seres humanos es *M. tuberculosis*. [2, 7, 24.]

Tabla 1 . Complejo *M. tuberculosis*. [8]

Especies	Reservorio	Principales vías de transmisión	Manifestaciones clínicas comunes	Distribución
<i>M. tuberculosis</i>	Humanos	Persona a persona por inhalación de núcleos de gotitas.	TB pulmonar y extrapulmonar.	Cosmopolita
<i>M. bovis</i>	Humanos; ganado bovino	Ingestión de leche contaminada de vacas infectadas; transmisión por aire.	Enfermedad similar a la TB; <i>M. bovis</i> estrechamente relacionado con <i>M. tuberculosis</i> .	Cosmopolita
<i>M. africanum</i>	Humanos; monos	Inhalación de núcleos de gotitas.	Cultivos pulmonares; asemeja a <i>M. tuberculosis</i> ; rara.	África oriental y occidental
<i>M. microti</i>	Pequeños roedores, gatos, otros mamíferos domésticos	Animal a persona.	Se han reportado caso de enfermedad pulmonar, ganglionar, abdominal y meníngea.	-----
<i>M. canettii</i>	-----	Animal a persona.	Pulmonar.	África

3. Tuberculosis (TB)

La TB es una de las enfermedades más antiguas conocidas por los seres humanos y es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, recibió este nombre en 1834. Es un padecimiento infeccioso y transmisible, descrito por Villemin en 1865, pero no fue hasta 1882 que Koch logró aislar el agente causal e inocularlo experimentalmente en animales, de donde pudo recuperarlo, lo que confirmó su papel patogénico. Alcanzó proporciones epidémicas en el mundo occidental durante la Revolución Industrial en los siglos XVII y XIX, asociada con la urbanización y el hacinamiento. La enfermedad había tenido importantes componentes sociológicos y floreció a causa de la ignorancia, pobreza y falta de higiene. En estas condiciones los pobres eran su principal víctima, pero todos los sectores de la sociedad estaban en riesgo. Con el descubrimiento de la causa y el desarrollo de sustancias antimicrobianas eficaces, la TB fue controlándose en los países desarrollados. Por desgracia, la mortalidad y la morbilidad continúan teniendo el mismo nivel que en el siglo XIX en muchos países en vías de desarrollo.

Esta enfermedad es causada por MTb, si se trata correctamente, la TB es curable prácticamente en todos los casos, pero sin tratamiento 50 a 65 % de los enfermos pueden morir en un plazo de 5 años. La Sociedad Americana del Tórax clasifica a los casos de TB en 6 grupos, ver Tabla [2] [2, 7, URL 3]:

Tabla 2 . Sistema de clasificación de la tuberculosis, según la Sociedad Americana del Tórax. [9]

Sistema de clasificación de la tuberculosis.		
Clase	Tipo	Descripción
0	Aquellos individuos no infectados y no expuestos a la infección.	No historia de exposición. Reacción a la tuberculina negativa.
1	Contacto con tuberculosos, sin enfermedad (PPD ⁻)	Historia de exposición. Debe administrarse tratamiento quimioproláctico.
2	Infección tuberculosa sin enfermedad evidente, PPD ⁺ y baciloscopia negativa.	Estudios bacteriológicos negativos. No existe evidencia ni clínica, radiológica ni bacteriológica de TB. Requieren vigilancia estricta y finalmente tratamiento.
3	Tuberculosis pulmonar.	Cultivo para <i>M. tuberculosis</i> positivo. Evidencia clínica, bacteriológica o radiológica de TB. Debe estudiarse el caso totalmente y tratarse con los esquemas propuestos.
4	Tuberculosis sin enfermedad activa.	Historia de episodios de TB. Radiografía anormal con lesiones estabilizadas, cultivo negativo a <i>M. tuberculosis</i> . No se administra tratamiento porque su enfermedad no es activa.
5	Sospecha de tuberculosis.	El diagnóstico debe ser confirmado antes de tres meses. Reclasificado en el grupo correspondiente.

PPD: Derivado proteico purificado.

La TB afecta generalmente a individuos de baja condición socioeconómica, desnutridos, alcohólicos, adictos, desempleados, vagabundos, diabéticos, los que están expuestos a otros individuos infectados, individuos de edad avanzada y aquellos que viven hacinados en lugares de alta prevalencia, como zonas urbanas y rurales marginadas, asilos, internados y prisiones; se caracteriza por ser una enfermedad de la pobreza, ver Cuadro [1]. La población con mayor riesgo de padecer la enfermedad son los pacientes inmunodeprimidos (fundamentalmente los infectados por VIH). [4, 10, 11.]

Cuadro 1 . Poblaciones con mayor susceptibilidad a la tuberculosis. [11]

Disminución inespecífica de la resistencia
Adolescencia
Senectud
Desnutrición
Estado posgastrectomía
Uremia
Diabetes mellitus
Disminución de la resistencia debido a efectos hormonales
Embarazo
Tratamiento con esteroides adrenocorticoideales
Disminución de la resistencia local
Silicosis
Disminución de la inmunidad específica
Linfomas
Tratamiento inmunosupresor
Sarcoidosis
Vacunación con virus vivos
Infección por VIH

Suele afectar pulmones aunque la enfermedad puede afectar muchos tejidos y órganos. La infección ocurre en una persona susceptible después de la inhalación de bacilos contenidos en los aerosoles infecciosos emitidos por un enfermo tuberculoso, en particular durante la tos, el habla y el canto.

El riesgo de infección depende del tiempo de la exposición a los aerosoles infecciosos y de la susceptibilidad a la infección. Un individuo susceptible con una exposición cercana y prolongada, a una persona que sea positiva a TB pulmonar tiene un alto riesgo a la infección.

La infección con MTb puede ocurrir a cualquier edad. Una vez infectada una persona puede estarlo por muchos años, probablemente por toda su vida, y no desarrollar TB. En estos casos, los individuos asintomáticos pero infectados, la única evidencia

de infección puede ser, una prueba de tuberculina positiva. Las personas infectadas pueden desarrollar TB en cualquier momento. ^[10, 12, 13.]

La epidemiología de la TB ha cambiado en forma drástica en la última mitad del siglo XX, de una enfermedad vista en las poblaciones de mayor edad, a una enfermedad de incidencia creciente que se observa en las poblaciones más jóvenes urbanas. Además, ha cambiado por la resistencia a fármacos, VIH, y la migración de personas nacidas en zonas con tasas altas de TB. La tuberculosis multidrogorresistente (MDR, por sus siglas en inglés), ha surgido como amenaza importante a la salud pública y es un desafío clínico. ^[11]

En el reporte global de TB de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del 2012 se estimó 8,7 millones de casos nuevos (13 % coinfectados con VIH), y 1.4 millones fallecieron por esta enfermedad en el año 2011. ^[URL 3]

De acuerdo con la información disponible en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en el periodo del año 2000 al 2010, el número de casos se ha venido incrementando; en nuestro país se registran cada año cerca de 15 mil casos nuevos de TB pulmonar y cerca de dos mil defunciones por esta causa, lo que representa una importante pérdida ya que el promedio de edad de muerte por este padecimiento es de 54 años, lo que representa un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de México. (Ver Gráfica [1])

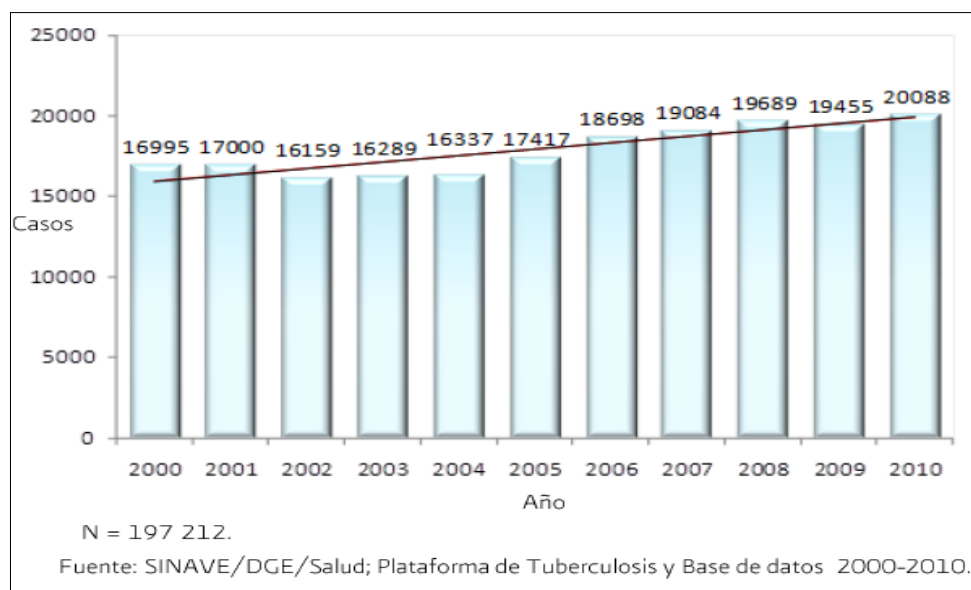
La TB sigue siendo más frecuente en los varones (razón hombre: mujer 1.5:1), aunque varía de un estado a otro, lo que puede deberse a factores sociales y de comportamiento; aunque se hace evidente que el sexo masculino ha presentado el mayor número de casos (durante el período reportado 2000 – 2010). (Ver Gráfica [2]).

En la relación con la edad de los pacientes nuevos diagnosticados con TB, se observa que el grupo de 65 años y más es el que mayor número de pacientes registra (32 082); además se hace evidente que los menores de 15 años son los que presentan el menor número de pacientes. (Ver Gráfica [3])

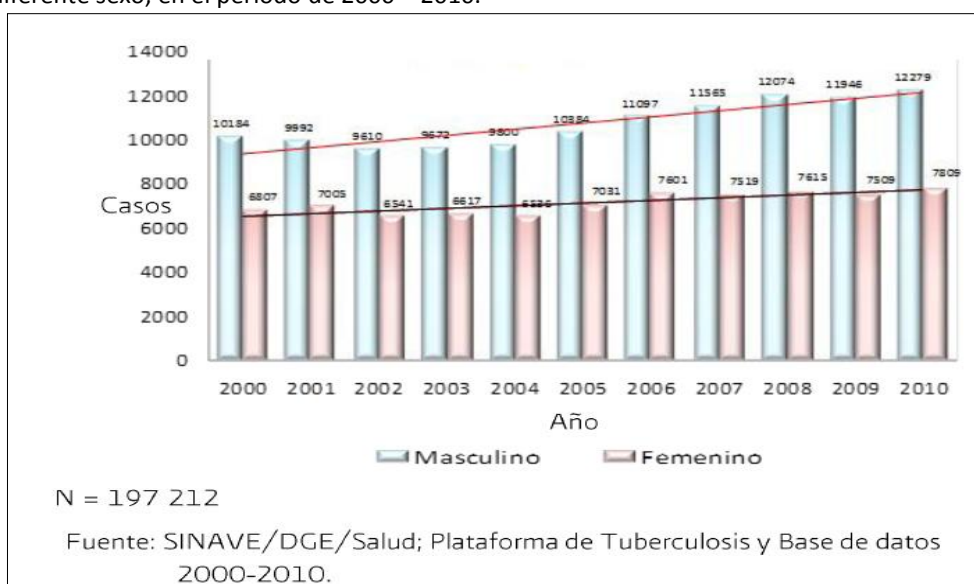
En México se reportaron los siguientes datos en relación con el método utilizado para determinar el diagnóstico: baciloscopia (tres cuartas partes del total, 145,305 – 73.7 %, de los casos se diagnostica a través de este método); le sigue la radiología (21 647 – 10.9 % de los casos) y el método histológico (se utilizó en 6.8 % de los pacientes). En cuanto a la localización de la enfermedad se reporta que durante el periodo 2000 al 2010, la mayoría de los casos presentaron TB pulmonar (85 %), el segundo lugar se presentó a nivel ganglionar (4.7 %), el resto en diversas partes del cuerpo; las más frecuentes ojos, oídos y glándula tiroides, ver Cuadro [2]. La mitad de los casos no presenta ninguna enfermedad concomitante, no obstante las más frecuentes asociadas con TB son: diabetes mellitus con 18 % (35 % en mayores de 40 años), desnutrición 11.6 % (24 % en niños), alcoholismo 6.8 % y VIH/SIDA 4 %. (SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida).

Se identifica mayor riesgo de morir por TB, conforme aumenta la edad. Los adultos en edad productiva, en conjunto con los de 65 y más años, concentran 94 % del total de las defunciones, siendo estos últimos los que registran el mayor riesgo de morir con una tasa de 12 defunciones por cada 100 mil habitantes. La razón de la tasa de mortalidad hombre: mujer es 2.6:1. ^[URL4]

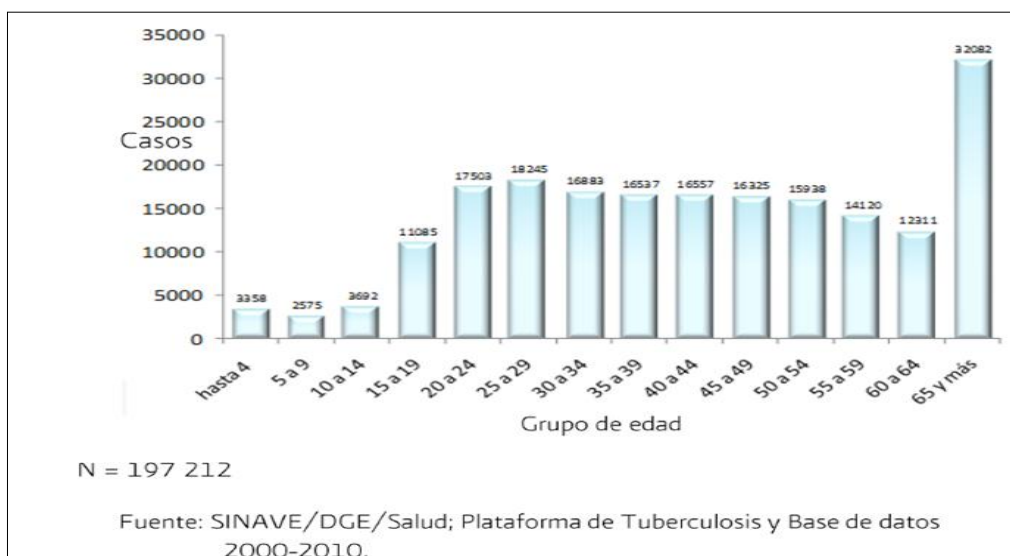
Gráfica 1 . Distribución y tendencia de los casos nuevos de tuberculosis por año 2000 – 2010.



Gráfica 2 . Distribución y tendencia de los casos nuevos de tuberculosis entre personas de diferente sexo, en el periodo de 2000 – 2010.



Gráfica 3 . Distribución de casos nuevos de tuberculosis por grupos de edad, 2000 – 2010.



3.1. Binomio VIH/SIDA- Tuberculosis

El VIH incrementa la susceptibilidad a la infección con MTb e incrementa el riesgo de la progresión de la infección a desarrollar la enfermedad de TB. El riesgo incrementa con el aumento de inmunosupresión. La enfermedad puede ocurrir en cualquier etapa de la infección de VIH. Comparado con un individuo que no está infectado, una persona infectada incrementa 10 veces el riesgo de desarrollar TB.

En una infección temprana con VIH, cuando la inmunidad es buena, los signos de la TB son similares a aquellos que no están infectados. Cuando la infección de VIH progresa y la inmunidad declina, la diseminación de TB llega a ser más común. En

un individuo infectado con VIH, la presencia de otras infecciones, incluyendo la TB, puede permitir que el VIH se multiplique con mayor rapidez. Esto puede resultar en la progresión más rápida de la infección por VIH.

Los enfermos con muy pobre inmunidad mediada por células T, desnutrición y VIH/SIDA, déficit de células CD4+ con valores menores a 200/mm, la infección por MTb puede avanzar con extrema rapidez y dar lugar a múltiples manifestaciones graves.

La pandemia de VIH y la propagación de cepas MDR aumentan el problema que representa la TB. A nivel global, un tercio de la población mundial está infectada y 30 millones de personas tienen una enfermedad activa. Se estima que los pacientes con TB latente multiplican por un factor de 200 a 300 veces su riesgo de reactivación de la enfermedad cuando tienen infección adicional por VIH. La TB y el VIH son las causas de muerte prematura en el mundo. [4, 10, 12]

3.2. Tuberculosis pulmonar

La TB se clasifica en dos grupos: primaria y posprimaria; la primera ocurre generalmente en niños y la segunda en adultos; de aquí el nombre de TB tipo adulto. [4]

- **Tuberculosis primaria**: generalmente se origina en niños, se realiza siempre por vía aérea mediante la inhalación de bacilos tuberculosos, estos alcanzan los espacios de los alvéolos. La infección puede alcanzar el ganglio correspondiente, formándose de esta manera el llamado complejo primario (Complejo de Gohn), que en la mayoría de los casos cura y deja una calcificación tanto en el ganglio como en el pulmón (parte central). [9, 11, 14.]
- **Tuberculosis posprimaria**: También llamada TB secundaria, de reactivación o de tipo adulto. La TB del adulto puede hacerse de dos maneras: 1) cuando es una reactivación a partir de focos endógenos previos inactivos, generalmente complejo primario, focos apicales, adenopatías, tuberculomas, etc. Esto suele ocurrir cuando existen procesos que deprimen los mecanismos

de defensa del organismo. 2) Cuando se trata de un nuevo contagio externo por vía aérea que se desarrolla de manera similar a la primoinfección. Ver Figura [3]. [2, 7, 8, 11, 13, 15]

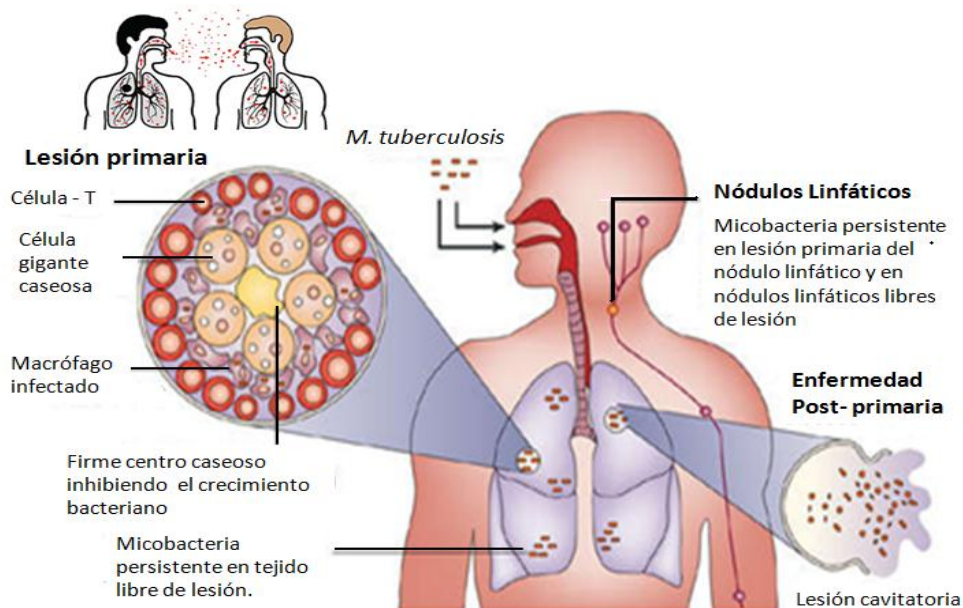


Figura 3 . Progresión de la tuberculosis; se puede contraer tuberculosis pulmonar mediante la inhalación de aerosoles infecciosos provenientes de la tos o estornudos de una persona infectada. [URL 2 y 5]

El adulto presenta fiebre, sudoración nocturna moderada, tos con expectoración purulenta y en ocasiones hemoptoica. La hemoptisis es un signo de alarma ya que puede ocasionar la muerte por asfixia si no se logra controlar. El dolor torácico es generalizado pero más agudo en las zonas pulmonares afectadas, si es localizado en un solo hemitórax sugiere la presencia de derrame pleural. Anorexia, astenia, adinamia y disnea son síntomas comunes pero de intensidad variable. La sintomatología se vuelve crónica; está influenciada por la edad y el estado inmunológico. Con frecuencia hay leucocitosis y anemia. Si el enfermo no recibe tratamiento su estado general se deteriora con evidente pérdida de peso y entonces puede morir, ver Cuadro [2]. [13, 10]

Cuadro 2 . Síntomas TB pulmonar. [15]

Respiratorio	General
Tos Esputo Hemoptisis Dolor en el pecho Dificultad para respirar Sibilancias localizadas Resfriados frecuentes	Pérdida de peso Fiebre y sudoración Cansancio Pérdida de apetito

3.3. Tuberculosis extrapulmonar

Fuera del pulmón los sitios donde con mayor frecuencia se localiza la TB son, por orden de frecuencia: ganglios linfáticos, pleura, aparato genitourinario, huesos y articulaciones, meninges, peritoneo y pericardio. Pero prácticamente todos los órganos y aparatos pueden resultar afectados. Dada la diseminación hematológica en los individuos infectados por el VIH, la TB extrapulmonar es más frecuente que tiempo atrás.

La mayoría de las infecciones tuberculosas se contraen por inhalación aunque otras vías de entrada son la gastrointestinal (por ingestión de leche producida por vacas tuberculosas), genitourinaria, cutánea, amigdalina, por inoculación o por abrasiones en la piel (inoculación directa) y transplacentaria, aunque son poco frecuentes.

La TB extrapulmonar es el resultado de la exposición de las superficies mucosas a las secreciones respiratorias infectadas, a la diseminación por contigüidad de la infección y a la diseminación linfohematológica, casi siempre en huéspedes inmunocomprometidos.

En la infección con VIH entre el 30 y 60 % de los pacientes con TB tienen focos extrapulmonares. Solo la mitad de los que presentan enfermedad extrapulmonar tienen una infección pulmonar simultánea identificable. Los focos extrapulmonares en el huésped con normalidad inmunitaria responden bien a los regímenes terapéuticos estándar. [2, 7, 11]

3.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad se realiza con el apoyo de:

1) Indicios radiológicos de la enfermedad pulmonar

En la radiografía de tórax pueden encontrarse los signos característicos: infiltrados y cavernas de los lóbulos superiores; Mientras que en los pacientes infectados simultáneamente con VIH, pueden tener signos atípicos en la radiografía de tórax (infiltrados en los campos inferiores sin formación de cavernas, o infiltrado micronodular difuso típico de Tb miliar). Ver Figura [4].

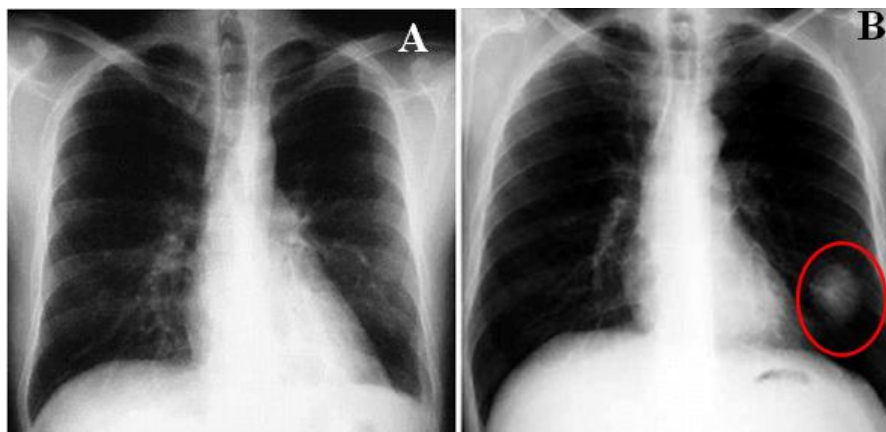


Figura 4 . Radiografías comparativas de tórax.

A. Radiografía de tórax normal. B. Radiografía de tórax PA. Tuberculoma calcificado basal izquierdo.^[16]

2) Resultados positivos en la prueba de reactividad cutánea.

La prueba empleada normalmente para evaluar la respuesta a la exposición a MTb es la prueba cutánea de la tuberculina. El antígeno de la tuberculina es un derivado proteico purificado (PPD, por sus siglas en inglés) de la pared celular de la micobacteria. Se emplea principalmente en los niños en donde es difícil obtener muestras para examen bacteriológico, 2UT mientras que en los adultos 5UT, vía intradérmica en la cara externa del brazo contrario donde se aplicó la BCG. Ver Figura [5].

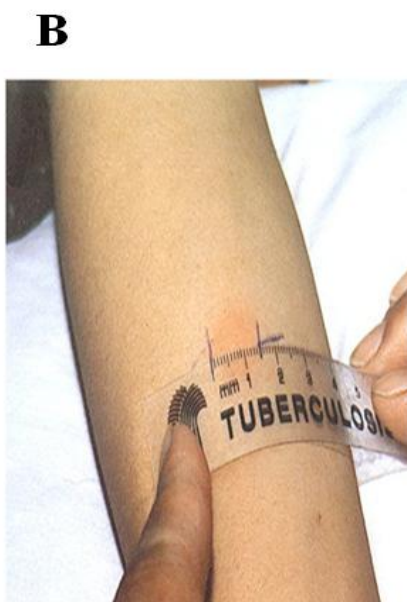
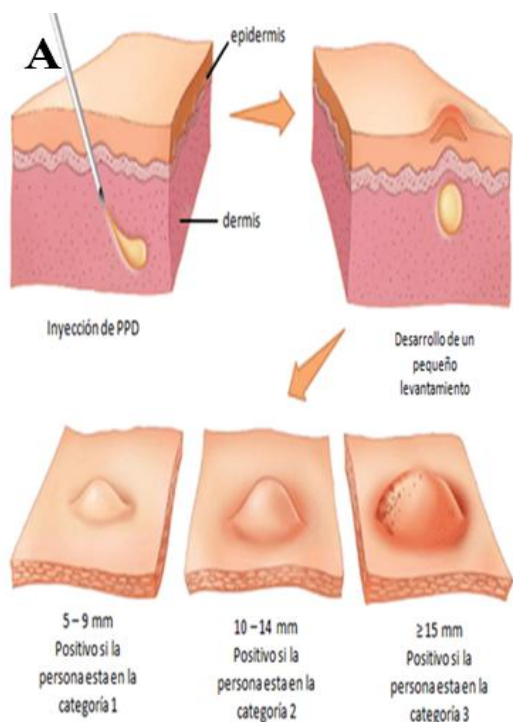


Figura 5 . Prueba de la tuberculina.

A. a) La tuberculina PPD es inyectada en la dermis. Un pequeño levantamiento se desarrolla, pero es absorbido internamente en un corto tiempo. b) después de 48 a 72 hrs, la reacción de la piel es leída y da una clasificación basada en el tamaño del área de la induración. Una reacción menor de 5 mm es negativa en todos los pacientes. La categoría 1 incluye, por ejemplo, individuos quienes han tenido contacto con pacientes infectados con tuberculosis activa y pacientes VIH positivos; categoría 2 incluye VIH negativos que usan drogas intravenosas, personas con condiciones médicas que los pongan en riesgo para el progreso de una tuberculosis latente a una activa, y niños quienes tienen contacto con miembros de poblaciones adultas con alto riesgo; categoría 3 individuos quienes no cumplen los criterios en las otras categorías. B. Medición de la induración en la prueba de Mantoux.^[URL 6]

3) Detección de micobacterias en el laboratorio.

La detección microscópica de los Bacilos Ácido - Alcohol Resistentes (BAAR) en las muestras clínicas es el método más rápido para confirmar la enfermedad por micobacterias. El diagnóstico definitivo se realiza mediante el aislamiento en medios especiales y la identificación de MTb en muestras clínicas mediante la realización de pruebas bioquímicas (niacina, inhibición de catalasa a 68 °C y reducción de nitrato) y pruebas moleculares específicas.

Los diferentes métodos empleados en el laboratorio para realizar el diagnóstico de enfermedad por micobacterias, se encuentran en el Cuadro [3]. [2, 4, 7]

Cuadro 3 . Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades por micobacterias. [4]

Diagnóstico Inmunológico
Prueba cutánea de la tuberculina
Pruebas de liberación de IFN- γ (IGRA)
Microscopia
Tinción de Ziehl-Neelsen
Tinción de Kinyoun
Tinción acidorresistente con fluorocromo Truant
Pruebas basadas en ácidos nucleicos
Pruebas de amplificación de los ácidos nucleicos
Cultivo
Medios de agar sólido o con huevo
Medios de caldo
Identificación
Propiedades morfológicas
Reacciones bioquímicas
Análisis de los lípidos de la pared celular
Sondas de ácidos nucleicos
Secuenciación de los ácidos nucleicos

El diagnóstico certero de TB se da por métodos microbiológicos; sin embargo éstas no son sensibles al 100 %; todas las técnicas microbiológicas son muy específicas sin embargo su sensibilidad está estrechamente ligada a la calidad y el procesamiento de la muestra recolectada. [17]

4. Tuberculosis meníngea

Las enfermedades del sistema nervioso central (SNC) causadas por MTb representan aproximadamente el 1 % de todos los casos de TB en México. Producen una alta mortalidad y un alto nivel de morbilidad neurológica, afecta principalmente a niños y a personas infectadas con VIH.

Los factores de riesgo principales son:

- Edad (niños > adultos)
- VIH +
- Malnutrición
- Sarampión en niños
- Alcoholismo
- Neoplasias
- Uso de agentes inmunosupresores en adultos
- Prevalencia de la enfermedad en la comunidad

Cada vez más la infección es nosocomial, es decir, adquirida en el hospital; en los hospitales urbanos la meningitis nosocomial es tan frecuente como las variedades que no se adquieren en los hospitales. En el paciente promedio, la tuberculosis meníngea (TBM), por lo general aparece después de varias semanas de la enfermedad, por la rotura de un tubérculo subependimario (Foco de Rich) hacia el espacio subaracnoideo, más que por siembra directa del líquido cefalorraquídeo (LCR) durante la bacteriemia. Las meninges basales son las que se comprometen en la mayoría de los casos. ^[11]

Se han descrito dos etapas en la patogénesis de la TBM: siembra bacteriana de las meninges y las regiones subpiales del encéfalo con formación de tubérculos, a lo que sigue la rotura de uno o más de estos tubérculos y la liberación de las bacterias hacia el espacio subaracnoideo. La meningitis puede ocurrir como suceso terminal en los casos de TB miliar o como parte de TB generalizada con un solo foco (tuberculoma) en el encéfalo. Desde el punto de vista microscópico los tubérculos meníngeos se parecen a los de otras partes del cuerpo y consisten en una zona central de caseificación rodeada por células epiteliales y cierta cantidad de células gigantes, linfocitos, células plasmáticas y tejido conjuntivo. ^[18]

En cerca de dos terceras partes de los pacientes con TBM se encuentra evidencia de TB activa en otros sitios, por lo general en pulmones y en ocasiones en intestino delgado, hueso, riñón u oído. Sin embargo, en algunos pacientes no se detecta TB fuera del SNC. Entre los pacientes adultos la TBM se observa frecuentemente asociada en individuos con VIH, alcohólicos y migrantes. ^[19]

4.1. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones iniciales suelen ser fiebre de grado bajo, malestar general, cefalea (más de la mitad de los casos), letargo, confusión y cuello rígido. Estos síntomas evolucionan con menor rapidez en la TBM comparado con la meningitis bacteriana, por lo general durante un periodo de una a dos semanas y a veces más tiempo. Pueden encontrarse signos de afección de los nervios craneales, provocando parálisis oculares y en ocasiones parálisis faciales o sordera y papiledema en el momento del ingreso en el hospital. Excepto por el surgimiento de microorganismos resistentes a fármacos, la infección por VIH no parece cambiar las manifestaciones clínicas o el pronóstico de la TBM.

Si la enfermedad se deja sin tratamiento, su evolución se caracteriza por confusión y estupor cada vez más profundo y coma, acoplados con parálisis de nervios craneales, anomalías pupilares, déficit neurológico focal, aumento de la presión intracraneal y posturas de descerebración; la ocurrencia de la muerte es invariable al cabo de cuatro a ocho semanas del inicio.

Respuesta ocular		
Esontánea	4	
A estímulos verbales	3	
Al dolor	2	
Ausencia de respuesta	1	
Respuesta verbal		
Orientado	5	
Desorientado/confuso	4	
Incoherente	3	
Sonidos incomprensibles	2	
Ausencia de respuesta	1	
Respuesta motora		
Obedece ordenes	6	
Localiza el dolor	5	
Retirada al dolor	4	
Flexión anormal	3	
Extensión anormal	2	
Ausencia de respuesta	1	

Puntuación: 15 Normal
 < 9 Gravedad
 3 Coma profundo

Figura 6 . Escala de Glasgow.

Las etapas de la TBM se dividen en 3, la primera es cuando el paciente está alerta y orientado, sin déficit neurológico focal, la segunda cuando la escala de coma Glasgow es de 14 a 11 o de 15 con déficit neurológico focal, y por último, la tercera etapa es cuando la escala de Glasgow es de 10 o menor, con o sin déficit neurológico focal. Ver Figura [6]. ^[19]

4.2. Epidemiología de la tuberculosis meníngea en México

En el año 2011 México reportó a la OMS 18 986 casos de TB pulmonar y extrapulmonar, de los cuales 3 529 casos corresponden a TB extrapulmonar y 228 casos son TBM. Del total de casos reportados en México, se estima que el 19 % corresponde a pacientes con la coinfección TB/VIH. ^[URL 3, URL 4]

4.3. Tratamiento

En todos los pacientes con TB del sistema nervioso central, el tratamiento debe ser administrado durante un año aproximadamente, dividido en dos etapas: fase intensiva, 2 meses (de lunes a sábado con Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol [HRZE]); y fase de sostén, 10 meses aproximadamente (intermitente, 3 veces a la semana, con Isoniazida y Rifampicina [HR]), ver Tabla [3]. ^[URL 7]

Tabla 3 . Tratamiento Primario Acortado Estrictamente Supervisado (TAES).

Fase intensiva	Diario de lunes a sábado, hasta completar 60 dosis Administración en una toma	
Fármacos	Separados (dosis)	Combinación fija clave 2414 (presentación) 4 grageas de:
Rifampicina (R)	600 mg	150 mg
Isoniazida (H)	300 mg	75 mg
Pirazinamida (P)	1,500 mg a 2,00 mg	400 mg
Etambutol (E) ^(a)	1,200 mg	Clave 2405 (presentación) 3 tabletas de: 400 mg
Fase de sosten:	Intermitente, 3 veces por semana, lunes, miércoles y viernes, hasta completar 45 dosis Administración en una toma	
Fármacos	Separados (dosis)	Combinación fija clave 2415 (presentación) 4 caps de :
Isoniazida	800 mg	200 mg
Rifampicina	600 mg	150 mg

(a) Usar solo en mayores de 8 años, puede ser reemplazado por estreptomicina.

5. Fármacos empleados en el tratamiento de tuberculosis

El tratamiento farmacológico para TB comenzó cuando se descubrió la estreptomina (S), a mediados de 1940. Los ensayos clínicos aleatorizados indicaron claramente que la administración de S a los pacientes con TB crónica disminuía la mortalidad y en la mayor parte de los casos lograba la curación. Sin embargo, esta monoterapia iba seguida muchas veces de la aparición de resistencia a este fármaco y del consiguiente fracaso terapéutico. Tras el descubrimiento del ácido para-amino-salicílico (PAS, para-aminosalicylicacid, por sus siglas en inglés) y de la isoniazida (H) se estableció el axioma en el cual para curar la TB era necesario administrar simultáneamente dos fármacos, como mínimo, a los que fuera sensible el microorganismo. Más tarde, los primeros ensayos clínicos demostraron que era preciso el tratamiento de larga duración (es decir, de 12 a 24 meses) para evitar las recaídas.

Con la introducción de la rifampicina (R) a comienzos de 1970 se inició la época de una quimioterapia eficaz de breve duración (<12 meses). El descubrimiento de que la pirazinamida (Z), utilizada por primera vez en 1950, aumentaba la potencia de las pautas de I-R dio paso al ciclo terapéutico habitual de seis meses con estos tres fármacos.

Los dos objetivos principales del tratamiento antituberculoso son: interrumpir la transmisión de la TB combatiendo la infección en los pacientes (de modo que no infecten a otros) y evitar las complicaciones y la muerte, curando a los que tienen la enfermedad. [7]

El tratamiento eficaz se basa en varias consideraciones. La primera es que sólo los microorganismos que se reproducen de forma activa son destruidos por ella. Las diferencias en la velocidad metabólica de las micobacterias se asocian con distintas sensibilidades de éstas a los fármacos antituberculosos. Pueden identificarse cuatro subpoblaciones principales de bacilos de tuberculosis, ver Cuadro [4].

Cuadro 4 . Poblaciones Bacilares. ^[11]

Grupo 1.	Microorganismos que viven fuera de las células, en las cavidades pulmonares, tienen mucha actividad metabólica, se desarrollan con rapidez y de manera continua en un ambiente hiperoxigenado y con pH neutro. Estos microorganismos son sensibles a la estreptomina, la isoniazida y el etambutol.
Grupo 2.	Los microorganismos que viven fuera de las células en las lesiones caseosas cerradas tienen menos actividad metabólica o sólo la ejercen en forma intermitente, en un ambiente hipóxico y con pH neutro. Este grupo de microorganismos es sensible a la rifampicina y la isoniazida.
Grupo 3.	Los microorganismos intracelulares que viven en el medio ambiente ácido e hipóxico de los macrófagos tienen desarrollo lento o intermitente; la pirazinamida y la rifampicina tienen una eficacia singular contra estos microorganismos; la isoniazida es menos eficaz.
Grupo 4.	Microorganismos atrapados pueden volverse inactivos por completo, y no ser afectados por los antimicrobianos y los mecanismos inmunitarios celulares. Estos microorganismos persistentes pueden estar presentes en tejidos que se curaron con fibrosis y encapsulación.

Un segundo aspecto importante a tener en cuenta para el tratamiento eficaz es la presencia de mutaciones que confieren resistencia a fármacos, las cuales pueden surgir de forma natural. ^[11]

El tratamiento para estas subpoblaciones bacterianas tiene que incluir una fase bactericida, durante la cual la mayoría de los microorganismos son eliminados con rapidez, una fase esterilizadora, más lenta, durante la cual los microorganismos residuales, sensibles, de metabolismo lento o intermitente, son inhibidos o eliminados. Ver Tabla [4] ^[2, 11]

Tabla 4 . Acciones de los agentes antituberculosos de primera línea. ^[11]

Fármacos	Actividad
Isoniazida (H)	Bactericida contra bacilos intracelulares y extracelulares.
Rifampicina (R)	Bactericida contra bacilos intracelulares y extracelulares; una fase esterilizante más lenta contra microorganismos de metabolismo particularmente lento.
Pirazinamida (Z)	Bactericida contra microorganismos intracelulares de metabolismo lento; activa en pH ácido; buena actividad sinérgica esterilizante con isoniazida y otros fármacos.
Estreptomina (S)	Bactericida contra bacilos extracelulares; activos en un pH neutro; eficaz contra bacilos intracavitarios.
Etambutol (E)	Bactericida contra microorganismos intracelulares y extracelulares en dosis de 25 mg/Kg; bacteriostático en dosis de 15 mg/Kg.

5.1. Fármacos de primera línea.

El término primera línea describe los principales fármacos empleados, isoniazida (H), etambutol (E), rifampicina (R), pirazinamida (Z) y estreptomina (S) que tienen mayor eficacia y toxicidad aceptable. Los medicamentos de segunda línea se prefieren menos y se reserva a casos en los que existe resistencia a los fármacos de primera línea.

La H, R, Z y E se han recomendado por su actividad bactericida, su actividad esterilizante, y la cifra pequeña de inducción de resistencia a fármacos. Debido a la elevada carga bacteriana y a la larga duración del tratamiento contra MTb, el surgimiento de resistencia durante el tratamiento constituye una preocupación mayor que con las infecciones más agudas. Por tal razón, el uso de múltiples fármacos con diferentes mecanismos de acción constituye una norma. El porcentaje elevado de infecciones con cepas resistentes a los fármacos de primera línea varía entre 5 y 15 %, pero parece estar aumentando, en particular entre quienes han recibido tratamiento previo. De especial preocupación es el surgimiento en los últimos dos decenios de cepas de TB MDR, que son resistentes a H y R, los pilares del tratamiento primario. Las cepas MDR representan en la actualidad casi 5 % de los casos en todo el mundo y más de la mitad de ellos se encuentran en tres países China, India y la Federación Rusa. Aunque siguen siendo poco comunes, en la actualidad se han encontrado cepas con resistencia extendida a una o más sustancias de segunda línea (XDR, por sus siglas en inglés). [2, 7, URL 3]

5.1.1. Mecanismos de acción y resistencia

Los fármacos antituberculosos difieren en su mecanismo de acción bactericida y en su liberación en las lesiones tuberculosas, como se observa en la Figura [7].

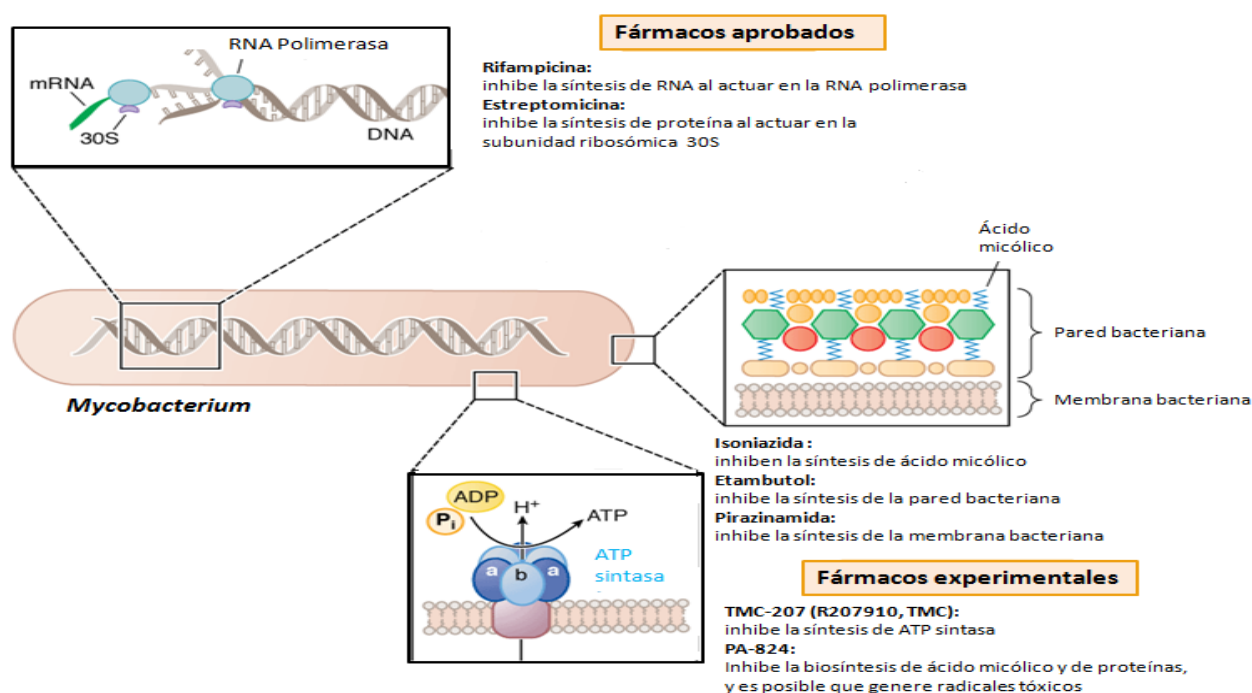


Figura 7 . Mecanismos de acción de fármacos aprobados y experimentales para la quimioterapia de infecciones por micobacterias. [20]

La resistencia de la TB a los fármacos puede ser primaria o adquirida. La resistencia primaria es la que tiene una cepa al infectar a un paciente todavía sin tratar. Ésta incluye la infección por cepas silvestres que nunca han estado en contacto con drogas (resistencia natural) y también la resistencia que se desarrolla como consecuencia de la exposición de una cepa a determinado fármaco, pero en otro paciente. [7, 21]

Se define como resistencia secundaria o adquirida, aquella que se desarrolla en pacientes que han recibido tratamiento antituberculoso, debido a la selección de cepas mutantes resistentes espontáneas, en la mayoría de los casos, motivado a un tratamiento inadecuado o incumplimiento del mismo.

La resistencia primaria es informativa de deficiencias y fracasos en los programas de control de la TB, mientras que la resistencia adquirida es indicativa de deficiencias en el tratamiento actual de un paciente con TB. [21]

Se ha advertido que siguen emergiendo cepas MDR debido a monoterapias no intencionales que resultan de una inadecuada prescripción de antibióticos que no se ajustan a los protocolos recomendados, pobre adherencia del paciente a la terapia, fallas en la supervisión del tratamiento, limitado suministro de los fármacos, bajo estándar en la calidad de fármacos antituberculosos y en general, fallas en las políticas gubernamentales para apoyar los programas de control de la TB.

La resistencia a fármacos en MTb se debe predominantemente a alteraciones en la secuencia de nucleótidos en genes que codifican blancos de antibióticos y a diferencia de otras bacterias no se han reportado mecanismos de adquisición de genes de resistencia vía plásmidos o transposones. Las micobacterias del CMT desarrollan resistencia a múltiples fármacos por la acumulación de mutaciones individuales en varios genes, cada uno de los cuales es responsable de la resistencia a un antibiótico particular. [21] (ver Figura [8])

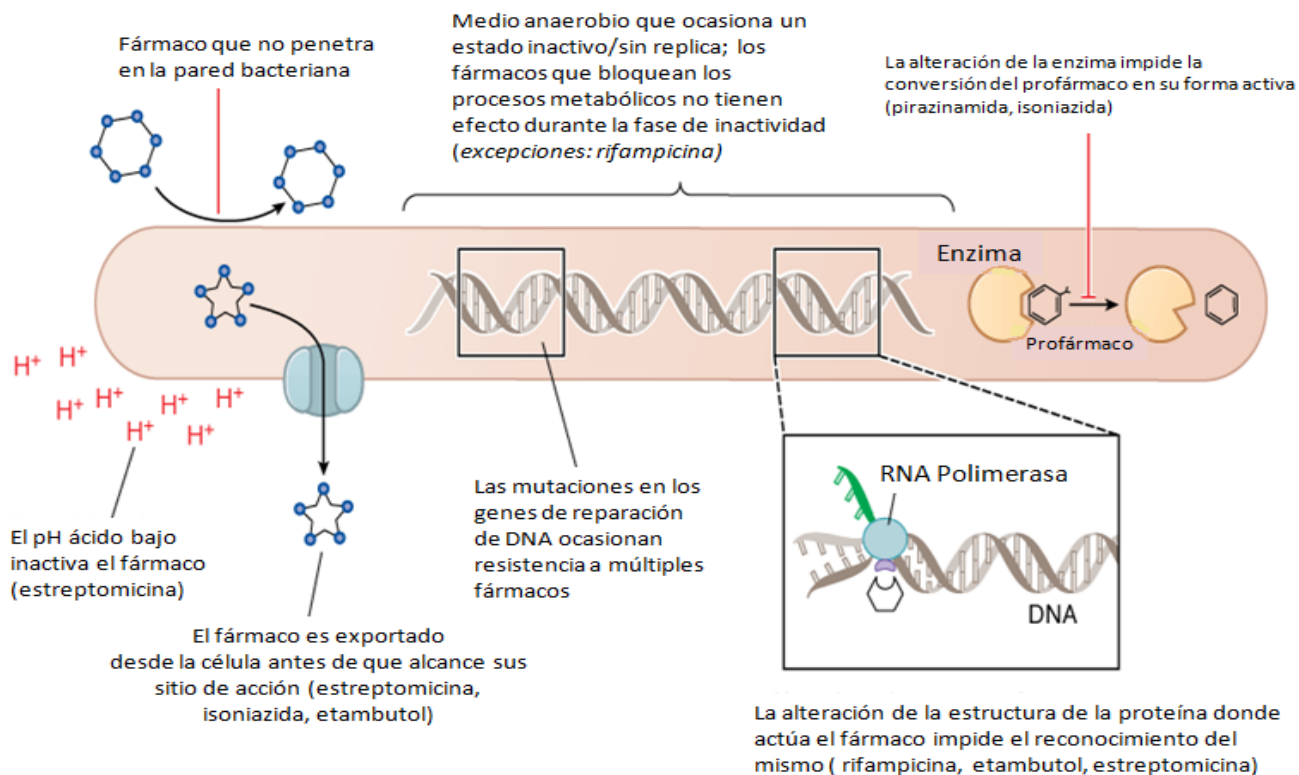


Figura 8 . Mecanismos de resistencia de las micobacterias de diferentes fármacos empleados en la actualidad para el tratamiento de la tuberculosis.^[20]

Como no existe resistencia cruzada entre los fármacos de primera línea, las posibilidades de que una cepa sea resistente a dos medicamentos se puede calcular multiplicando las probabilidades de resistencia de cada fármaco por separado y, por tanto, serán bajas, como se muestra en la Tabla [5].^[7]

Tabla 5 . Mutantes resistentes según población bacilar.^[URL 8]

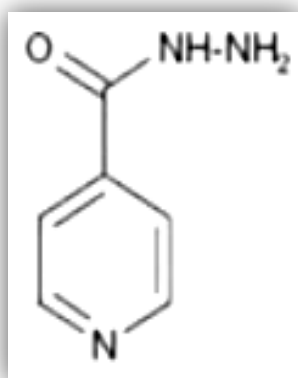
Fármaco	Tasa de Mutación
Rifampicina (R)	$1 \times 10^{8-9}$ bacilos
Isoniazida (H)	1×10^6 bacilos
Pirazinamida (Z)	$1 \times 10^{3-4}$ bacilos
Etambutol (E)	1×10^6 bacilos
Estreptomina (S)	1×10^6 bacilos

La carga bacilar y resistencia a fármacos dependerá de la ubicación y el tipo de de lesión que se presente en el transcurso de la enfermedad. (Ver Tabla [6])

Tabla 6 . Tipo de lesión carga bacilar y resistencia. ^[URL 8]

Lesión	Número de bacilos	Riesgo de resistencia
Infección subclínica o latente	$< 10^5$	Bajo
Lesión caseosa sólida	$\geq 10^5$	Alto
Caverna	$10^7 - 10^9$	Muy Alto
Tuberculosis renal	10^5	Alto
Tuberculosis osteoarticular	$10^6 - 10^8$	Alto
TB Ganglio, pleura, meninge, piel	$10^2 - 10^5$	

5.1.1.1. Isoniazida



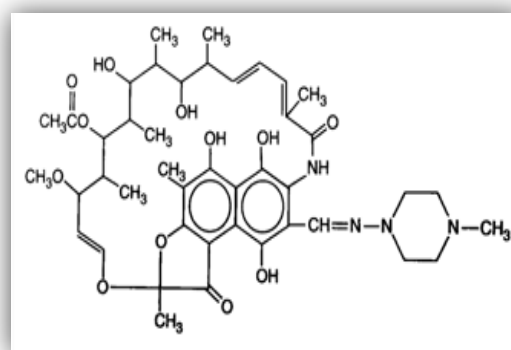
Isoniazida

La Isoniazida (H) bloquea la síntesis de ácidos micólicos, los cuales son componentes principales de la pared celular de los bacilos de MTb. Es un profármaco que es activado por la enzima katG (catalasa-peroxidasa de micobacterias) que produce especies reactivas que son las que ayudan a combatir a la micobacteria. La resistencia a la H se vincula con mutaciones que causan expresión excesiva de *ihnA*, que codifica una proteína transportadora de radicales acilo dependiente de la reductasa de NADH la cual cataliza un

paso inicial en la síntesis de ácidos grasos, también se asocia a la mutación o delección del gen *katG*. Las mutaciones observadas en *katG* son las causantes de la resistencia a este fármaco, la mutación más común se encuentra en el en el codón 315, el cual causa el cambio del aminoácido Serina 315 por Treonina (Ser315Thr). [22, 23, 24]

5.1.1.2. Rifampicina

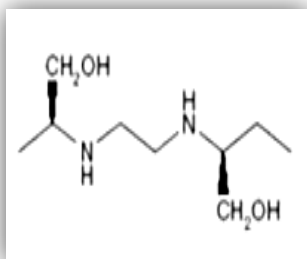
La Rifampicina (R) se une a la subunidad β de la polimerasa de RNA dependiente del DNA bacteriano y, por tanto, inhibe la síntesis del RNA. Ocurre la resistencia por cualquiera de varias posibles mutaciones puntuales en *rpoB*, el gen para la subunidad β de la polimerasa de RNA. Estas mutaciones causan menor unión de la R a la polimerasa



Rifampicina

de RNA, las mutaciones causantes se encuentran agrupadas en una pequeña zona del gen *rpoB*, únicamente 8 de los 23 aminoácidos presentes en esta región, especialmente en los residuos 516, 526 y 531. La polimerasa de RNA humana no se une ni se inhibe por ella. [22, 23, 24]

5.1.1.3. Etambutol



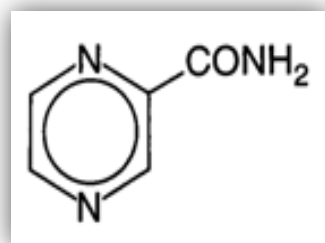
Etambutol

estructural *embB*. [20,24]

El Etambutol (E) limita a las transferasas de arabinosilo de las micobacterias que son codificadas por el operon *embCAB*. Las transferasas de arabinosilo participan en la reacción de polimerización del arabinoglucano, un componente esencial de la pared de las micobacterias. La resistencia a E se debe a mutaciones que causan expresión excesiva de productos del gen *emb* o dentro del gen

5.1.1.4. Pirazidamina

La Pirazinamida (Z) es una pizacina sintética análoga a la nicotinamida, también es



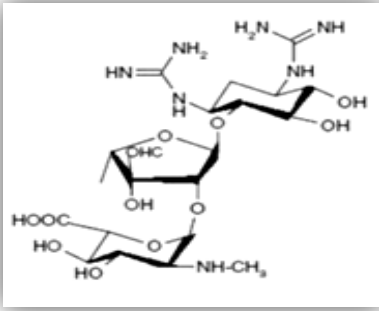
Pirazidamina

conocida como ácido amidapiracinoico. Es activada en condiciones ácidas y se inactiva a pH neutro. El fármaco es captado por los macrófagos y ejerce su actividad contra las micobacterias que residen en el ambiente ácido de los lisosomas. Las cepas de MTb resistentes tienen pirazinamidasa con una reducida afinidad por la Z. Esta afinidad reducida disminuye la conversión de Pirazinamida

a PAO (ácido pirazinoico). Una mutación puntual en el gen *pncA* es encontrado arriba del 70 % de los aislados clínicos resistentes. El mecanismo de acción se desconoce pero actualmente se han propuesto tres mecanismos de muerte celular:

- Inhibición de la síntesis de ácidos grasos tipo I, permitiendo la interferencia con la síntesis de ácidos micólicos.
- Reducción del pH intracelular.
- Interrupción de los transportadores de membrana para ácido pirazinoico. [20]

5.1.1.5. Estreptomina



Estreptomina

La Estreptomina (S) inhibe la síntesis proteínica al unirse a la subunidad ribosómica 30S y ocasionar una lectura errónea del código genético durante la traducción. La unidad ribosómica 30S está compuesta de rRNA (codificada por *rpsL*) que se une a la proteína ribosómica 12S (codificada por *rrs*) para optimizar la unión con tRNA y la decodificación de mRNA.

Las mutaciones en *rpsL* y *rrs* se asocian a resistencia a aminoglucósidos de alto nivel en micobacterias; las mutaciones en estos genes se detectan solo en la mitad de las cepas clínicas con resistencia a aminoglucósidos.

GidB es una metiltransferasa de rRNA para rRNA 16S y las mutaciones en el gen de *gidB* se vinculan con resistencia de bajo nivel a S. Las mutaciones con *gidB* condujeron a la aparición de mutantes con resistencia de alto nivel a S a un ritmo de 2000 veces el del tipo natural. [20]

Tabla 7 . Medicamentos antibacterianos de primera línea y genes asociados a TB - MDR. [24, 25]

Subclases	Mecanismo de acción	Gen	Mecanismo de resistencia	Frecuencia de mutaciones	Mutaciones reportadas
Rifampicina	Inhíbe a la polimerasa de RNA dependiente de DNA y así obstaculiza la producción de RNA	<i>rpoB</i>	Codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa, a la cual se une la rifampicina, interfiriendo en la síntesis del ácido nucleico en el proceso de replicación bacteriana.	96–98%	Región de 81pb (507–533) 531 (Ser→Leu, Thr), 498 (Val→Ala), 511 (Leu→Pro), 512 (Ser→Thr), 513–516 (Gln,Phe,Met,Asp→His), 513 (Gln→Leu), 514 (Phe→Val), 515–518 (Deletado), 516 (Asp→Val), 524–527 (Leu,Thr,His,Lis→Trp,Pro,Gln), 526 (His→Asp,Leu,Asn,Pro,Gln,Arg), 456 (Ser→Leu), 531 (Ser→Gln,Trp), 533 (Leu→Pro)
Isoniazida	Inhíbe la síntesis de acidomicolicos, componentes esenciales de las paredes celulares de las micobacterias.	<i>katG</i>	Codifica para la enzima catalasa-peroxidasa, encargada de transformar la isoniazida en el principio activo, inhibiendo la síntesis del ácido micólico.	50–68%	315 (Ser→Thr, Asn, Arg), 300 (Trp→Gly), 321 (Trp→Gly), 418 (Arg→Gln), 463 (Arg→Leu), 501 (Pro→Arg), 525 (Glu→Pro), 587 (Leu→Pro) y 700 (Ser→Pro)
		<i>inhA</i>	Codifica la síntesis de la proteína enoil ACP reductasa, implicada en la producción de ácidos grasos de la micobacteria.	21–34%	94 (Ser→Ala), 21 (Ile→Thr,V), 258 (Ile→Thr)
Pirazinamida	No se conoce completamente. Se convierte en ácido pirazinoico activo, bajo las condiciones de los lisosomas de macrófagos.	<i>pncA</i>	Codifica para la enzima pirazinamidasa, la cual transforma la pirazinamida en ácido piracinoico, resultando un pH ácido que parece ser el causante del efecto contra <i>M. tuberculosis</i> .	72–97%	57(His→Asp)
Etambutol	Inhíbe las transferasas de arabinosilomicobacterianas que participan en la reacción de polimerización del arabinoglucano. Un componente esencial de la pared celular micobacteriana.	<i>embB</i>	Codifica la síntesis de la enzima arabinosiltransferasa, relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular, lo cual incrementa la permeabilidad y la entrada en mayor cantidad de los otros fármacos.	47–65%	297 (Ser→Arg), 306 (Met→Ile, Leu, Val), 328 (Asp→Gly, Tyr), 330 (Phe→Val), 334 (Tyr→His), 406 (Gly→Ala, Asp), 497 (Gln→Lys, Arg), 745 (Gly→Asp), 959 (Asp→Ala), 1.000 (Mer→Arg), 1.024 (Asp→Asn)
Estreptomina	Previene la síntesis bacteriana de proteínas por unión a la fracción S12 ribosómica.	<i>rpsL</i>	Codifica para la unidad ribosomal S12, al cual se une la estreptomina para inhibir la síntesis proteica.	64–67%	43 (Lys→Arg, Thr), 88 (Lys→Gln, Arg, Thr)
		<i>rrS</i>	Codifica para el rRNA 16S, al cual se une la estreptomina para inhibir la síntesis proteica.	8–21%	516 (C→T), 1.400 (A→G), 1.539 (A→G)

6. Métodos de identificación para *Mycobacterium tuberculosis*

6.1. Métodos convencionales

A lo largo de los últimos años, el número de especies nuevas de micobacterias ha aumentado de forma muy importante, principalmente gracias al desarrollo de las técnicas basadas en la biología molecular. Sin embargo, gran parte de los laboratorios continúan usando características fenotípicas para la identificación de los aislamientos.

El diagnóstico microbiológico convencional de la TB se basa en las siguientes técnicas: baciloscopia, cultivo, identificación de especie y antibiograma o pruebas de susceptibilidad. [15, 17, 18, 28]

6.1.1. Baciloscopia

La baciloscopia, es la técnica fundamental en toda investigación bacteriológica de la tuberculosis, en la detección de casos y control de tratamiento. Es una técnica que permite identificar el número de BAAR, de los casos pulmonares positivos. En los países de alta prevalencia de TB, una baciloscopia positiva en una muestra respiratoria de un paciente inmunocompetente tiene muy alto valor predictivo para el diagnóstico de la enfermedad; es muy bajo el riesgo de equivocarse al diagnosticar TB por baciloscopia. Es el método más sencillo, rápido y económico.

Dependiendo el número de BAAR que se han identificado al realizar la lectura, serán los campos mínimos a leer por baciloscopia, ver Tabla [8], esto según el Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). [29]

Tabla 8 . Lectura de Baciloscopias.

Promedio de BAAR encontrados	Número mínimo de campos útiles a examinar
Ninguno	100
Menos de 1 por campo	100
1 a 10 por campo	50
Más de 10 por campo	20
De 1 a 9 en todo el extendido	100

6.1.1.1. Tinción de Ziehl – Neelsen

La coloración de Ziehl-Neelsen es la técnica más apropiada para ser utilizada en todos los laboratorios de los países de América Latina. Es la recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) así como por la OPS y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER) por ser la que asegura resultados reproducibles con un entrenamiento sencillo además de ser la más económica.

Las micobacterias absorben los colorantes y se forma el complejo micolato-fucsina en la pared celular, se calienta la solución de fucsina fenicada aplicada sobre el preparado normalmente hasta formación de vapores. Una vez que las micobacterias han absorbido el colorante, difícilmente lo ceden a pesar del tratamiento con solución decolorante alcohol-ácido clorhídrico; y aparecen en el preparado microscópico, teñidos de rojo fucsia, mientras todos los microorganismos no resistentes a los ácidos se tiñen con una solución de Azul de Metileno (según Loeffler) (Ver Figura [9]). Esta propiedad no es específica del bacilo de la TB, sino que la tienen todos los bacilos del género *Mycobacterium*.

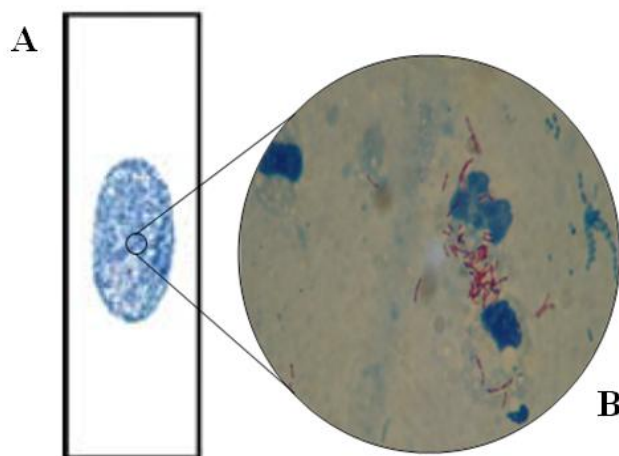


Figura 9 . A. Extendido de una muestra clínica teñida mediante la técnica de Ziehl-Neelsen. **B.** Bacilos acidorresistentes, que mediante la técnica de Ziehl-Neelsen se observan como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, rojo fucsia, destacándose claramente contra el fondo azul.

La siguiente es la escala adoptada internacionalmente para el informe de los resultados de extendidos examinados por la técnica de Ziehl-Neelsen: [27]

Tabla 9 . Escala para el informe de resultados de Baciloscopia.

Resultado del examen microscópico	Informe
No se encuentran BAAR en los 100 campos observados	No se observan bacilos ácido alcohol resistentes
Se observan de 1 a 9 BAAR en 100 campos observados	Nº exacto de bacilos en 100 campos
Se observa entre 10 y 99 BAAR en 100 campos observados	Positivo (+)
Se observan de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos observados	Positivo (++)
Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados	Positivo (+++)

Utilizando esta escala semi-cuantitativa estandarizada se asegura la reproducibilidad de los resultados y permite evaluar la gravedad de la enfermedad, la infectividad del paciente así como la evolución del paciente bajo tratamiento. La búsqueda de un diagnóstico por baciloscopia es muy importante, debido a que permite la toma de decisiones clínicas mientras se espera obtener los resultados del cultivo. [2, 27]

6.1.2. Cultivo

Los integrantes del CMT resisten menos fuera del hospedero. De manera que la probabilidad de hacerlos reproducir en el cultivo aumenta con la rapidez con la que se siembre la muestra de la lesión del paciente. La demora es muy crítica cuando el número de bacilos es escaso o cuando el pH de la muestra es desfavorable para la sobrevivencia del bacilo. La luz solar (UV), desecación y el calor son condiciones micobactericidas.

Las micobacterias tienden a ser más resistentes a agentes químicos que otras bacterias, por la naturaleza hidrófoba de su superficie celular y su proliferación en cúmulos. Los colorantes (como el verde de malaquita) o los antibacterianos (como la penicilina) que tiene propiedades bacterioestaticas en otras bacterias, pueden ser incorporados en medios de laboratorio sin inhibir la proliferación de los bacilos tuberculosos. [27]

Para llevar a cabo el cultivo de las muestras clínicas se emplea la técnica de descontaminación de Petroff modificada (la cual utiliza ácidos y álcalis); esta técnica permite la supervivencia de algunos bacilos tuberculosos expuestos y se usa para eliminar microorganismos contaminantes además de favorecer la concentración de las muestras.

El tiempo en el que se detecta un cultivo positivo depende del método de descontaminación aplicado, del pH al que haya quedado el inóculo luego del tratamiento y de la riqueza del medio de cultivo. Pero también depende de las características peculiares de algunas cepas del bacilo, de la cantidad de bacilos que haya en la muestra biológica y del tiempo durante el cual se ha administrado tratamiento antituberculoso al paciente. [29]

6.1.2.1. Medios de cultivo

6.1.2.1.1. Medios de cultivo líquidos

Los medios líquidos en general, son medios muy enriquecidos que recuperan un mayor número de micobacterias y más rápidamente que los medios sólidos. Por ello se aconseja incluirlos siempre para el aislamiento primario de muestras clínicas. Además estos medios se utilizan como base para diversas pruebas de identificación bioquímica y de sensibilidad a los fármacos antituberculosos; tienen la desventaja de no poder visualizar la morfología de la colonia ni valorar los posibles cultivos

mixtos. Existen medios comercializados y uno de los más utilizados es el MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*, por sus siglas en inglés).

El tubo MGIT, contiene Caldo Middlebrook 7H9 modificado y los suplementos de antibióticos (PANTA) y de enriquecimiento OADC; todos los tipos de muestras clínicas tanto pulmonares como extrapulmonares, pueden ser procesadas para el aislamiento primario. Ver Figura [10]

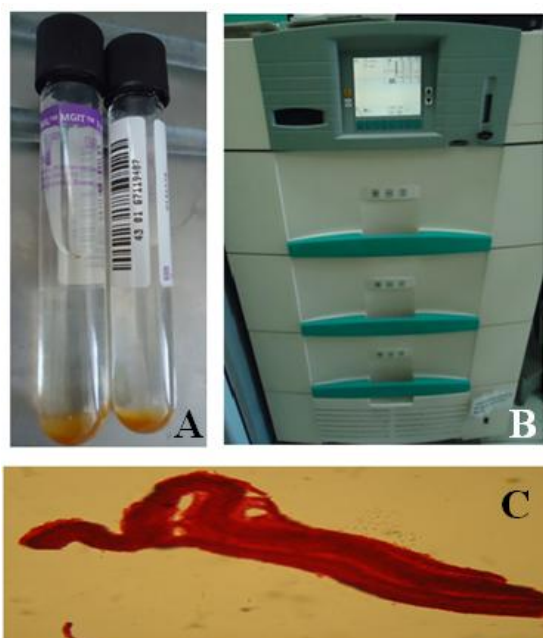


Figura 10 . A. Tubo indicador MGIT, con caldo de Middlebrook 7H9 modificado B. Sistema BACTEC MGIT 960. C. Desarrollo en medio líquido de *M. tuberculosis*.

6.1.2.1.2. Medios de cultivo sólidos

La ventaja fundamental de los medios de cultivo sólidos es la recuperación de gran parte de las especies micobacterianas.

El más utilizado es el Löwenstein-Jensen (LJ), el cual contiene sales definidas, glicerol y sustancias orgánicas complejas (como serían huevos frescos o yemas de huevo, harina de papa). Se incluye el verde de malaquita para inhibir la proliferación de otras bacterias. Este medio, con la adición de antibióticos, se utiliza como medio selectivo. Las colonias de MTb son habitualmente rugosas, sin pigmentación, y secas, como se observa en la Figura [11]. [26, 27]

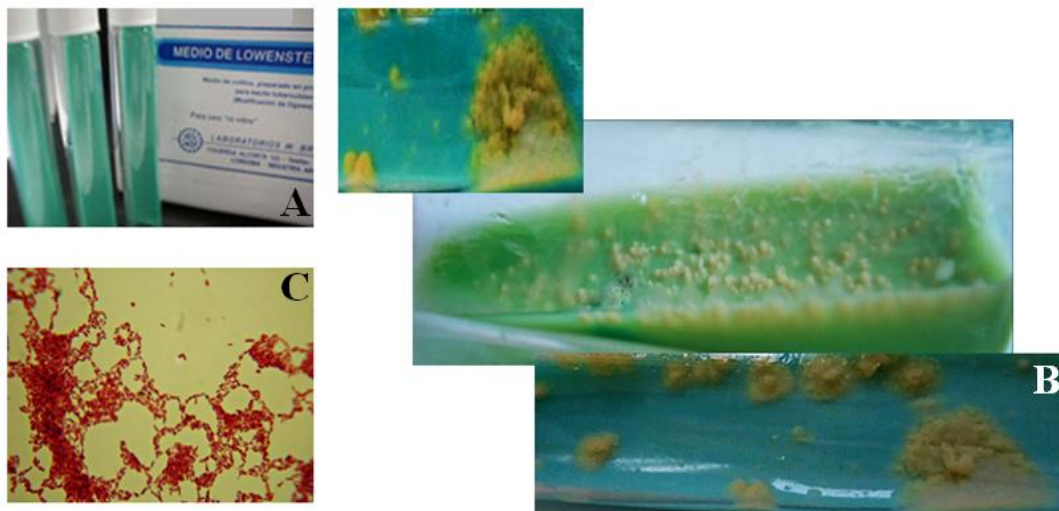


Figura 11 . A. Medio de cultivo comercial de Löwenstein-Jensen. B. Colonias de *M. tuberculosis*, en un cultivo en medio LJ. C. Tinción de Zhiel - Neelsen de colonias de *M. tuberculosis* de un cultivo de LJ.

6.1.3. Actividad de Adenosina Desaminasa (ADA)

Otra herramienta para llevar a cabo el diagnóstico de TB es la determinación de parámetros biológicos, como lo es la cuantificación de la adenosina desaminasa, que es un método enzimático de bajo costo y gran rapidez. La adenosina desaminasa (ADA; E.C. 3.5.4.4) es una enzima importante en el metabolismo de las purinas, cataliza la desaminación de adenosina y de 2'-deoadenosina, para formar inosina y 2'-deoxinosina respectivamente, con la liberación de amoníaco, ver Figura [12]. [31, URL 9]

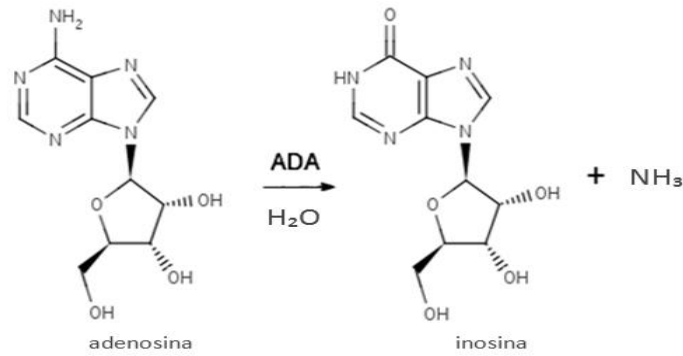


Figura 12 . La función biológica del ADA está vinculado al catabolismo de las purinas, llevando a cabo la reacción de desaminación de la adenosina y 2 – desoxiadenosina para formar inosina y 2’-deoxinosina.

La enzima ADA está presente en todo el organismo humano, existe actividad de ADA en todos los tejidos, sin embargo la mayor actividad es en el tejido linfoide, principalmente en los linfocitos T, se sabe que está relacionada con la proliferación y diferenciación linfocítica, por esta razón su actividad se encuentra elevada en procesos inmunes mediados por células, como los es la TB (teniendo más relación con el estado de maduración que con el número de linfocitos T; y con la maduración de los macrófagos). [31,32, 33, 34, 35, 36, 37]

El método colorimétrico de Giusti y Galanti es el empleado comúnmente, el cual consiste de manera general en que el ADA transforma a la adenosina en inopina y amoníaco; el amoníaco reacciona con el hipoclorito de sodio y fenol a 37 °C (con nitropusiato de sodio en medio alcalino como catalizador) para formar indofenol, que da un intenso color azul. El indofenol se mide espectrofotométricamente a 630 nm. Frente a un blanco reactivo. Los resultados se expresan en U/L a 37 °C. El amoníaco producido es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra. Ver Figura [13]. [35, 36]

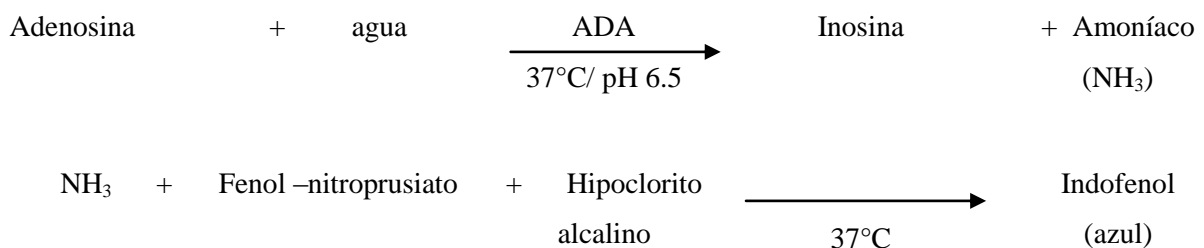


Figura 13 . Reacción de la determinación de Adenosina desaminasa (ADA).

La cuantificación de la enzima ADA contribuye al diagnóstico de la TB pleural, peritoneal y meníngea, (presenta una alta sensibilidad y especificidad); sin embargo debido a que puede haber cifras elevadas en otras enfermedades, éstas

se deben interpretar con precaución, sobre todo en los países con baja prevalencia de TB. [17]

6.2. Métodos moleculares

En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para llevar a cabo el diagnóstico rápido de la TB, y los métodos moleculares son la mejor alternativa; dentro de éstos se pueden distinguir aquellos sin amplificación previa y los que se basan en ella, los que se llevan a cabo a partir de cultivos del microorganismo o directamente de las muestras clínicas. [28]

6.2.1. IS 6110

Dos clases de DNA han sido encontrados involucrados en la diversidad genética: elementos transponibles de DNA o secuencias de inserción (IS) y secuencias cortas repetidas en tándem de DNA. Los dos elementos transponibles no relacionados que han sido identificados en MTb son **IS1081** y **IS6110**. El rango de hospederos de ambos elementos IS está limitado a las especies del CMT y por lo tanto estas secuencias multicopias son excelentes objetivos para una detección específica y sensible de estas micobacterias patogénicas por PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés).

IS6110 pertenece a los elementos de inserción de la familia IS3 originalmente descubierta en *E. coli* y *Shigella sp.* Posee 1361 pb, repeticiones indirectas (IR) de 28 pb y repeticiones directas (DR) de 3 - 4 pb. Como sólo es detectable en las especies del CMT y además mantiene la estabilidad necesaria para ser utilizada como herramienta diagnostica de los miembros de este complejo. Por muchos años fue considerado el método de referencia; sin embargo, requiere intensa labor, cultivo, poder discriminativo, además se requiere de una DNA de alta calidad y la base de datos RIVM. [38,39]

6.2.2. VNTR - MIRU

Los VNTR-MIRU (Variable Numbers of Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units, por sus siglas en inglés), son elementos en el DNA de 40 a 100 pb, que a menudo se encuentran en repeticiones en tándem y dispersos en regiones intergénicas del genoma del CMT. La cepa de referencia de MTb H37Rv contiene 41 locus de MIRU los cuales flanquean genes involucrados en el metabolismo bacteriano incluyendo la biosíntesis o la degradación de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas; así como la producción de energía y la transducción de señales. Se observan en la Figura [14]. [40, 41, 42]

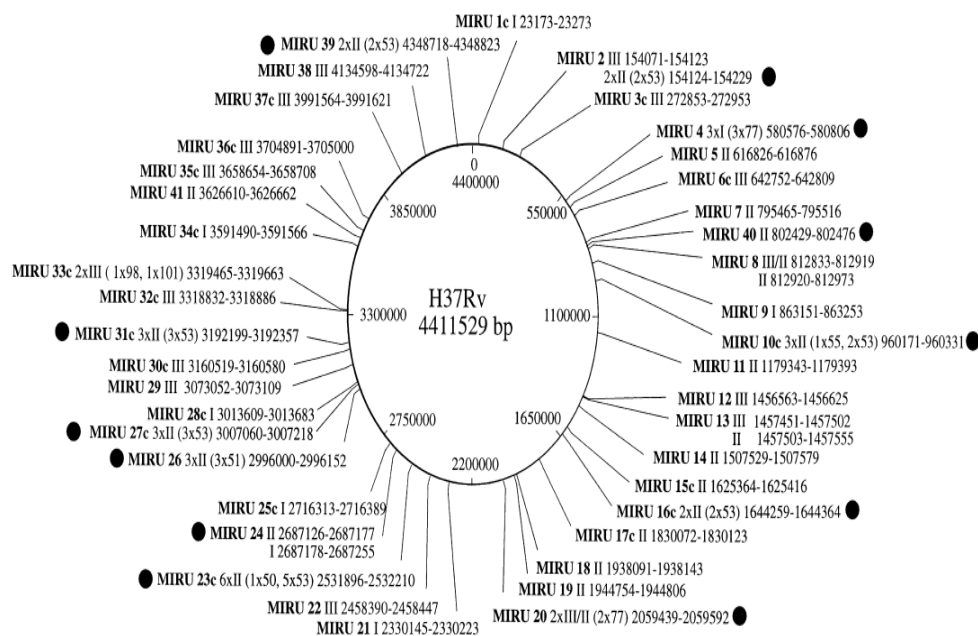


Figura 14 . Posición de los 41 MIRU en el cromosoma de *M. tuberculosis*.^[40]

La caracterización por VNTR - MIRU se realizó conforme a la técnica reportada por Supply y colaboradores en 2000; esta técnica utiliza 12 pares de iniciadores que amplifican cada uno de los 12 loci génicos MIRU de mayor variabilidad a los cuales se les asigna un código numérico de acuerdo al número de repetidos encontrados en cada loci; sus secuencias se señalan en la Tabla [10].

Ha sido ampliamente recomendada, ya que es una técnica rápida, con gran reproducibilidad y con alto poder de discriminación. Es posible que sustituya al RFLP - IS6110 como método de referencia.

Tabla 10 . Secuencia de los iniciadores específicos y polimorfismo de los MIRU de *M. tuberculosis*.

Locus MIRU	Tamaño esperado + unidad adicional (pb)	Polimorfismo	Secuencia de Primers (5' - 3')
2	402 + 53	Bajo	F - TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT R - TACTCGGACGCCGGCTCAAAT
4	114 + 77	Alto	F - GCGCGAGAGCCCGAACTGC R - GCGCAGCAGAAACGTCAGC
10	482 + 53	Alto	F - GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC R - GCCACCTTCTGATCAGCTACCT
16	565 + 53	Alto	F - TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA R - CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
20	437 + 77	Bajo	F - TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG R - GGAGACCGCGACCAGGTAATTGTA
23	150 + 53	Bajo	F - CTGTGATGGCCGCAACAAAACG R - AGCTCAACGGTTCCCTTTTGTGTC
24	395 + 54	Bajo	F - CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT R - GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
26	285 + 51	Alto	F - TAGGTCTACCGTAAAATCTGTGAC R - CATAGGCGACCAGGCGAATAG
27	498 + 53	Bajo	F - TCGAAGCCTTGCCTGCCAGTAA R - GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
31	492 + 53	Alto	F - ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA R - GTGCCGACGTGGTCTTGAT
39	540 + 53	Bajo	F - CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC R - CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
40	354 + 54	Alto	F - GGGTTGCTGGATGACAACGTGT R - GGGTGATCTCGGCCGAAATCAGATA

6.2.3. Espoligotipificación

Es uno de los métodos más utilizados para genotipificación del CMT, en el cual se analiza un locus característico de las cepas del complejo, se usa una amplificación del DNA de los polimorfismos detectados en la región DR. Las secuencias DR están ubicadas en un locus único del CMT separadas por unas secuencias no repetitivas de 34 a 41 pb. La ausencia o presencia de los espacios en distintas cepas hace que los patrones obtenidos sean específicos para cada microorganismo estudiado. Y es esta variación de los espacios utilizada para obtener diferentes patrones de hibridación. A partir del DNA amplificado y con los múltiples oligonucleótidos sintetizados a partir de las cepas de referencia, los cuales están unidos a una membrana. Cada cepa varía en número de DRs y en presencia o ausencia de espacios particulares, lo cual permite la clasificación de estas en familias de espoligotipos. Tiene la ventaja de utilizar únicamente el sobrenadante obtenido de someter la cepa a choque térmico para inactivar las células, no es necesaria la extracción y purificación del DNA lo que la hace fácil y de menor costo. [43, 44]

7. Métodos para la detección de farmacoresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*

7.1. Métodos colorimétricos

7.1.1. Alamar Azul

El ensayo Alamar Azul en microplacas (MABA, por sus siglas en inglés) es una prueba barata de susceptibilidad colorimétrica indirecto para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), de los fármacos antituberculosos en cepas de MTb.

En este ensayo el indicador redox Alamar Azul (AA) que se usa como indicador de crecimiento celular, la forma oxidada (azul) se reduce (rosa) debido a la actividad metabólica, en presencia de crecimiento micobacteriano. El MABA muestra resultados con altos niveles de concordancia para H y R; y bajos niveles de concordancia para E y S.

El uso de AA como indicador de crecimiento microbiológico fue originalmente introducido por Yajko *et al*, quien realizó la prueba en tubos y observó el desarrollo de color a altas temperaturas. Collins y Franzblau modificaron la prueba, la composición del medio de cultivo y las condiciones de temperatura para crear lo que se conoce como MABA. El ensayo puede modificarse utilizando Resazurina (RES) en lugar de AA, lo que disminuye el costo de la misma, aunque este compuesto no es tan estable como AA y tiene una forma oxidada adicional, la cual si no se revela en los tiempos determinados las cepas resistentes se observarían con una coloración rosa claro o transparente lo cual disminuye la credibilidad de los resultados. [45, 46, 47, 48]

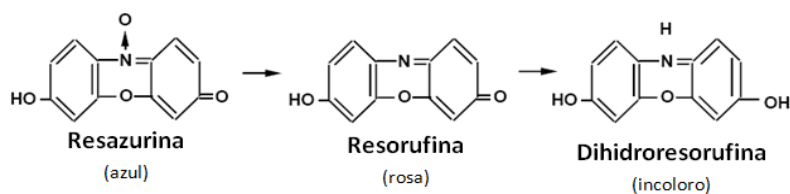


Figura 15 . Estructuras de las formas oxidada, semireducida y reducida de la resazurina. [49]

7.2. Métodos moleculares

7.2.1. PCR-Múltiple: *katG*, *mabA-inhA*

Por medio de esta PCR se detectan dos mutaciones diferentes en la misma reacción de amplificación, lo que disminuye el tiempo de identificación y los costos de la misma.

Se han asociado sustituciones de aminoácidos en los genes *katG*, *inhA* y *kasaA* para la resistencia a H. La PCR-Múltiple detecta la mutación en el gen *katG* específicamente en el codón 315, el cual causa el cambio del aminoácido Serina 315 por Treonina (Ser315Thr). También detecta una sustitución de C a T (*inhA*^{C-15T}) en el extremo 5' final de un presunto sitio de unión al ribosoma en el promotor del operon *mabA-inhA*. [23, 50, 51, 52]

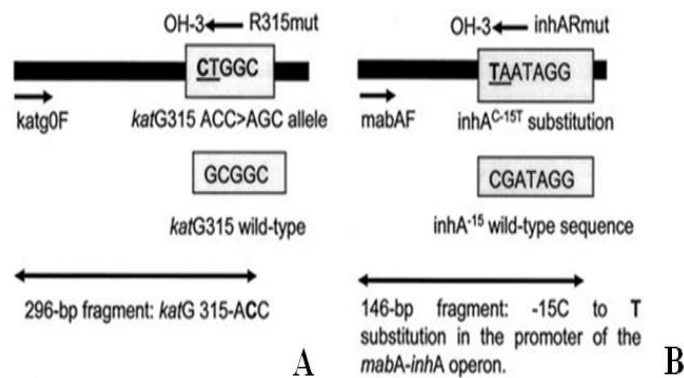


Figura 16 . Principales mutaciones para detectar resistencia a isoniazida. [52]

7.2.2. PCR-ARMS

Esta PCR es un método simple y rápido para detectar alguna variable genética que involucre el cambio de una sola base o pequeñas deleciones. Permite el análisis con cantidades mínimas de DNA, no requiere de una preparación previa de DNA de alta pureza.

PCR- ARMS (Amplification Refractory Mutation System, por sus siglas en inglés), se caracteriza por identificar mutaciones en el gen codificante para la subunidad β de la RNA polimerasa (*rpoB*), el cual es causante de la resistencia a R. Las mutaciones causantes se encuentran agrupadas en una pequeña zona del gen *rpoB*,

únicamente 8 de los 23 aminoácidos presentes en esta región, especialmente en los residuos 531, 526 y 516, las cuales son analizadas en esta PCR. [22, 50, 51, 53]

Esta técnica usa iniciadores que están diseñados para discriminar entre secuencias que difieren de una única base. Además, utiliza iniciadores control que amplifican otra región del gen, cercana a la mutación que será detectada, actuando como control interno de amplificación asegurando la eficiencia de la PCR y evitando falsos negativos.

JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo busca estandarizar las técnicas de genotipificación y farmacorresistencia molecular y fenotípica, con el fin de realizarlas de manera rutinaria y eficiente dentro del laboratorio de Neumología, en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", para así proporcionar al médico una herramienta más para el diagnóstico, brindar el tratamiento adecuado al paciente y enfrentar el problema de salud que representa la tuberculosis hoy en día.

Esta genotipificación es de importancia clínica y epidemiológica, ya que se pueden identificar brotes de la enfermedad, contaminación cruzada dentro del laboratorio, contagios nosocomiales, cepas virulentas, así como la identificación de cepas más comunes en los pacientes vulnerables. Además de identificar cepas farmacorresistentes.

HIPÓTESIS

Se espera que a través de la realización de las técnicas moleculares y los patrones obtenidos se logre la genotipificación de los aislados de Líquido Cefalorraquídeo, se corrobore que pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y se identifiquen brotes de la enfermedad, así como posible contaminación cruzada en el laboratorio, y además se identificarán los genes que confieren la resistencia fenotípica y molecular a fármacos de primera línea.

OBJETIVOS

General

- * Implementar y estandarizar las técnicas de genotipificación y farmacorresistencia para aislados clínicos del complejo *M. tuberculosis*; en muestras de Líquido Cefalorraquídeo enviadas al Laboratorio de Neumología del Hospital General de México, "Dr. Eduardo Liceaga"; dentro del periodo Enero 2007 a Junio 2012.

Específicos

- * Genotipificar las cepas aisladas mediante las técnicas de VNTR-MIRU y Espoligotipificación.
- * Identificar si existen patrones genéticos en los aislados y correlacionarlos con factores de riesgo presentes en los pacientes de los cuales proviene la cepa.
- * Identificar las cepas más frecuentes en pacientes con meningitis tuberculosa.
- * Identificar mutaciones en el DNA de las cepas analizadas, para detectar farmacorresistencia molecular.
- * Identificar farmacorresistencia fenotípica mediante la técnica de Alamar Azul.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población y tamaño de la muestra

Se seleccionaron 40 cepas, aisladas de muestras clínicas de Líquido Cefalorraquídeo, tomadas de pacientes con un diagnóstico probable de Tuberculosis Meníngea, del servicio de Neumología en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", en el periodo de Enero 2007 a Junio 2012. El 100 % de las muestras fueron identificadas en general como parte del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, por medio de la técnica de PCR utilizando la secuencia de inserción **IS6110**.

1. Criterios de Inclusión

- Aislados de muestras clínicas, de pacientes con diagnóstico de meningitis (muestras de Líquido Cefalorraquídeo).
- Aislados que pertenezcan al complejo *M. tuberculosis* identificados mediante la secuencia de inserción **IS6110**, que es una prueba realizada de forma rutinaria a todas las cepas en el laboratorio de Neumología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".

2. Criterios de Exclusión

- Aislados que pertenezcan a micobacterias no tuberculosas y al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* sin diagnóstico de meningitis.

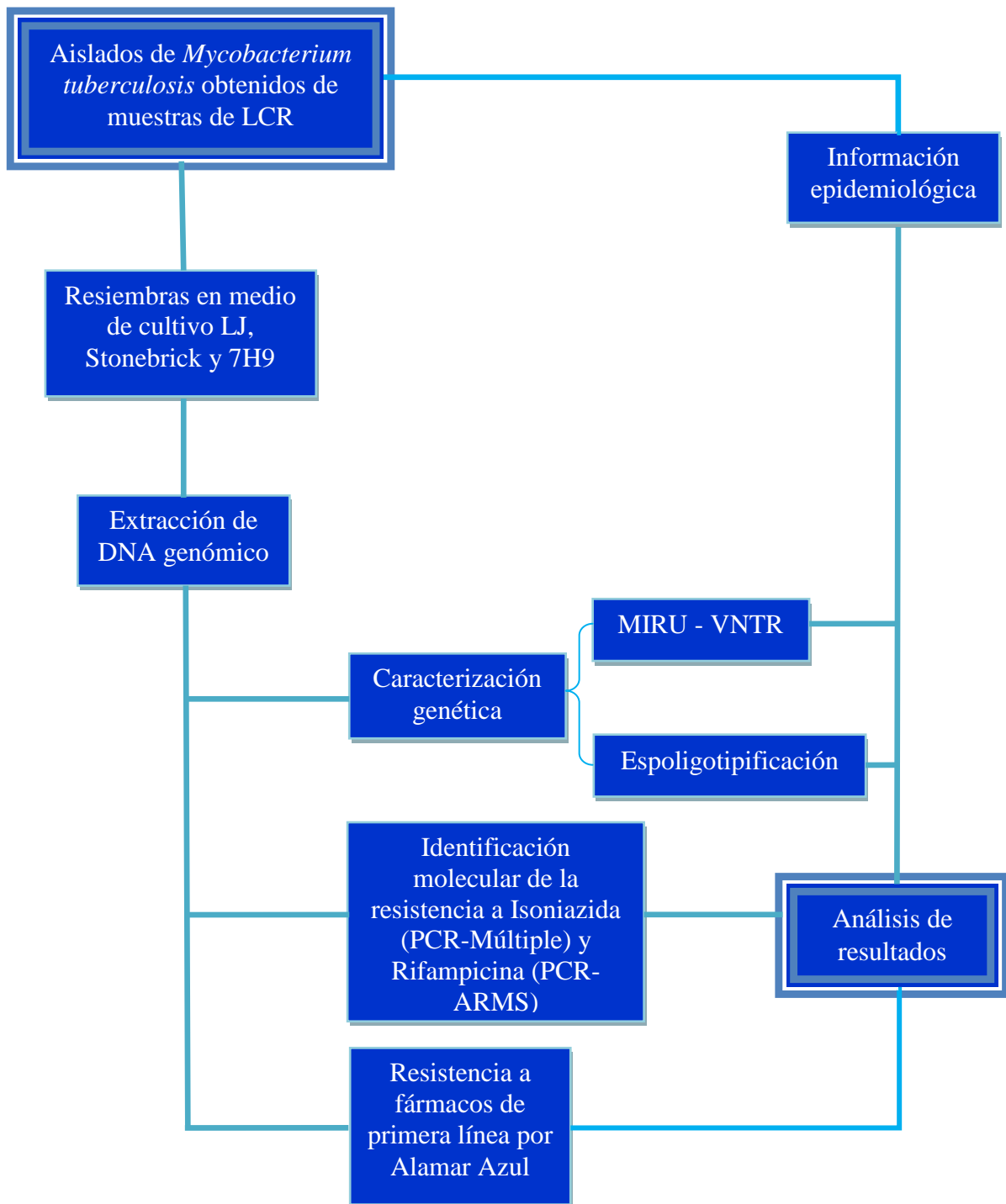


Figura 17 . Esquema general de trabajo.

3. Extracción de DNA

A partir de las cepas aisladas en medio LJ, se tomaron varias colonias y se resuspendieron en 400 μ L de amortiguador TE (10 mM, trisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA). La suspensión fue calentada a ebullición por 15 min y posterior congelación de 15 min; este proceso se repitió 2 veces más. Se sometieron a centrifugación y se recuperó el sobrenadante, que fue utilizado para llevar a cabo las metodologías.

4. Caracterización mediante la técnica de VNTR – MIRU

El ensayo se determinó conforme a lo descrito por Supply y col. ^[42]. Cada reacción se realizó a un volumen final de 26 μ L, se hicieron tres mezclas diferentes (M1, M2 y M3); colocando 10 μ L de DNA (obtenido previamente), 1 μ L de cada uno de los dos iniciadores y 8 μ L de Hot Start Taq Master Mix (2.5 unidades de Hot Start Taq DNA polimerase, amortiguador Taq 1 X, 200 μ M de dNTPs; Qiagen, CA, USA), fueron agregados para la mezcla 1 y 2, 0.64 y 1.28 μ L de MgCl₂ respectivamente; finalmente se agregó la cantidad de agua necesaria para completar el volumen final.

A las doce mezclas de cada una de las cepas aisladas se les realizó PCR. Las condiciones de PCR empleadas fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 15 min, después 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 50 s, alineación 58 °C por 50 s, y extensión a 72 °C por 50 s; una extensión final a 72 °C por 7 min, realizada al final de estos ciclos.

A lo obtenido del PCR, se realizó un gel de agarosa al 2 % (Agarose Molecular Biology Grade ONBIO Inc. ON Canadá) con bromuro de etidio, se corrió a 80 V durante 40 min; las bandas del DNA fueron visualizadas con un trans iluminador de luz UV, comparándolas con el marcador de peso molecular y asignando así el valor para cada una de acuerdo al tamaño del fragmento.

El valor obtenido para cada una de las bandas corresponde al número de copias, para el MIRU. Ver Tabla [11].

Tabla 11 . Asignación de código numérico de acuerdo al número de copias encontradas en cada locus de *M. tuberculosis*.

No. copias	MIRU											
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40
0	402	175	482	565	437	150	395	285	498	492	540	354
1	455	252	537	618	514	200	447	336	551	545	593	408
2	508	329	590	671	591	253	501	387	604	598	646	462
3	561	406	643	724	668	306	555	438	657	651	699	516
4	614	483	696	777	745	359	609	489	710	704	752	570
5	667	560	749	830	822	412	663	540	763	757	805	624
6	720	637	802	883	899	465	717	591	816	810	858	678
7	773	714	855	936	976	518	771	642	869	863	911	732
8	826	791	908	989	1023	571	825	693	922	916	964	786
9	879	868	961	1042	1130	624	879	744	975	969	1017	840
10	932	945	1014	1095	1207	677	933	795	1028	1022	1070	894
11	985	1022	1067	1148	1284	730	987	846	1081	1075	1123	948
12	1038	1099	1120	1201	1361	783	1041	897	1134	1128	1176	1002
13	1091	1176	1173	1254	1438	836	1095	948	1187	1181	1229	1056
14	1144	1253	1226	1307	1515	889	1149	999	1240	1234	1282	1110
15	1197	1330	1279	1360	1592	942	1203	1050	1293	1287	1335	1164

El número asignado fue analizado en la base de datos VNTR-MIRU plus (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>), obteniéndose así el código de identificación de cada una de las cepas.

5. Caracterización mediante la técnica de Espoligotipificación

El ensayo se realizó a un volumen final de 40 μ L, colocando 10 μ L de DNA (obtenido previamente), 3 μ L de cada uno de los dos iniciadores (DRa-biotina y DRb) y 20 μ L de Hot Start Taq Master Mix (2.5 unidades de Hot Start Taq DNA polimerase, amoritguador Taq 1 X, 200 μ M de dNTPs; Qiagen, CA, USA); finalmente se agregó la cantidad de agua necesaria para completar el volumen final.

A la mezcla de cada una de las cepas aisladas se les realizó PCR. Las condiciones de PCR empleadas fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 15 min, después 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 50 s, alineación 58 °C por 50 s, y extensión

a 72 °C por 50s; una extensión final a 72 °C por 7 min, realizada al final de estos ciclos.

A la amplificación del DNA obtenida de la PCR se le agregaron 150 µL de amortiguador 2xSSPE/0.1%SDS y se desnaturalizó por 10 min a 99 °C e inmediatamente se colocó en hielo. Se preparó la membrana realizando un lavado de 5 min a 60 °C en 250 mL de amortiguador 2xSSPE/0.1%SDS, transcurrido el tiempo se colocó la membrana en el miniblottedter y se retiró el exceso de líquido por aspiración; con la membrana limpia y libre de líquido se colocan cada una de las muestras previamente diluidas y desnaturalizadas, evitando la formación de burbujas; hibridar por 60 min a 60 °C de manera horizontal y sin agitar. Retirar las muestras de la membrana por aspiración y quitar la membrana del miniblottedter, se realizaron dos lavados a la membrana con 2xSSPE/0.1%SDS por 10 min a 60 °C. Se colocó la membrana en una botella de hibridación y se agregó 2.5 µL de estreptavidina-peroxidasa diluidas en 10 mL de 2xSSPE/0.5%SDS, se incubó la membrana en esta solución por 60 minutos a 42 °C. Lavar la membrana dos veces en 250mL 2xSSPE/0.1%SDS a 42 °C durante 10 minutos con agitación suave. Enjuagar dos veces la membrana con 250 mL de 2xSSPE a temperatura ambiente por 5 min con agitación suave.

Para llevar a cabo la detección de la señal se colocaron en un recipiente 10 mL de reactivo de detección A^{MR} y 10 mL de reactivo de detección B^{MR} ("ECL, Amersham kit"), se mezclaron durante 2 min y se pusieron en contacto con la membrana durante 2 min. Se retiró el exceso y la membrana se colocó en el casete, se cubrió con una placa fotográfica y se expuso durante 60 min, finalmente se llevó a cabo el revelado de la placa. La membrana puede ser regenerada y reutilizada.

Tabla 12. Iniciadores para Espoligotipificación.

Iniciador	Secuencia 5'→3'
DRa	CCGAGA GGG GAC GGA AAA
DRb	GGT TTT GGG TCT GAC GAC

6. Caracterización de la resistencia a Isoniazida mediante la técnica de PCR – Múltiple.

El ensayo se realizó a un volumen final de 30 μL ; colocando 10 μL de DNA (obtenido previamente), 1 μL de cada uno de los tres iniciadores y 0.15 μL de la Taq polimerasa, 1 μL de MgCl_2 , 2 μL de amortiguador y 1.5 μL de dNTPs; finalmente se agregó la cantidad de agua destilada necesaria para completar el volumen final.

A las mezclas de cada una de las cepas aisladas se le realizó PCR. Las condiciones de PCR empleadas fueron: desnaturalización inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 3 min, después 30 ciclos de desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ por 60 s, alineación 60 $^{\circ}\text{C}$ por 60 s, y extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 60 s; una extensión final a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 7 min, realizada al final de estos ciclos.

A la amplificación obtenida del PCR, se le realizó un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio, se corrió a 80 V durante 40 min; las bandas del DNA fueron visualizadas con un trans iluminador de luz UV, se debe observar la presencia de tres bandas características a la resistencia a H; la banda que se encuentra a 146 pb indica la mutación en el gen *mabA-inhA*; la banda de 296 pb corresponde a la mutación en el gen *katG* y finalmente la banda ubicada en 1020 pb es el control de reacción.

Tabla 13 . Iniciadores utilizados para detectar resistencia a Isoniazida por medio de PCR-Múltiple.

Gen Blanco	Sentido (5' → 3')	Contrasentido (3' → 5')	Tamaño del fragmento (pb)
<i>gyrB</i>	MTUBf TCGGACGCGTATGCGATATC	MTUBr ACATACAGTTCGGACTTGCG	1020
<i>katG</i>	KatgOF GCAGATGGGGCTGATCTACG	R315mut TCCATACGACCTCGATGCCAG	296
<i>mabA – inhA</i>	MabAF CGAAGTGTGCTGAGTCACACCG	inhaRmut AGTCACCCCGACAACCTATTA	146

7. Caracterización de la resistencia a Rifampicina mediante la técnica de PCR-ARMS

El ensayo se realizó a un volumen final de 30 μL ; colocando 10 μL de DNA (obtenido previamente), 2 μL del iniciador (A, B o C; según sea el caso) y 2 μL del iniciador control y 0.15 μL de la Taq polimerasa, 1 μL de MgCl_2 , 3 μL de amortiguador y 1.5 μL de dNTPs; finalmente se agregó la cantidad de agua

destilada necesaria para completar el volumen final. Para cada una de las muestras se realizaron tres mezclas que contenían un iniciador (A, B, C; ver tabla [17]) y el control.

A las mezclas de cada una de las cepas aisladas se le realizó PCR. Las condiciones de PCR empleadas fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, después 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineación 68 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 45 s; una extensión final a 72 °C por 10 min, realizada al final de estos ciclos.

A lo obtenido del PCR, se realizó un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio, se corrió a 80 V durante 40 min; las bandas del DNA fueron visualizadas con un trans iluminador de luz UV, se debe observar la presencia de dos bandas características una debida a la resistencia a R y la otra banda debida al control; la banda que se encuentra a 537 pb indica el control de reacción y la mutación en el gen *rpoB* correspondiente a los codones 516, 526 y 531 están ubicadas en distintas bandas.

Tabla 14 . Iniciadores para detectar resistencia a Rifampicina.

	Sentido (5' → 3')	Contrasentido (3' → 5')	Tamaño del fragmento (pb)
Control	CGAATATCTGGTCCGCTTGC	GTCGACCACCTTGCGGTACG	537
Iniciador codón 516 (A)	CAGCTGAGCCAATTCACGGA	GTCGACCACCTTGCGGTACG	261
Iniciador codón 526 (B)	CGCTGTGCGGGGTGGTCCC	GTCGACCACCTTGCGGTACG	230
Iniciador codón 531 (C)	ACCCACAAGCGCCGACAGTC	GTCGACCACCTTGCGGTACG	216

8. Caracterización de la resistencia a fármacos de primera línea mediante la técnica de microensayo colorimétrico de Alamar Azul.

Solución Stock de los fármacos: Para realizar el ensayo se utilizaron fármacos de primera línea: S, H, R, E. Se trabajó con sales puras de todos los fármacos (Sigma-Aldrich, Abbott & Abbott ®). Se pesó 1 mg de cada uno de los fármacos y se disolvieron en 1 mL de agua destilada (H, E y S), mientras que la rifampicina se disolvió en 1 mL de dimetilsulfoxido (DMSO); se obtuvo una concentración final de 1mg/mL. Las soluciones Stock se esterilizaron por filtración utilizando membranas 0.20 µm (CORNING ®); y se almacenaron en congelación. A partir de las soluciones Stock se prepararon las soluciones de trabajo que eran 4 veces (4X)

más concentradas que la concentración máxima a probar. Una vez descongeladas las soluciones Stock sobrantes fueron eliminadas.

Tabla 15 . Concentraciones de fármacos empleados ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Estreptomina	Isoniazida	Rifampicina	Etambutol
16*	2*	4*	64*
8	1	2	32
4	0.5	1	16
2	0.25	0.5	8
1	0.125	0.25	4
0.5	0.0625	0.125	2
0.25	0.03125	0.0625	1

*Concentración 4X de cada uno de los fármacos empleados.

Preparación de Azul Alamar (Resazurina) (Sigma ®): Solución estándar al 0.014% en agua destilada estéril, se filtró y se conservó a 4 °C protegida de la luz.

Medio de cultivo Middlebrook 7H9 (Difco™ Becton, Dickinson and Company ® USA): Se preparó de acuerdo a las instrucciones del marbete. Se pesaron 4.7 g del polvo y se disolvieron en 900 mL de agua destilada, se le añadieron 5 mL de glicerol. Se esterilizó a 120 °C por 10 minutos. Se agregó asépticamente 100 mL de enriquecimiento Middlebrook ADC (Becton&Dickinson ®) cuando se enfrió.

Preparación de Tween 80 (Sigma ®) al 20%: Para 100 mL, se colocaron 20 mL de Tween 80 y se aforó a un volumen de 100 mL con agua destilada, se agitó hasta disolverse y se esterilizó a 121 – 124 °C por 15 minutos, y homogenizó antes de que se enfrió.

Preparación del inóculo: A partir de un tubo de Löwenstein-Jensen, se realizó una dilución para obtener el tubo 1 de la serie McFarland; para inocular la microplaca se realizaron diluciones 1:100 y 1:10 a partir del tubo 1 de McFarland.

Montaje de la microplaca: En una microplaca de 96 pozos (CORNING ®), se colocó un volumen de 200 μL agua destilada en la fila A en los 12 pozos. De la fila B a la G se colocaron 100 μL de medio 7H9 con una pipeta multicanal. En la fila B se colocó 100 μL de la solución 4X de cada fármaco, se mezcló y se realizaron diluciones seriadas 1:2 y los últimos 100 μL se desecharon. Finalmente en cada uno

de los pozos se inoculó con la cepa. Se selló la microplaca y se colocó dentro de una bolsa de plástico, se incubó a 37 °C durante 5 días.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	C	C	1:10	1:10	1:10	1:100	1:100	1:100	M	M	M
B	Agua	S 8	H 1	R 2	E 32	Agua	Agua	S 8	H 1	R 2	E 32	Agua
C	Agua	4	0.5	1	16	Agua	Agua	4	0.5	1	16	Agua
D	Agua	2	0.25	0.5	8	Agua	Agua	2	0.25	0.5	8	Agua
E	Agua	1	0.125	0.25	4	Agua	Agua	1	0.125	0.25	4	Agua
F	Agua	0.5	0.0625	0.125	2	Agua	Agua	0.5	0.0625	0.125	2	Agua
G	Agua	0.25	0.0312	0.0625	1	Agua	Agua	0.25	0.0312	0.0625	1	Agua
H	C	C	C	1:10	1:10	1:10	1:100	1:100	1:100	M	M	M

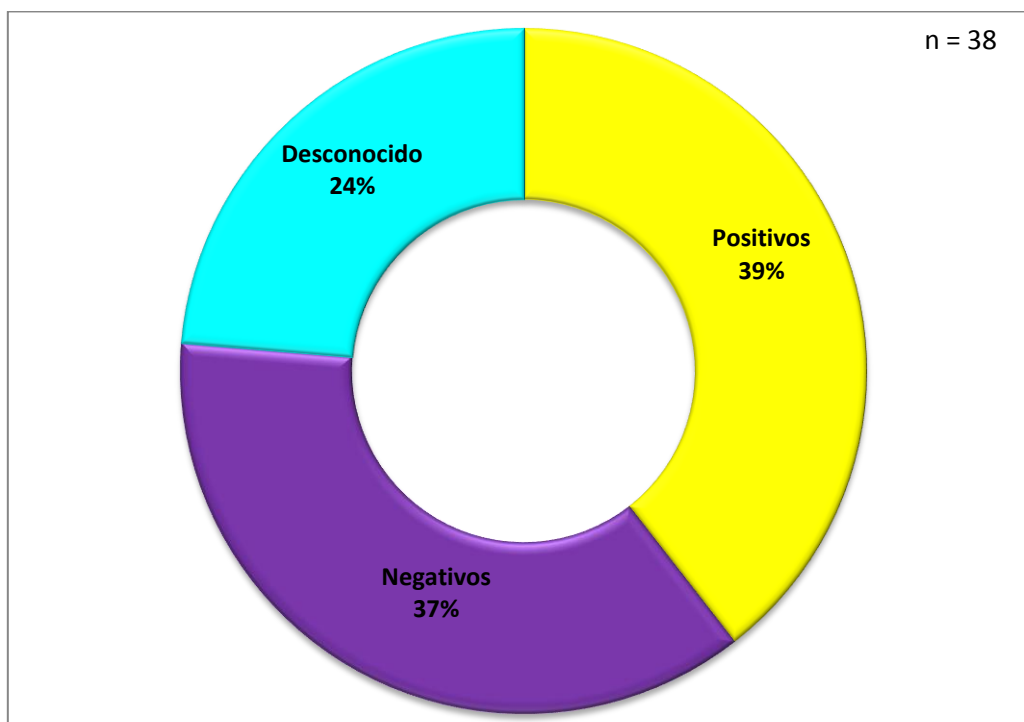
Figura 18 . Diseño de microplaca de 96 pozos para la técnica de Alamar Azul; antibiograma para *M. tuberculosis*. Fila A: Controles de crecimiento de cepa (C), controles de dilución al 10 % (1:10) y al 1 % (1:100), control de medio (M) para la cepa 1. Filas B – G: diluciones seriadas 1:2 de fármacos por columna, partiendo de las concentraciones superiores ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en la Fila B; columnas B2 - B5 corresponden a la cepa 1 y columnas B8 - B11 corresponden a la cepa 2. Fila H: Controles de crecimiento de cepa (C), controles de dilución al 10 % (1:10) y al 1 % (1:100), control de medio (M) para la cepa 2.

Revelado de la microplaca: Se agregó a cada uno de los pozos 32 μL de solución reveladora preparada con 20 μL de RES al 0.014 % y 12 μL de Tween 80 al 20 %; se mezcló y se envolvió para protegerlo de la luz y se incubó 24 h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se observó el vire de color de azul a rosa, lo que indica la resistencia al fármaco.

RESULTADOS

Del periodo de Enero 2007 a Junio 2012, se obtuvieron 70 muestras clínicas de LCR, provenientes de pacientes con diagnóstico presuntivo de TBM, aquellos aislados que no fueron incluidos se debió a razones principalmente de poco o nulo crecimiento. Finalmente todas las metodologías se realizaron con 40 cepas de las cuales, cuatro pertenecían a dos pacientes (cepas CI29-CI30 y CI32-CI34), por lo que el número final a considerar para llevar a cabo el análisis de los resultados es de 38 cepas, todas identificadas como pertenecientes al CMT.

De las muestras analizadas se encontró que la edad de los pacientes estuvo comprendida entre los 18 y los 58 años; con un promedio de 36 años aproximadamente. El 74 % de los pacientes correspondieron al sexo masculino y el 26 % al sexo femenino, con una relación de 3:1. El 39 % los aislados correspondían a pacientes VIH positivos, y el 37 % a pacientes negativos y del 24 % no se contaba con información al respecto.



Gráfica 4 . Distribución de aislados de CMT de pacientes infectados con VIH.

Tabla 16 . Datos generales de los pacientes de los cuales se aislaron las cepas de *M. tuberculosis*.

Cepa	Genero	VIH	Edad (años)
CI01	M	+	37
CI02	M	-	50
CI03	F	+	30
CI04	M	-	54
CI05	M	-	38
CI06	F	-	18
CI07	M	-	23
CI08	M	SD	34
CI09	M	+	44
CI10	M	+	29
CI11	M	-	34
CI12	M	+	32
CI13	M	SD	SD
CI14	F	-	25
CI15	M	+	26
CI16	M	SD	SD
CI17	M	SD	SD
CI18	M	-	31
CI19	M	-	24
CI20	F	+	30
CI21	M	-	34
CI22	M	+	27
CI23	F	SD	SD
CI24	M	+	52
CI25	F	-	58
CI26	M	+	33
CI27	M	SD	34
CI28	M	-	43
CI29-30	F	-	31
CI31	M	+	32
CI32-34	M	+	49
CI33	M	+	42
CI35	M	+	27
CI36	F	-	44
CI37	M	+	43
CI38	M	SD	30
CI39	F	SD	32
CI40	F	SD	40

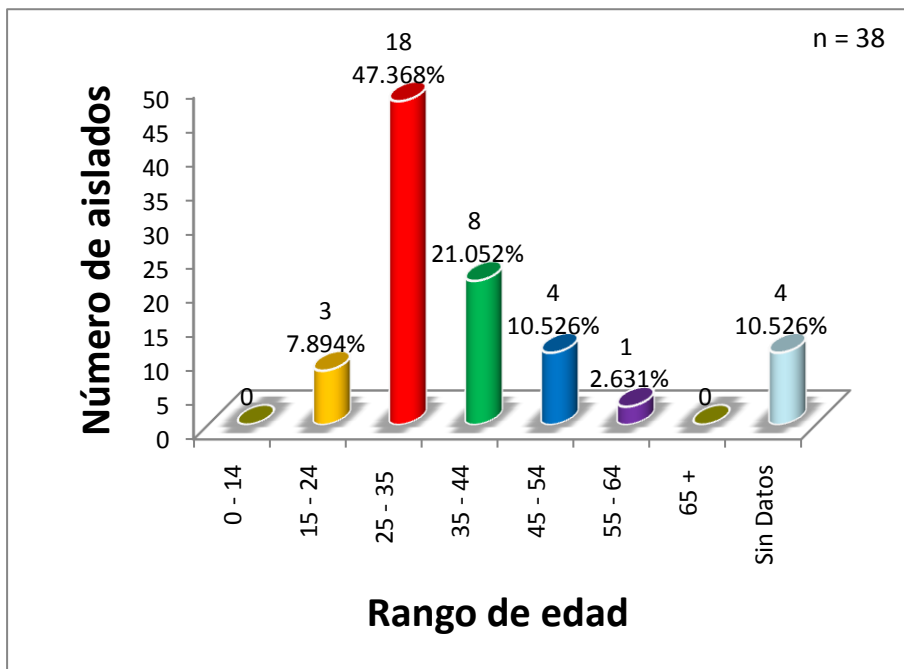


Gráfico 5 . Distribución de aislados de CMT, por grupos de edad de los pacientes.

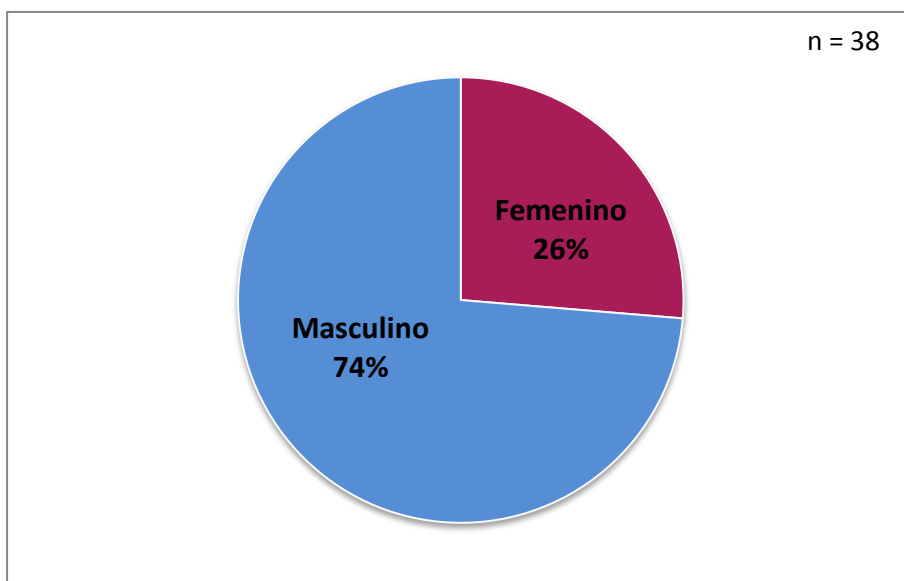


Gráfico 6 . Distribución de aislados de CMT por género de los pacientes.

F: femenino, M: Masculino, SD: Sin datos.

Datos epidemiológicos y fenotípicos de pacientes diagnosticados con TBM que fallecieron en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".

Tabla 17 . Datos epidemiológicos de pacientes fallecidos.

Cepa	Género	VIH	Fenotipo
CI01	M	+	MDR
CI06	F	-	MDR
CI07	M	-	MDR
CI12	M	+	SHE
CI21	M	-	ND
CI24	M	+	PS
CI26	M	+	PS
CI28	M	-	MDR
CI32	M	+	E

MDR: Multidrogorresistentes; PS:Pansensible; H: Isoniazida; E: Etambutol; R: Rifampicina; ND: No Determinado.

1. Genotipificación de las cepas de *M. tuberculosis*

1.1. Caracterización mediante la técnica de VNTR – MIRU

Se realizó el VNTR-MIRU de 12 loci para las 40 cepas de CMT aisladas de muestras de LCR. En la Figura [19] se muestra el patrón completo de VNTR-MIRU para la cepa CI40; en las Figuras [20] y [21], se muestra el patrón VNTR-MIRU correspondiente de distintas cepas. En estos ejemplos representativos de algunas cepas se puede apreciar la variabilidad de copias de los diferentes MIRU que se obtuvieron en el presente trabajo.

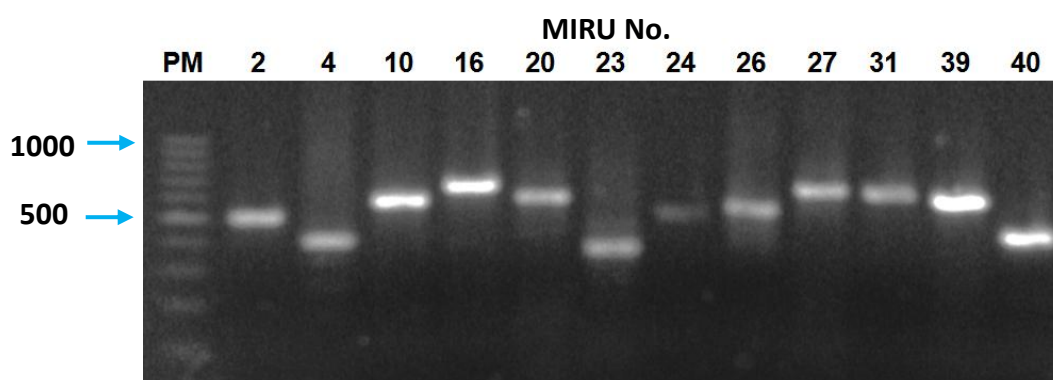


Figura 19 . Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci de la cepa CI40.

Se observa por ejemplo en la Figura [21] carril 10, correspondiente a la cepa CI08, que varía el número de copias del MIRU 4, en comparación con el MIRU 2 que presenta el mismo número de copias que se encuentran en los carriles 2 a 6, para cada una de las cepas.

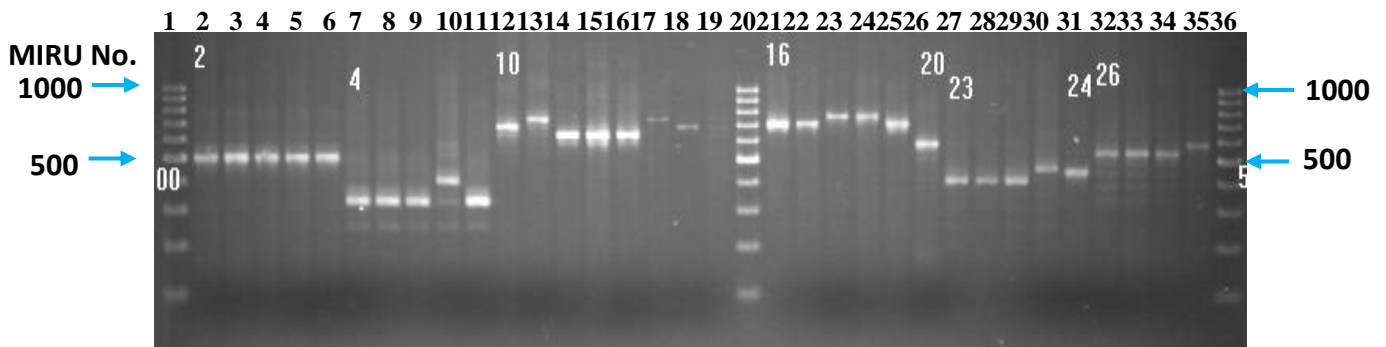


Figura 20 . Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1,20 y 36 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 6, **MIRU 2** cepas CI05, CI06, CI07, CI08, CI09. Carriles 7 – 11, **MIRU 4** cepas CI05, CI06, CI07, CI08, CI09. Carriles 12 – 19, **MIRU 10** cepas CI05, CI06, CI07, CI08, CI09, CI13, CI16, CI21. Carriles 21 – 25, **MIRU 16** cepas CI05, CI06, CI07, CI08, CI09. Carril 26 **MIRU 20** cepa CI08. Carriles 27 – 30, **MIRU 23** cepas CI05, CI06, CI07, CI08. Carril 31, **MIRU 24** cepa CI08. Carriles 32 – 35, **MIRU 26** cepas CI05, CI06, CI07, CI08.

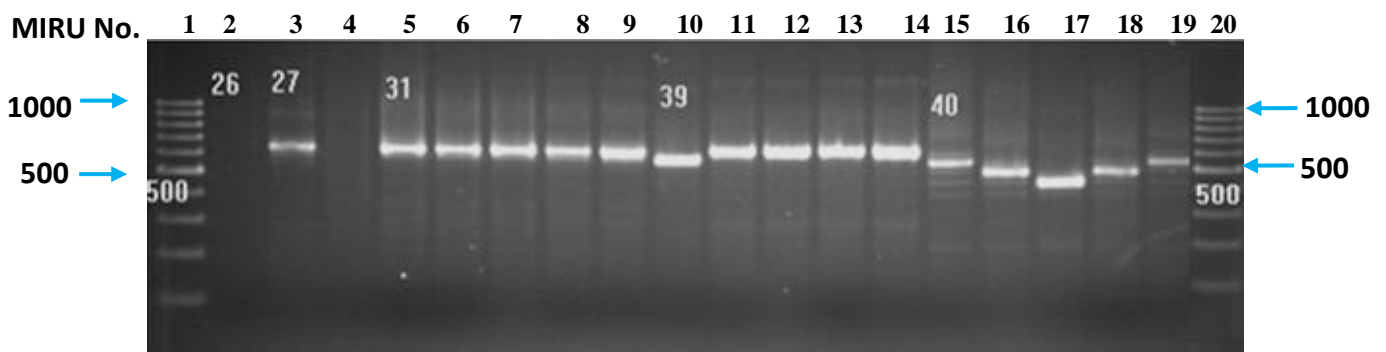


Figura 21 . Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci. Carriles 1 y 20 PM. Carril 2, **MIRU 26** cepa CI09. Carriles 3 y 4, **MIRU 27** cepas CI07 y CI08. Carriles 5 – 9, **MIRU 31** cepas CI05, CI06, CI07, CI08, CI09. Carriles 10- 14, **MIRU 39** cepas CI05, CI06, CI07, CI08, CI09. Carriles 15 – 19, **MIRU 40** cepa CI05, CI06, CI07, CI08, CI09.

Una vez amplificados y separados los productos de PCR de cada uno de los 12 loci, se procedió a calcular el tamaño de cada una de las bandas obtenidas, a partir del tamaño de la banda se comparó con los valores de la Tabla [11] (material y métodos; pág. 45); la cual señala la relación entre el tamaño de la banda con el número de copias correspondiente de cada MIRU. Así se encontraron los códigos MIRU de cada una de las cepas. Ver Figura [22].

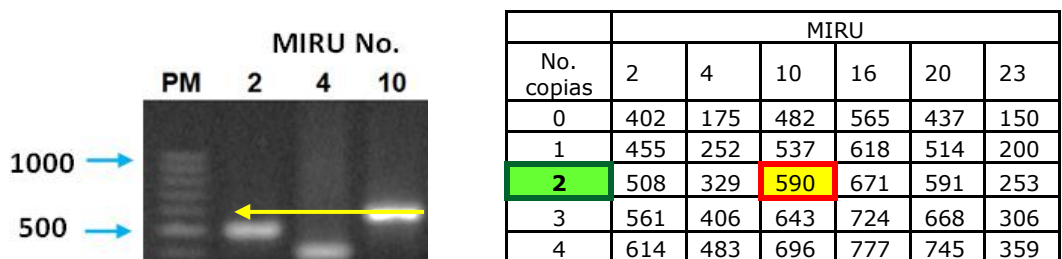


Figura 22 . Obtención código MIRU. Por ejemplo, en la cepa 40 en el carril 4 correspondiente al MIRU 10, la banda tiene un tamaño aproximado de 600 pb, por lo que al buscar tal valor en la tabla el más cercano a éste es el de 590, tomando este como valor, el número de copias que corresponde es 2; así se hace para cada banda de cada una de las cepas obteniéndose al final el código MIRU.

El código VNTR-MIRU de todas las cepas de CMT se encuentra resumido en la Tabla [18], donde también se muestra su patrón de susceptibilidad (de acuerdo a AA). En esta Tabla se señala que hay cepas con un patrón de código VNTR-MIRU idéntico. En las cepas con un patrón idéntico se encontró diferencia en su patrón de susceptibilidad.

Tabla 18 . VNTR-MIRU de 12 loci de los aislados de *M. tuberculosis* y patrón de susceptibilidad acorde a Alamar Azul.

Cepa	Código MIRU												Patrón de susceptibilidad				Fenotipo
	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40	S	H	R	E	
CI01	2	3	4	3	2	5	1	5	4	2	2	3	R	R	R	R	MDR
CI02	2	3	3	3	2	5	1	5	3	3	2	3	S	R	S	S	H
CI03	2	3	3	2	2	5	1	5	3	2	2	5	S	R	S	S	H
CI04	2	3	3	1	2	6	1	5	3	2	2	5	R	R	R	R	MDR
CI05	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	1	4	S	S	S	S	PS
CI06	2	2	5	3	2	5	1	5	3	3	2	3	R	R	R	R	MDR
CI07	2	2	3	4	2	5	1	5	3	3	2	2	R	R	R	R	MDR
CI08	2	3	3	4	2	6	1	6	2	3	2	3	R	R	S	R	MDR
CI09	2	2	3	3	2	5	1	4	3	3	2	4	R	R	R	R	MDR
CI10	3	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	3	R	R	R	R	MDR
CI11	2	2	5	2	2	6	1	6	3	2	2	1	S	S	S	R	E
CI12	2	2	6	5	2	5	1	5	3	3	2	3	R	R	S	R	SHE
CI13	2	2	5	5	2	5	1	5	3	3	2	3	R	R	S	R	SHE
CI14	2	2	3	2	2	5	1	4	3	4	2	1	S	S	S	S	PS
CI15	2	2	5	3	2	5	1	3	3	3	2	3	R	S	R	R	SER
CI16	2	2	5	6	3	5	1	5	3	4	2	5	R	R	S	R	SHE
CI17	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	2	1	R	R	S	R	SHE
CI18	2	2	4	3	2	6	1	5	3	3	2	2	R	R	R	R	MDR
CI19	3	2	4	4	2	6	1	5	1	3	2	1	R	R	R	R	MDR
CI20	2	2	5	4	2	5	1	5	2	3	2	3	R	R	R	R	MDR
CI21	3	2	3	5	1	3	1	5	3	3	2	3	ND	ND	ND	ND	ND
CI22	2	3	3	1	2	5	1	4	3	2	2	5	S	S	S	S	PS
CI23	3	3	3	2	2	5	1	4	3	2	2	3	R	R	R	R	MDR
CI24	4	4	3	1	2	5	1	5	3	1	1	3	S	S	S	S	PS
CI25	3	3	4	3	2	5	1	5	2	2	2	3	R	R	S	R	SHE
CI26	3	2	5	3	1	3	1	5	3	3	3	3	S	S	S	S	PS
CI27	2	1	4	1	2	6	1	6	3	3	2	1	S	S	S	S	PS
CI28	2	1	4	3	2	5	1	5	3	3	2	4	R	R	R	R	MDR
CI29-30	2	1	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	R	R	S	R	SHE
CI31	2	2	2	3	2	4	2	5	3	3	2	3	S	S	S	R	E
CI32-34	2	2	2	1	2	4	2	5	3	3	2	3	S	S	S	R	E
CI33	2	2	2	1	2	4	2	6	3	3	2	3	S	S	S	R	E
CI35	2	2	2	1	2	4	2	5	3	3	2	3	S	S	S	S	PS
CI36	2	2	2	1	2	4	2	5	3	3	2	3	S	S	S	S	PS
CI37	2	2	2	1	2	4	1	5	3	3	2	3	ND	ND	ND	ND	ND
CI38	2	2	2	1	2	4	1	5	3	3	2	3	S	S	S	S	PS
CI39	2	8	3	2	1	6	2	4	0	2	3	4	R	R	R	R	MDR
CI40	2	3	2	3	2	5	2	4	2	2	2	2	ND	ND	ND	ND	ND

MDR: Multidrogresistentes; PS:Pansensible; H: Isoniazida; E: Etambutol; R: Rifampicina; ND: No Determinado.

En la Figura [24] se observa el análisis filogenético de los diferentes aislado de *M. tuberculosis*. Para este análisis se utilizó el patrón de espigotipificación y el código VNTR – MIRU.

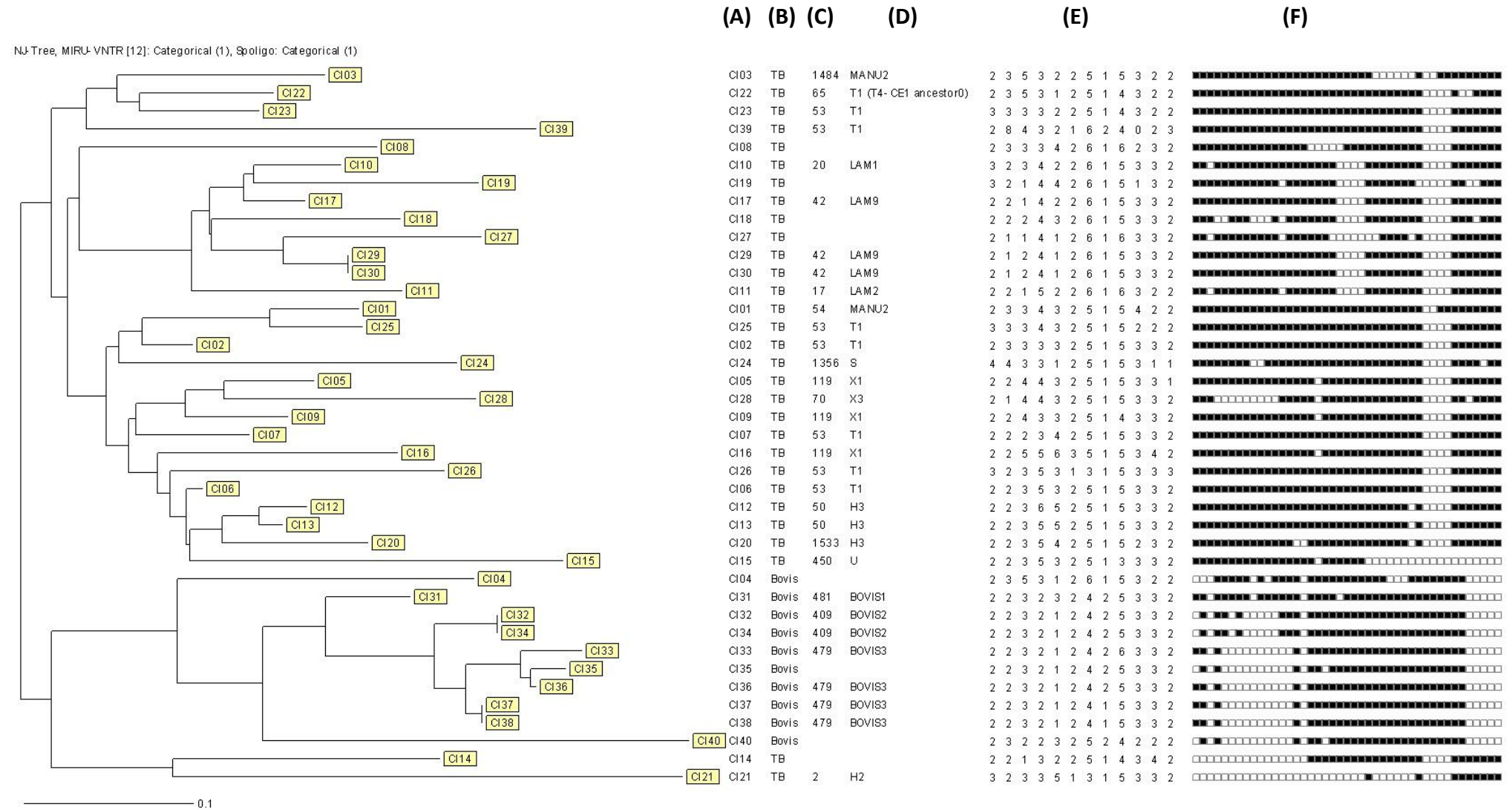


Figura 24 . Análisis filogenético de los aislados de *M. tuberculosis*. **(A)** Número de cepa, **(B)** Linaje/Clade, **(C)** SIT, **(D)** Grupo de espigotipificación, **(E)** Código MIRU, **(F)** Patrón de espigotipificación.

1.2. Caracterización mediante la técnica de Espoligotipificación

Se obtuvieron los espoligotipos de las 40 cepas del CMT analizadas. La placa fotográfica se muestra en la Figura [25], en la que se observa que cada cuadro indica si el espaciador está presente, es decir, si cada cepa contiene los espaciadores analizados en la prueba (es positiva o negativa para cada espaciador), se observa que un cuadro negro indica la presencia del espaciador, pero si no contienen alguno o varios de ellos, es señal de ausencia del espaciador y las combinaciones de estas señales es lo que genera el espoligotipo característico de cada una de las cepas.

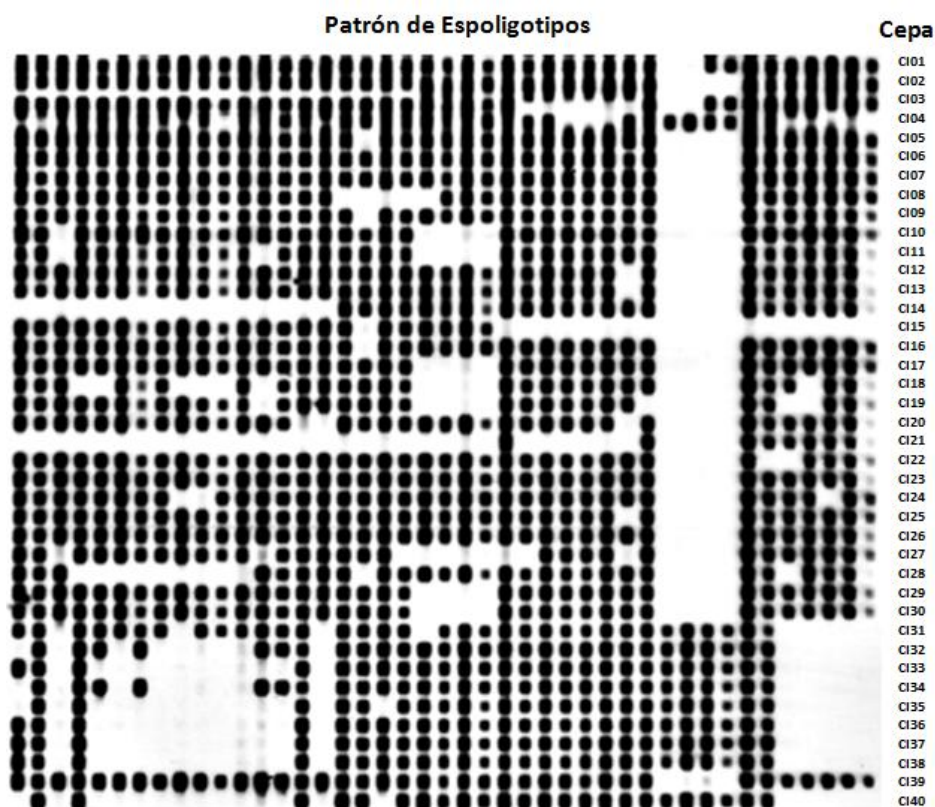


Figura 25 . Placa de espoligotipos cepas CI01-CI40.

Se pueden observar las diferencias de las cepas que son *M. tuberculosis* y *M. bovis* cuya característica principal de esta última es la presencia de los espaciadores 33 - 36 y la carencia de los últimos cinco espaciadores (39 -43). Ver Figura [26]

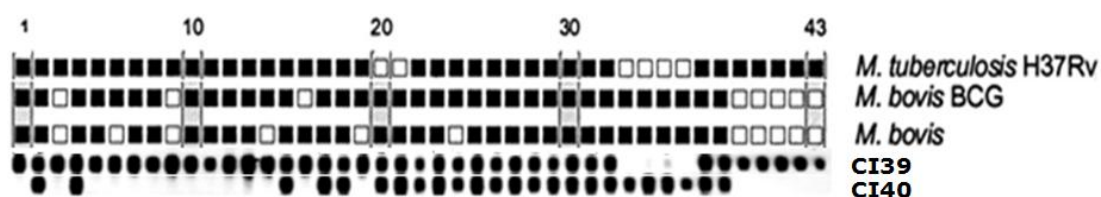


Figura 26 . Comparación de los espoligotipos de las cepas *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

El análisis por espoligotipificación se llevó a cabo en la base de datos del Instituto Pasteur de Francia, y se pudo clasificar cada cepa en 9 grupos principales.

Al ingresar los datos de los espoligotipos como código octal en el programa SITVITWEB disponible en internet (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE) se obtuvieron los siguientes linajes, mostrados en la Figura [27].

Linaje	Especie	SIT	Número de aislados
BOVIS 1	Bovis	481	1
BOVIS 2	Bovis	409	1
BOVIS 3	Bovis	479	4
H 2	TB	2	1
H 3	TB	50 1533	3
LAM 1	TB	20	1
LAM 2	TB	17	1
LAM 9	TB	42	2
MANU 2	TB	54 1484	2
S	TB	1356	1
T 1	TB	53	7
T1(T4-CE1-Ancestor0)	TB	65	1
U	TB	450	1
X 1	TB	119	3
X 3	TB	70	1
ND	TB	Orphan	5
ND	Bovis	Orphan	3

ND: No Determinado

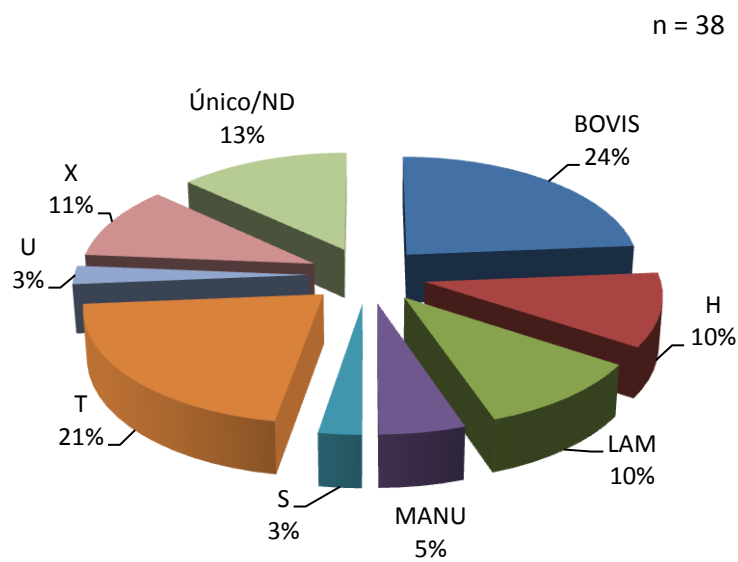


Figura 27 . Diversidad de linaje de aislados CMT.

De acuerdo a la base de datos se encontraron 15 linajes distintos y sólo 8 de las cepas no se logró la identificación del linaje (ND O Único).

2. Identificación de mutaciones relacionadas a la resistencia a Isoniazida y Rifampicina

2.1. Caracterización de la resistencia a Isoniazida mediante la técnica de PCR-Múltiple

Del análisis de las cepas (n=38) se encontró que sólo dos cepas CI20 y CI28 (5.3 %) presentaron la mutación para *mabA-inhA*.

Los resultados de la PCR – Múltiple para las cepas del CMT con fenotipo MDR se encuentran resumidos en la Tabla [19]. Todos los aislados pansensibles (PS) mostraron una concordancia con las pruebas moleculares para detectar resistencia

a H, es decir, ninguno mostró mutación en los genes correspondientes (datos no mostrados).

Tabla 19 . Detección de mutaciones para la resistencia a isoniazida en cepas de *M. tuberculosis* MDR.

Cepa	Fenotipo	PCR-Múltiple	
		<i>katG</i>	<i>mabA-inhA</i>
CI01	MDR	-	-
CI04	MDR	-	-
CI06	MDR	-	-
CI07	MDR	-	-
CI09	MDR	-	-
CI10	MDR	-	-
CI18	MDR	-	-
CI19	MDR	-	-
CI20	MDR	-	+
CI23	MDR	-	-
CI28	MDR	-	+
CI39	MDR	-	-

MDR: Multidrogorresistentes.

En la Figura [28] se muestran los resultados de algunas cepas del CMT analizadas por PCR-Múltiple para detectar mutaciones en el codón 315 del gen *katG* y en la región promotora del operon *mabA-inhA*. Se puede observar que la cepa CI20 que corresponde al carril 4, presenta la banda de 146 pb correspondiente a la mutación *mabA-inhA*. En el resto de los aislados se observa solo la amplificación de una banda de 1020 pb que corresponde a un fragmento del gen *gyrB* (control de la PCR). Ninguna de las cepas aisladas presentó la mutación en el codón 315 del gen *katG*.

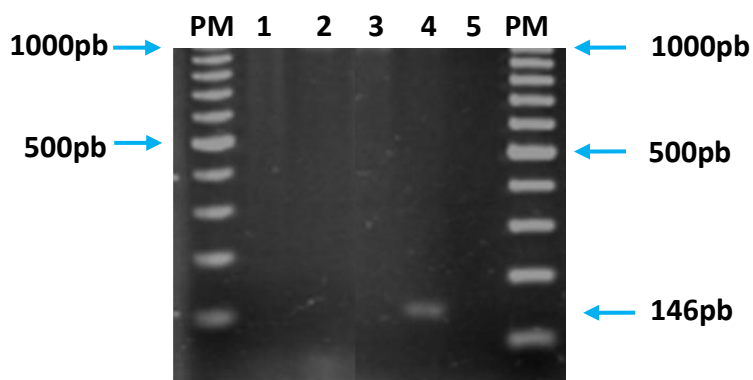


Figura 28 . Electroferograma de la PCR-Múltiple para la detección de mutaciones en los genes *katG* y *mabA-inhA* de muestras del CMT. Marcador de Peso Molecular (PM); carriles 1-3 y 5, cepas sin mutación *katG* y *mabA-inhA*; carril 4 cepa CI20 con mutación en *mabA-inhA*.

2.2. Caracterización de la resistencia a Rifampicina mediante la técnica de PCR-ARMS

Los resultados de las PCR alelo específico (ARMS) muestran que del total de las cepas analizadas (n=38), sólo 3 resultaron positivas para algunas de las mutaciones (8 % de los casos).

Estas tres cepas con fenotipo MDR del CMT presentaron una mutación en los codones 526 o 531 del gen *rpoB*. Mientras que las cepas Pansensibles no presentaron ninguna de las mutaciones que confieren resistencia a R. (datos no mostrados). En el resumen de los resultados de detección molecular para los tres codones del gen *rpoB* se muestran en la Tabla [20].

Tabla 20 . Detección de mutaciones para la resistencia a Rifampicina de cepas de *M. tuberculosis* MDR.

Cepa	Fenotipo	PCR-ARMS		
		516	526	531
CI01	MDR	-	+	-
CI04	MDR	-	-	-
CI06	MDR	-	-	-
CI07	MDR	-	-	-
CI09	MDR	-	-	-
CI10	MDR	-	-	-
CI18	MDR	-	-	-
CI19	MDR	-	-	+
CI20	MDR	-	+	-
CI23	MDR	-	-	-
CI28	MDR	-	-	-
CI39	MDR	-	-	-

MDR: Multidrogosresistentes

En las Figuras [29] y [30] se muestra el perfil de bandas en el estudio para detectar las mutaciones en los codones 516, 526 y 531 del gen *rpo B*.

En el caso positivo para la mutación se observa la ausencia de las banda de 230 pb que corresponden al codón 526, lo que indica la presencia de un cambio de base, ver Figura [26] carriles 16 y 17 (cepa CI01); se observó la banda del control interno (537 pb), lo que garantizó que no se tratan de falsos negativos por fallas en el PCR o deficiencias de DNA.

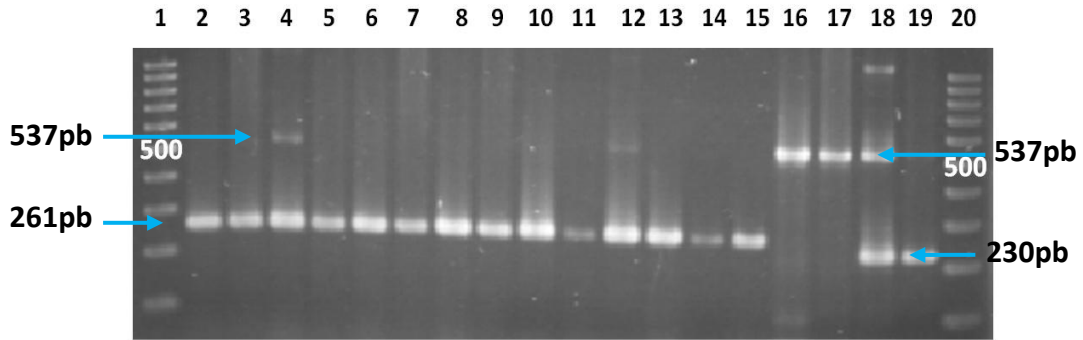


Figura 29 . Electroferograma de PCR-ARMS para el codón 516 y 526 del gen *rpoB*. Carriles 1 y 20 PM. Carriles 2 - 15, codón 516 cepas CI01, CI03, CI06, CI07, CI10, CI15, CI40 y H37Rv. Carriles 16 - 19, codón 526 cepas CI01 y CI03.

En la Figura [30] se muestra que en el perfil de bandas obtenidas se observó la presencia de la banda de 261 pb en todas las cepas analizadas, esta banda corresponde al codón normal, lo que indica ausencia de la mutación en el codón 516, también se observó la banda del control interno (537 pb).

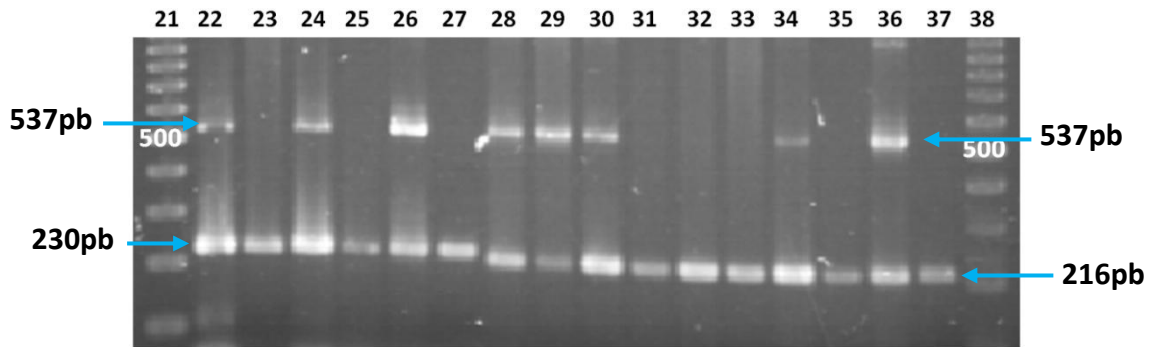


Figura 30 . Electroferograma de PCR-ARMS para el codón 526 y 531 del gen *rpoB*. Carriles 21 y 38 PM. Carriles 22 - 27, **codón 526** cepas CI06, CI10, CI15 y H37Rv. Carriles 28 - 37, **codón 531** cepas CI01, CI03, CI06, CI10, CI15 y H37Rv.

3. Caracterización de la resistencia a fármacos de primera línea mediante la técnica de microensayo colorimétrico de Alamar Azul

Se realizó el microensayo de Alamar Azul para cada una de las 40 cepas analizadas, con un tiempo máximo de incubación de 5 días. Después de 24 horas y tras aplicar la solución de revelado, se interpretaron visualmente los ensayos ver Figura [31].

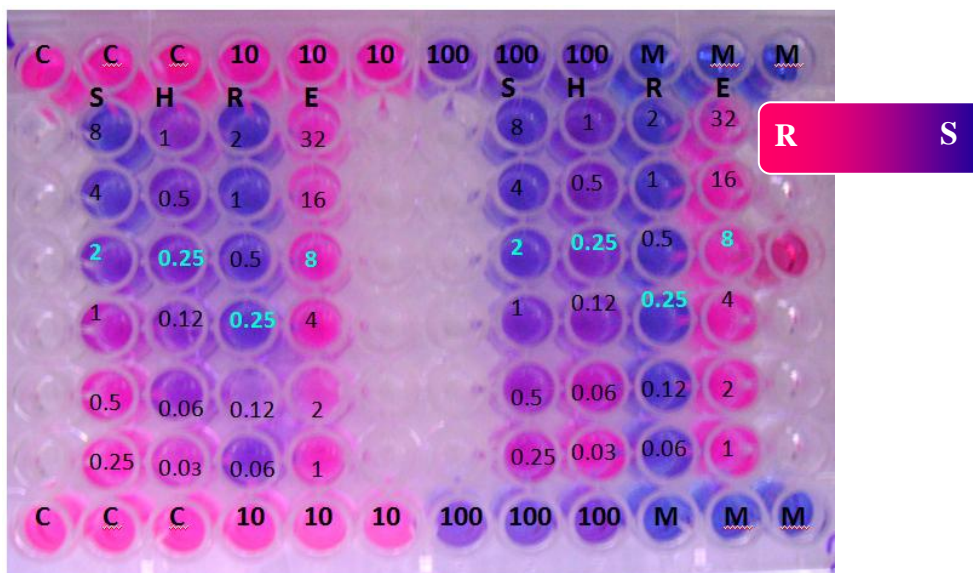


Figura 31 . Interpretación de los resultados del microensayo Alamar Azul. En este caso aquellos pozos con crecimiento son de color rosa (cepas resistentes), mientras cuando no hay crecimiento los pocillos se mantienen azules (cepas sensibles).

Para realizar la interpretación de los resultados se tomó en cuenta que en aquellos pozos que presentan la forma oxidada del colorante (azul), la cepa es sensible a estas concentraciones, mientras aquellos pozos que presentan reducción total del colorante (rosa), la cepa es resistente a estas concentraciones de los fármacos correspondientes.

En base a la CIM de cada uno de los fármacos ($S = 2 \mu\text{g/mL}$, $H = 0.25 \mu\text{g/mL}$, $R = 0.25 \mu\text{g/mL}$ y $E = 8 \mu\text{g/mL}$), se asignó el fenotipo y se clasificó a las cepas en sensibles y resistentes.

Los resultados de la prueba de Alamar Azul para cada una de las 40 cepas se muestran en la Tabla [21]. (Las fotografías correspondientes a los microensayos de Alamar Azul realizados se encuentran en el Apéndice II.)

Tabla 21 . Resultados del microensayo Alamar Azul.

Cepa	Patrón de susceptibilidad				Fenotipo
	S	H	R	E	
CI01	R	R	R	R	MDR
CI02	S	R	S	S	H
CI03	S	R	S	S	H
CI04	R	R	R	R	MDR
CI05	S	S	S	S	PS
CI06	R	R	R	R	MDR
CI07	R	R	R	R	MDR
CI08	R	R	S	R	SHE
CI09	R	R	R	R	MDR
CI10	R	R	R	R	MDR
CI11	S	S	S	R	E
CI12	R	R	S	R	SHE
CI13	R	R	S	R	SHE
CI14	S	S	S	S	PS
CI15	R	S	R	R	SER
CI16	R	R	S	R	SHE
CI17	R	R	S	R	SHE
CI18	R	R	R	R	MDR
CI19	R	R	R	R	MDR
CI20	R	R	R	R	MDR
CI21	ND	ND	ND	ND	ND
CI22	S	S	S	S	PS
CI23	R	R	R	R	MDR
CI24	S	S	S	S	PS
CI25	R	R	S	R	SHE
CI26	S	S	S	S	PS
CI27	S	S	S	S	PS
CI28	R	R	R	R	MDR
CI29-30	R	R	S	R	SHE
CI31	S	S	S	R	E
CI32-34	S	S	S	R	E
CI33	S	S	S	R	E
CI35	S	S	S	S	PS
CI36	S	S	S	S	PS
CI37	ND	ND	ND	ND	ND
CI38	S	S	S	S	PS
CI39	R	R	R	R	MDR
CI40	ND	ND	ND	ND	ND

MDR: Multidrogorresistentes; **PS:** Pansensible; **H:** Isoniazida; **E:** Etambutol; **R:** Rifampicina; **ND:** No Determinado.

El patrón de susceptibilidad mostró que de los aislados 29 mostraron resistencia al menos a un fármaco antituberculoso representando aproximadamente 76 % con distintos patrones de resistencia: 5.3 % H, 10.5 % E, 2.6 % SER, 18.4 % SHR y 31.6 % MDR. Mientras que el 24 % correspondían a aislados sensibles a los fármacos ensayados (SHRE). (Ver gráfica [7] y Tabla [22]).

Gráfica 7 . Distribución de aislados de CMT por resistencia obtenidos por el método Alamar Azul.

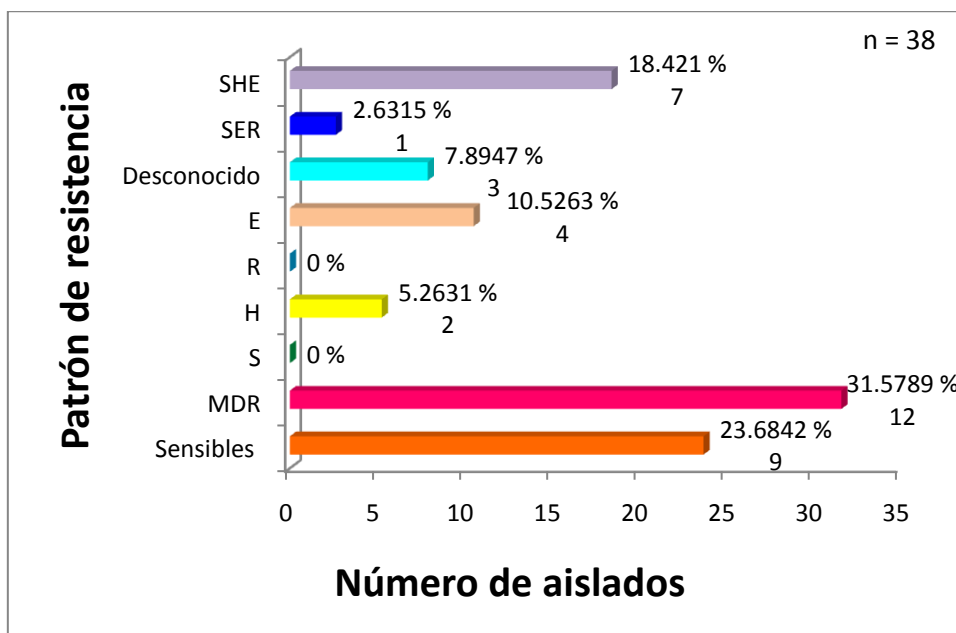


Tabla 22 . Patrón de resistencia de aislados de *M. tuberculosis* obtenidos por el método de Alamar Azul.

	Número	%	Patrón de resistencia ⁿ⁼³⁸
Sensibles	9	23.6842105	
Resistentes	26	68.4210526	
1R	6	15.78947368	H: 2; E:4
3R	8	21.0526316	SER: 1; SHE: 7
MDR	12	31.57895	
Sin Dato	3	7.89473684	

MDR: Multidrogorresistentes; **PS:**Pansensible; **H:** Isoniazida; **E:** Etambutol; **R:** Rifampicina.

A continuación se presenta un resumen de todos los resultados obtenidos así como de los datos epidemiológicos de los aislados estudiados en el presente trabajo, Tabla [23] y Tabla [24].

Tabla 23 . Tabla general de resultados genotípicos y fenotípicos.

Cepa	especie	SIT	Clade/linaje	Código MIRU	Código espoligotipificación	PCR-Múltiple	PCR- ARMS			Fenotipo AA
							516	526	531	
CI01	TB	54	MANU 2	234325154223	77777777763771	S	S	R	S	MDR
CI02	TB	53	T1	233325153323	77777777760771	S	S	S	S	H
CI03	TB	1484	MANU 2	233225153325	777777774023771	S	S	S	S	H
CI04	Bovis	Orphan	Orphan	233126153225	076573777077600	S	S	S	S	MDR
CI05	TB	119	X1	224325153314	77777677760771	S	SD	SD	SD	PS
CI06	TB	53	T1	225325153323	77777777760771	S	S	S	S	MDR
CI07	TB	53	T1	223425153322	77777777760771	S	S	S	S	MDR
CI08	TB	Orphan	Orphan	233426162323	77777407760771	S	SD	SD	SD	SHE
CI09	TB	119	X1	223325143324	77777677760771	S	S	S	S	MDR
CI10	TB	20	LAM1	324226153323	67777607760771	S	S	S	S	MDR
CI11	TB	17	LAM2	225226163221	677737607760771	S	SD	SD	SD	E
CI12	TB	50	H3	226525153323	77777777720771	S	SD	SD	SD	SHE
CI13	TB	50	H3	225525153323	77777777720771	S	SD	SD	SD	SHE
CI14	TB	Orphan	Orphan	223225143421	00000377760771	S	S	S	S	PS
CI15	TB	450	U	225325133323	777776770000000	S	S	S	S	SER
CI16	TB	119	X1	225635153425	77777677760771	S	SD	SD	SD	SHE
CI17	TB	42	LAM9	224226153321	77777607760771	S	SD	SD	SD	SHE
CI18	TB	Orphan	Orphan	224326153322	716137607760731	S	S	S	S	MDR
CI19	TB	Orphan	Orphan	324426151321	777737607740631	S	S	S	R	MDR
CI20	TB	1533	H3	225425152323	77776377720771	inhA	S	R	S	MDR
CI21	TB	2	H2	323513153323	00000004020771	S	S	S	S	ND
CI22	TB	65	T1(T4-CE1-Ancesor0)	233125143225	77777777760471	S	SD	SD	SD	PS
CI23	TB	53	T1	333225143223	77777777760771	S	S	S	S	MDR
CI24	TB	1356	S	443125153113	77637777760751	S	S	S	S	PS
CI25	TB	53	T1	334325152223	77777777760771	S	SD	SD	SD	SHE
CI26	TB	53	T1	325313153333	77777777760771	S	SD	SD	SD	PS
CI27	TB	Orphan	Orphan	214126163321	677737401720771	S	SD	SD	SD	PS
CI28	TB	70	X3	214325153324	70007677760671	inhA	S	S	S	MDR
CI29-30	TB	42	LAM9	214126153322	77777607760771	S	SD	SD	SD	SHE
CI31	Bovis	481	BOVIS1	222324253323	67677367777600	S	SD	SD	SD	E
CI32-34	Bovis	409	BOVIS2	222124253323	26407377777600	S	SD	SD	SD	E
CI33	Bovis	479	BOVIS3	222124263323	64001377777600	S	SD	SD	SD	E
CI35	Bovis	Orphan	Orphan	222124253323	24001337777600	S	SD	SD	SD	PS
CI36	Bovis	479	BOVIS3	222124253323	64001377777600	S	SD	SD	SD	PS
CI37	Bovis	479	BOVIS3	222124153323	64001377777600	S	S	S	S	ND
CI38	Bovis	479	BOVIS3	222124153323	64001377777600	S	SD	SD	SD	PS
CI39	TB	53	T1	283216240234	77777777760771	S	S	S	S	MDR
CI40	Bovis	Orphan	Orphan	232325242222	24001337777600	S	S	S	S	ND

MDR: Multidrogresistentes; PS:Pansensible; H: Isoniazida; E: Etambutol; R: Rifampicina; S: Sensible; ND: No Determinado; SD: Sin Dato.

Cepa	Genero	VIH	Edad (años)	Unidad	Recepción de muestra (fecha)	Especie	SIT	Clade/linaje	Código MIRU	Código espilogotipificación	PCR-Múltiple	PCR- ARMS			Fenotipo AA
												516	526	531	
CI01	M	+	37	Infector	10-ene-11	TB	54	MANU 2	234325154223	77777777763771	S	S	R	S	MDR
CI02	M	-	50	MI	03-feb-11	TB	53	T1	233325153323	77777777760771	S	S	S	S	H
CI03	F	+	30	Infector	04-mar-11	TB	1484	MANU 2	233225153225	77777774023771	S	S	S	S	H
CI04	M	-	54	27-H	24-may-11	Bovis	Orphan	Orphan	233126153225	076573777077600	S	S	S	S	MDR
CI05	M	-	38	401	30-abr-10	TB	119	X1	224325153314	777776777760771	S	SD	SD	SD	PS
CI06	F	-	18	401	20-jul-10	TB	53	T1	225325153323	77777777760771	S	S	S	S	MDR
CI07	M	-	23	27-H	25-ago-10	TB	53	T1	223425153322	77777777760771	S	S	S	S	MDR
CI08	M	SD	34	Infector	22-dic-10	TB	Orphan	Orphan	233426162323	77774077760771	S	SD	SD	SD	SHE
CI09	M	+	44	Infector	15-dic-10	TB	119	X1	223325143324	777776777760771	S	S	S	S	MDR
CI10	M	+	29	Infector	30-sep-09	TB	20	LAM1	324226153323	67777607760771	S	S	S	S	MDR
CI11	M	-	34	27-H	25-mar-10	TB	17	LAM2	225226163221	677737607760771	S	SD	SD	SD	E
CI12	M	+	32	Infector	05-ene-11	TB	50	H3	226525153323	77777777720771	S	SD	SD	SD	SHE
CI13	M	SD	SD	Infector	29-sep-09	TB	50	H3	225525153323	77777777720771	S	SD	SD	SD	SHE
CI14	F	-	25	cirugia	16-feb-11	TB	Orphan	Orphan	223225143421	00000377760771	S	S	S	S	PS
CI15	M	+	26	Infector	15-ene-08	TB	450	U	225325133323	777776770000000	S	S	S	S	SER
CI16	M	SD	SD	Neuro	24-ene-07	TB	119	X1	225635153425	777776777760771	S	SD	SD	SD	SHE
CI17	M	SD	SD	Infector	21-dic-07	TB	42	LAM9	224226153321	77777607760771	S	SD	SD	SD	SHE
CI18	M	-	31	401	29-ago-07	TB	Orphan	Orphan	224326153322	716137607760731	S	S	S	S	MDR
CI19	M	-	24	27-M	05-mar-08	TB	Orphan	Orphan	324426151321	777737607740631	S	S	S	R	MDR
CI20	F	+	30	Infector	28-jul-11	TB	1533	H3	225425152323	77776377720771	inhA	S	R	S	MDR
CI21	M	-	34	Infector	20-jun-08	TB	2	H2	323513153323	00000004020771	S	S	S	S	ND
CI22	M	+	27	Infector	01-dic-11	TB	65	T1(T4-CE1-Ancesor0)	233125143225	77777777760471	S	SD	SD	SD	PS
CI23	F	SD	SD	Infector	11-sep-08	TB	53	T1	333225143223	77777777760771	S	S	S	S	MDR
CI24	M	+	52	Infector	29-jun-10	TB	1356	S	443125153113	77637777760751	S	S	S	S	PS
CI25	F	-	58	Neuro	10-ene-12	TB	53	T1	334325152223	77777777760771	S	SD	SD	SD	SHE
CI26	M	+	33	Infector	17-ene-12	TB	53	T1	325313153333	77777777760771	S	SD	SD	SD	PS
CI27	M	SD	34	Infector	17-abr-12	TB	Orphan	Orphan	214126163321	677737401720771	S	SD	SD	SD	PS
CI28	M	-	43	Neuro	04-jun-12	TB	70	X3	214325153324	70007677760671	inhA	S	S	S	MDR
CI29-30	F	-	31	Neuro	26-jun-12	TB	42	LAM9	214126153322	77777607760771	S	SD	SD	SD	SHE
CI31	M	+	32	CMSXXI	27-jun-12	Bovis	481	BOVIS1	222324253323	67677367777600	S	SD	SD	SD	E
CI32-34	M	+	49	Infector	08-mar-11	Bovis	409	BOVIS2	222124253323	26407377777600	S	SD	SD	SD	E
CI33	M	+	42	Infector	15-jun-11	Bovis	479	BOVIS3	222124263323	64001377777600	S	SD	SD	SD	E
CI35	M	+	27	Infector	18-may-11	Bovis	Orphan	Orphan	222124253323	24001337777600	S	SD	SD	SD	PS
CI36	F	-	44	Infector	04-jul-11	Bovis	479	BOVIS3	222124253323	64001377777600	S	SD	SD	SD	PS
CI37	M	+	43	Infector	27-jul-11	Bovis	479	BOVIS3	222124153323	64001377777600	S	S	S	S	ND
CI38	M	SD	30	Infector	08-ago-11	Bovis	479	BOVIS3	222124153323	64001377777600	S	SD	SD	SD	PS
CI39	F	SD	32	Neuro	06-oct-11	TB	53	T1	283216240234	77777777760771	S	S	S	S	MDR
CI40	F	SD	40	CMSXXI	07-mar-12	Bovis	Orphan	Orphan	232325242222	24001337777600	S	S	S	S	ND

MDR: Multidrogosresistentes; PS:Pansensible; H: Isoniazida; E: Etambutol; R: Rifampicina; S: Sensible; ND: No Determinado; SD: Sin Dato

Tabla 24 . Tabla General de Resultados y datos epidemiológicos.

DISCUSIÓN

Debido al problema de salud pública que representa la TB a nivel mundial, la cual afecta al sector más pobre y vulnerable de la población, es necesario tener un panorama más amplio de los casos que se presentan en nuestro país, detectar brotes de la infección y relacionarlo con el control y manejo de los pacientes infectados y evitar de esta forma el contagio.

La identificación oportuna de las cepas con probable MTb será de gran ayuda para que el Programa Nacional de Control de la tuberculosis sea más efectivo y ayude a contrarrestar el problema que representa la TB en México. Así como la identificación rápida de cepas MDR, para evitar que se propaguen y aumente el índice de mortalidad, debido a un tratamiento inadecuado, tomando en cuenta el aumento de este tipo de cepas dentro de la población a nivel mundial.

La finalidad de este trabajo es la implementación de nuevas técnicas de genotipificación y detección de farmacorresistencia tanto de forma fenotípica como genotípica de cepas pertenecientes al CMT, para reducir el tiempo de diagnóstico y aumentar la expectativa de recuperación de los pacientes portadores de cepas MDR. Es importante llevar a cabo la identificación a nivel especie de forma correcta ya que el tratamiento es diferente en cada caso; así poder controlar la transmisión y tener información respecto a las micobacterias más frecuentemente aisladas responsables de TBM, en la población mexicana.

Se trabajó con aislados de muestras de LCR de pacientes con MTB. Obteniéndose resultados relevantes para la caracterización de este tipo de muestras. La genotipificación se llevó a cabo mediante la realización de las técnicas VNTR-MIRU y Espoligotipificación, la detección molecular de resistencia se realizó únicamente para isoniazida (H) y Rifampicina (R) siendo estos los fármacos aquellos que condicionan la farmacorresistencia de las cepas, mediante las técnicas PCR-Múltiple y PCR-ARMS respectivamente. También se realizó la identificación fenotípica de resistencia para 4 fármacos de primera línea (S, H, R, E) mediante la técnica colorimétrica Alamar Azul.

La caracterización de realizó a 40 aislados del CMT que corresponden a 38 pacientes diferentes. El 100 % de las cepas aisladas fue realizado por el equipo de trabajo del laboratorio de Neumología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", durante el periodo correspondiente de Enero 2007 a Junio 2012. Posteriormente se realizaron resiembras de todos los aislados para obtener un cultivo nuevo y abundante que permitió la realización de las diferentes pruebas.

Dentro de la población analizada se observó que los pacientes se encontraron en un rango de edad entre 18 y 58 años, con un promedio de 36 años. El 74 % fueron hombres y el 26 % mujeres. La importancia de estos datos es debido a que si la enfermedad se adquiere a temprana o mediana edad esto puede indicar una transmisión reciente, en cambio cuando la edad del paciente es mayor indica una probable reactivación de la enfermedad ^[URL3].

El grado de mortalidad en este estudio fue de 24 % y el promedio de edad de estas es de 36 años, lo cual concuerda con lo reportado por la OMS demostrando que la enfermedad se adquiere a mediana edad y es causada por una infección primaria y no por una reactivación de la enfermedad; en este estudio se obtuvo un porcentaje más elevado comparado con el estudio de Christensen y col. ^[65], en el cual se reporta un 19% de mortalidad. Nuestros datos también indican que existe una transmisión reciente de cepas MDR ya que ninguno había recibido un tratamiento previo para TB.

De acuerdo a los códigos obtenidos de la genotipificación por VNTR-MIRU, se observó mayor polimorfismo en los MIRU 10, 16, 23, 26 y 40, (Ver Figura [23]) en comparación con los loci 2, 4, 20, 24, 27, 31 y 39. Estos resultados son similares a lo reportado por Supply y col. 2006 ^[42], donde se observó que los MIRU con mayor variabilidad son el 4, 10, 16, 23, 26, 31 y 40, mientras que los restantes presentan un polimorfismo menor.

Dentro de los resultados de genotipificación por VNTR-MIRU y espoligotipificación de los 38 aislados, se obtuvieron los siguientes linajes de *M. tuberculosis*: T1 (7, 18 %), T1 [T4-CE1-Ancestor0] (1, 3 %), Haarlem3 (3, 7.5 %), Haarlem2 (1, 2.5 %), X1 (3, 8 %), X3 (1, 4 %), LAM9 (2, 5 %), LAM1 (1, 2.5 %), LAM2 (1, 2.5 %),

MANU2 (2, 5 %), S (1, 3 %), U (1, 3 %), Único (5, 3 %). Se encontraron 9 cepas pertenecientes al genotipo *M. bovis* de el linaje B3 (4, 11 %), B1 (1, 2.5 %), B2 (1, 2.5 %) y Linaje único (3, 8 %). Dentro de los resultados están presentes aquellos genotipos más frecuentes reportados para México (T1, Haarlem y LAM) ^[41,54]. Esto demuestra que el linaje que se presenta en la enfermedad depende de la ubicación geográfica, pero no hay datos relevantes que demuestren que del linaje depende el sitio de infección. ^[55]

Los resultados de SIT (Spoligotype Internatinal Type) proporcionados por la base de datos SITVIT del instituto Pasteur de Guadalupe, muestran que el SIT53 es el predominante en nuestros aislados con un 17.5 % (ver Figura [25]), lo cual concuerda con lo reportado para México por Martínez-Guarneros y col. 2013 ^[65], en el cual se reporta este SIT como el predominante en cepas MDR, nuestros resultados muestran un 57 % de cepas SIT53 MDR.

Al correlacionar el genotipo con el patrón de resistencia se encontró que en el caso de la cepa 20 correspondiente al genotipo Haarlem 3 es MDR lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Tessema y col. 2013 ^[55] y en Manimuthu y col. 2012 ^[56], en el cual menciona que el genotipo Haarlem está relacionado con MDR, además de presentar un alto grado de mortalidad, en este caso el paciente infectado con el genotipo Haarlem también falleció durante su estancia en el hospital.

En nuestro estudio los pacientes infectados con VIH no muestran diferencia significativa a resistencia a fármacos de primera línea. ^[56]

Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos reportan que la resistencia a H es altamente predictiva de muerte en pacientes con TBM, lo cual concuerda con la mayoría de los pacientes de los que se cuenta con la información, en aquellos que fallecieron la mayoría presentaban esta resistencia. Ver Tabla [17]. ^[URL 5, 63]

La mayoría de los autores reportan presencia de cepas genotipo Beijing en pacientes con TB extrapulmonar, en este trabajo no se identificó ninguna cepa con

este genotipo [55, 57, 58, 59, 60], aunque debe tomarse en cuenta que casi la totalidad de los trabajos presentados provienen del continente asiático, por lo que no se puede hacer una comparación debido a que la ubicación geográfica es un factor determinante del linaje.

Un 40 % de las mujeres presentan un fenotipo MDR, mientras que en los hombres 28% son MDR, lo cual indica que el sexo podría ser un factor para adquirir una cepa MDR; Caws y col. aseguran en su publicación que el sexo no es un factor para la resistencia a fármacos. [57]

Desde el desarrollo de los fármacos antituberculosos se cuenta con una reducción de la morbilidad y mortalidad asociada a TB. Sin embargo con la diseminación de cepas resistentes a los fármacos de primera línea, los beneficios del tratamiento están altamente comprometidos; debido a que la infección con cepas MDR hace que el tratamiento se vuelva prolongado y costoso.

No cabe duda que la resistencia a fármacos es en muchos casos el resultado de un inapropiado tratamiento; lo que ahora lo hace no sólo frecuente en pacientes con tratamiento previo sino que existen casos nuevos debidos a la transmisión de estas cepas. Lo que hace necesario la implementación de pruebas de susceptibilidad para que así se logre llevar a cabo la vigilancia y orientación del tratamiento adecuado.

La implementación de técnicas moleculares proporciona una enorme ventaja ya que estos métodos reducen el tiempo en el que los resultados pueden brindarse. Existen otros métodos que son ampliamente utilizadas para llevar a cabo el estudio de la susceptibilidad de los fármacos antituberculosos y estos son los ensayos colorimétricos. Los primeros estudios en los cuales se empleó dichos métodos fueron reportados por Yajko et al., 1995 [45] y Collins y Franzblau et al., 1998 [46]; quienes describieron el microensayo Alamar Azul para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los fármacos antituberculosos; estos autores reportaron valores de concordancia de 87.9 % y 97 % al comparar los resultados con el Método de las Proporciones (prueba de referencia) y el sistema radiométrico BACTEC – 460 respectivamente.

Al identificarse la RES como el componente principal del AA, esto ha permitido su empleo en los estudios de susceptibilidad, haciendo más económico el empleo de éste, lo que facilita la introducción de este ensayo en aquellos laboratorios que cuenten con recursos económicos limitados. Es indispensable el establecer un punto de corte que permita diferenciar resultados positivos y negativos, o sea, resistentes y sensibles.

Al evaluar nuestras cepas mediante el empleo del ensayo colorimétrico se obtuvieron fenotípicamente patrones de farmacorresistencia variados. Esto debido a la interpretación de la coloración de la RES, sobre todo en el E lo que podría indicar un deterioro en el fármaco al ser empleado para llevar a cabo el ensayo; aunque como también se ha reportado (Heifets, 1986^[66]; Gangadharam et al., 1990^[65]; Madison et al., 2002^[67]) esto puede ser debido a la poca actividad de la misma en los medios de cultivo y al estrecho rango que existe entre la CMI de las cepas sensibles y resistentes.

Los ensayos colorimétricos presentan beneficios en costo además que en el formato de microplaca con el que cuentan se puede realizar la evaluación de varios aislamientos y fármacos simultáneamente, empleando poco volumen de reactivo y los resultados se obtienen en un corto tiempo de incubación; además que se puede emplear el ensayo tanto para los fármacos antituberculosos de primera línea y hacerse extensivos a los de segunda línea.

Mientras que por los métodos moleculares sólo se detectaron 2 cepas con mutación en el gen *inhA* para Isoniazida, 2 cepas con mutación en el codón 526 y 1 mutación en el codón 531 del gen *rpoB* para Rifampicina. Lo cual no concuerda con lo reportado por Duo y col. 2011^[62] y Caws y col. 2007^[64], ya que encontraron altos porcentajes de mutación en *rpoB* y el gen *KatG315*. Estos resultados nos indican que es importante complementar con otras pruebas genotípicas y así detectar la mutación que está produciendo la resistencia a estos fármacos, debido a que los estudios con los que comparamos son en el continente asiático donde la prevalencia y contagio de cepas es diferente a aquellas que infectan pacientes mexicanos.

CONCLUSIONES

- Un alto porcentaje (84 %) de los aislados de *M. tuberculosis* presentaron patrones genotípicos del VNTR-MIRU y espoligotipificación diferentes, lo que sugiere una gran variabilidad genética.
- Los MIRU más polimórficos fueron 10, 16, 23, 26 y 40.
- En esta caracterización genotípica se identificó al 79 % de los aislados del CMT, los cuales correspondieron a la familia Bovis (24%) con los subclades 1, 2 y 3, así como 3 aislados con patrón único.
- Dentro de los aislados analizados se identificó una correlación entre pacientes de sexo masculino y femenino encontrándose este último más propenso a contagiarse con una cepa MDR.
- La co-infección VIH-TB no mostró un índice significativo de riesgo para cepas MDR, sin embargo el porcentaje de la co-infección es alto (39 %).
- El rango de edad que presentó mayor porcentaje fue 36 años, esta es la edad económicamente activa.
- El 5.3 % de los aislados presentaron una mutación en el gen *inhA*.
- La mutación en el gen *rpoB* que produce resistencia a rifampicina se encontró únicamente en los codones 526 y 531 (7.9 %).
- El ensayo colorimétrico mostró que el patrón de susceptibilidad predominante en los aislados es MDR (31.6 %).

PERSPECTIVAS

Para complementar el trabajo se propone:

- Secuenciar los aislados del CMT que fueron negativos para PCR-Múltiple y PCR-ARMS, y así identificar en que región de los genes *katG* y *rpoB* existe mutación, y realizar la comparación de los métodos fenotípicos y genotípicos de farmacorresistencia.
- Realizar el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP, del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) para todos los aislados con el fin de complementar el estudio genotípico.
- Complementar el historial de cada paciente para identificar posibles factores de riesgo asociados a la enfermedad.

REFERENCIAS

1. **Romero Cabello, Raúl.** *Microbiología y Parasitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias.* 3ª edición México: Editorial Medica Panamericana, 2007. Pp. 977 – 987.
2. **Ryan Kenneth J., Ray C. George.** *Sherris. Microbiología médica.* 5ª edición México: editorial Mc Graw-Hill Interamericana, 2005. pp. 374-383.
3. **Cortés-Sierra, Elizabeth.** *Descripción de Técnicas Fenotípicas y Moleculares para la Identificación de Mycobacterium tuberculosis y micobacterias atípicas en el Laboratorio Clínico.* Dirigida por Freddy Gamboa. Tesis Licenciatura. Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogota, 2009.
4. **Murray Patrick R., Rosenthd Ken S., Pfaller Michael A.** *Microbiología médica.* 6ª edición España: editorial Elsevier, 2009. pp. 277-290.
5. **Koneman.** *Diagnostico microbiológico: texto y atlas a color.* 6ta edición. Buenos aires: Editoral Medica Panamericana 2006. p. 183.
6. **Gorocica P., Jimenez-Martinez M., Garfias Y., Sada I., Lascurain R.** 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *M. tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *RevInstNalEnfRespMex*; 18(2):142-153.
7. **Fauci, Anthony S., Braunwald, Eugene, Kasper, Dennis L., Hauser, Sthepen L. Longo, Dan L., Jamerson, J. L., Loscalzo, Joseph.** *Harrison. Principios de Medicina Interna.* 17a edición México: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2009. pp. 1006-1020.
8. **Betty Forbes; Daniel F. Sahm; Alice S. Weissfeld. Forbes. Betty. Bailey y Scott; Diagnóstico Microbiológico.** 12ª ed. Buenos Aires: Médica Panamerica, 2009. p.480.
9. **Rivero Serrano O., Navarro Reynoso F.** *Neumología.* 3ª edición México: editorial Trillas, 2004. pp. 156-161.
10. **Narro Robles, J., Rivero Serrano, O., López Barcena, JJ.** *Diagnóstico y Tratamiento en la práctica médica.* 2ª edición México: Editorial El Manual Moderno, 2007. pp. 683 – 694.
11. **Alfred P. Fishman, Jack A. Elias, Jay A. Fishman, Michael A, Grippi, Larry R. Kaiser, Robert M. Senior.** *Manual de Enfermedades Pulmonares.* 3ª

edición, McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A de C.V. México, Abril, 2004. pp. 830-870.

12. **Harries, A., Maher, D., Graham, S.** *TB/HIV: A clinical manual.* 2ª edición, 2004. pp. 23 – 39.
13. **Rossmann Milton D., MacGregor Rob R.** *Tuberculosis: Clinical management and new challenges.* USA: editorial McGraw- Hill, 1995. pp. 145-151.
14. **Wolfgang K. Joklik, Hilda P. Willet, D. Bernard Amas.** *Zinsser, Microbiología.* 20ª edición, Argentina: Editorial Médica Panamericana, 1996. pp. 685-721.
15. **Crofton John, Horne Norman, Miller Fred.** *Clinical Tuberculosis.* 2ª edición Malasia: Editorial McMillanEducation LTD, 1999. p. 90.
16. **Dominguez Del Valle, F. J. et al. 2007.** Clínica y radiología de la tuberculosis torácica. *Anales Sis San Navarra.*, vol.30, suppl.2, pp. 33-48.
17. **Ruiz-Manzanao, J., Blanquerb, R., Calpec, J.L., Caminerod, J.A., Caylàe, J., Domínguez, J.A., García, J.M. y Vidal, R. 2008.** Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. *ArchBronconeumol*; 44(10):551-66.
18. **Maurice, V., Rupper, A.H.** *Principios de Neurología de Adams y Victor.* 7ª edición México: McGraw- Hill Interamericana, 2004. Pp. 689, 710 – 713.
19. **Cherian A, Thomas SV.** Central nervous system tuberculosis. *Afr Health Sci* 2011; 11:116-27.
20. **Laurence L.Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann.** Goodman&Gilman. Las bases de la terapéutica. 12ª edición México: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2012. pp. 1549-1559.
21. **N. Arráiz, V. Bermúdez, B. Urdaneta.** Resistencia a drogas en *M. tuberculosis*: Bases moleculares. AVFT v.24 n.1 Caracas 2005.
22. **De La Iglesia, A.I., Morbidoni, H.R. 2006.** Mecanismos de acción de resistencia a rifampicina e isoniazida en *Micobacterium tuberculosis*: nueva información sobre viejos conocidos. *Rev. Arg. Microbiol*; 38: 97-109.
23. **Somoskovi, A., Parsons, L.M., Salfinger, M. 2001.** The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res.* 2:164-168.

24. **Bertram G. Katzung** [et.al]. *Farmacología Básica y Clínica*. 11ª edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A de C.V., China, 2010. Pp. 823 – 827.
25. **Cuevas-Córdoba B, Zenteno-Cuevas R. 2010.** Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
26. **Alcaide F. Esteban J. Gonzalez J. Palacios J.** Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la sociedad española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Micobacterias. 2005.
27. **Organización Panamericana de la Salud. 2008.** Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, normas y guía técnica. Parte II cultivo.
28. **Alcaide F. 2009.** ¿Qué aporta la biología molecular al diagnóstico de la tuberculosis? *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 27(9):493–495.
29. **Jawetz, Melnick, Adelberg.** *Microbiología médica*. 25a edición México: Editorial McGraw-Hill, 2010.
30. BD. 2007a. BACTEC™ MGIT™. Mycobacteria growth indicador tuber 7mL. Inserto de medio de cultivo. L001800JAA. 2007/06.
31. **Gakis C. 1996** Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *EurRespir J*, 9: 632–633.
32. **Ungerer JPJ, Oosthuizen HM, Bissbort SH, Vermaak WJH. 1992** Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *ClinChem*; 38: 1322– 326.
33. **Valdés L, San José E, Alvarez D., J.M. Valle. 1996** Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. *EurRespir J.*; 9: 747– 751.
34. **Laniado-Laborín R. 2005.** Adenosine Deaminase in the Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusion: Is It Really an Ideal Test? A Word of Caution. *Chest*; 127; 417- 418.
35. **Ungerer JPJ, Oosthuizen HM, Retief JH, and Bissbort SH. 1994** Significance of adenosine deaminase activity and its isoenzymes in tuberculous effusions. *Chest*; 106: 33–37.

36. **Bothamley GH. 1995** Tuberculous pleurisy and adenosine deaminase. *Thorax*; 50: 593 – 594.
37. **Burgess LJ, Maritz FJ, Le Roux I, Taljaard JJF. 1995.** Use of adenosine deaminase as a diagnostic tool for tuberculous pleurisy. *Thorax*; 50: 672-4.
38. **Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. 1994.** DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol*; 235:196-205.
39. **Paolo Wong, Maritza Puray, Arturo Gonzales, Carlos R. Sevilla. 2011.** Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú. *Rev. Peruana Epidemiol.* 15(1):6-16
40. **Supply, P., E. Mazars, S. Lesjean, V. Vincent, B. Gicquel, and C. Locht. 2000.** Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* **36**:762–771.
41. **Supply, P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht. 2001.** Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3563–3571.
42. **Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Olelemann, S. Rüsh-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. Hass, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, and D. van Soolingen. 2006.** Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **44**:4498–4510.
43. **Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al 1997.** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35: 907-14.
44. **Lopez-Alvarez R., C. Badillo-Lopez, J. F Cerna-Cortes, I. Castillo-Ramirez, S. Rivera-Gutierrez, A. C. Helguera-Repetto, D. Aguilar, R. Hernandez-Pando, S. Samper, J. A Gonzalez-y-Merchand. 2010.** First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. *BMC Microbiology.* 10:82.

45. **Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, Sanders CA, Cawthon VL, Gee B, Babst A, Hadley WK. 1995.** Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 33:2324–2327.
46. **Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. 1998.** Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar blue assay. J Clin Microbiol 36:362–366.
47. **Luna- Herrera J., G. Martinez-Cabrera, R. Parra-Maldonado, J. A. Enciso-Moreno, J. Torres-Lopez, F. Quesada-Pascual, R. Delgadillo-Polanco, S. G. Franzblau. 2003.** Use of Receiver Operating Characteristic Curves to Assess the Performance of a Microdilution Assay for Determination of Drug Susceptibility of Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 22:21–27.
48. **Leonard B., Coronel J., Siedner M., Grandjean L., Caviedes L., Navarro P., Gilman R. H., A. J. Moore D. A.J. 2008.** Inter- and Intra-Assay Reproducibility of Microplate Alamar Blue Assay Results for Isoniazid, Rifampicin, Ethambutol, Streptomycin, Ciprofloxacin, and Capreomycin Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol; 46(10):3526-3529.
49. **Fukushima, Romualdo S; et al. 2003.** Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of cultura media for saccharolytic clostridium species. Brazilian Journal of Microbiology, 34:22-26.
50. **Somoskovi, A., Parsons, L.M., Salfinger, M. 2001.** The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir Res. 2:164-168.
51. **Hillemann D, Kubica T, Agzamova R, Venera B, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. 2005.** Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan. Int J Tuberc Lung Dis. 9:1161-1167.
52. **Herrera-León L, Molina T, Saiz P, Saez-Nieto JA, Jimenez MS. 2005.** New multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 49:144-147.

53. **Fan XY, Hu ZY, Xu FH, Yan ZQ, Guo SQ, Li ZM. 2003.** Rapid detection of *rpob* gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Shanghai by using the amplification Refractory Mutation System. *J Clin Microbiol.* 41:993-997.
54. **Mercedes Macías Parra, Jesús Kumate Rodríguez, José Luís Arredondo García, Yolanda López-Vidal, Mauricio Castañón-Arreola, Susana Balandrano, Nalin Rastogi, and Pedro Gutiérrez Castrellón. 2011.** *Mycobacterium tuberculosis* Complex Genotype Diversity and Drug Resistance Profiles in a Pediatric Population in Mexico. Hindawi Publishing Corporation *Tuberculosis Research and Treatment.* 1155(10): 9.
55. **Manimuthu Mani Sankar, Jitendra Singh, Selvaraj Cynthiya, Sarman Singh. 2012.** Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from North Indian patients with extrapulmonary tuberculosis. *Tuberculosis,* 93(2013):75-83.
56. **Belay Tessema, Joerg Beer, Matthias Merker, Frank Emmrich, Ulrich Sack, Arne C Rodloff and Stefan Niemann. 2013.** Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Northwest Ethiopia: new phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia. *BMC Infectious Diseases,* 13:131.
57. **Maxine Caws, Guy Thwaites, Kasia Stepniewska, Nguyen Thi Ngoc Lan, Nguyen Thi Hong Duyen, Nguyen Thi Phuong, Mai Nguyet Thu Huyen, Phan Minh Duy, Tran Huu Loc, Tran Thi Hong Chau, Dick van Soolingen, Kristin Kremer, Nguyen Van Vinh Chau, Nguyen Tran Chinh and Jeremy Farrar. 2006.** Beijing Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is Significantly Associated with Human Immunodeficiency Virus Infection and Multidrug Resistance in Cases of Tuberculous Meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 44(11):3934.
58. **Maxine Caws, Guy Thwaites, Sarah Dunstan, Thomas R. Hawn, Nguyen Thi Ngoc Lan, Nguyen Thuy Thuong Thuong, Kasia Stepniewska, Mai Nguyet Thu Huyen, Nguyen Duc Bang, Tran Huu Loc, Sebastien Gagneux, Dick van Soolingen, Kristin Kremer, Marianne van der Sande, Peter Small, Phan Thi Hoang Anh, Nguyen Tran Chinh, Hoang Thi Quy, Nguyen Thi Hong Duyen, Dau Quang Tho, Nguyen T. Hieu, Estee Torok, Tran Tinh Hien, Nguyen Huy Dung, Nguyen Thi Quynh Nhu, Phan Minh Duy, Nguyen van Vinh Chau, Jeremy Farrar. 2008.** The Influence of Host and Bacterial Genotype on the Development of Disseminated Disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens.* 4(3)

59. **Guy Thwaites, Maxine Caws, Tran Thi Hong Chau, Anthony D'Sa, Nguyen Thi Ngoc Lan, Mai Nguyet Thu Huyen, Sebastien Gagneux, Phan Thi Hoang Anh, Dau Quang Tho, Estee Torok, Nguyen Thi Quynh Nhu, Nguyen Thi Hong Duyen, Phan Minh Duy, Jonathan Richenberg, Cameron Simmons, Tran Tinh Hien, and Jeremy Farrar. 2008.** Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* Genotype and the Clinical Phenotype of Pulmonary and Meningeal Tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, p. 1363–1368.
60. **Eleanor S. Click, Patrick K. Moonan, Carla A. Winston, Lauren S. Cowan y John E. Oeltmann. 2011.** Relationship Between *Mycobacterium tuberculosis* Phylogenetic Lineage and Clinical Site of Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. 54(2):211-9.
61. **G. E. Thwaites, T. T. H. Chau, M. Caws, N. H. Phu, L. V. Chuong, D. X. Sinh, F. Drobniewski, N. J. White, C. M. Parry, J. J. Farrar. 2002.** Isoniazid resistance, mycobacterial genotype and outcome in Vietnamese adults with tuberculous meningitis. *Int J Tuberc Lung Dis* 6(10):865–871.
62. **Lina Duo, Binwu Ying, Xingbo Song, Xiaojun Lu, Yuanxin Ye, Hong Fan, Junping Xin, and Lanlan Wang. 2011.** Molecular Profile of Drug Resistance in Tuberculous Meningitis From Southwest China. *Clinical Infectious Diseases*; 53(11):1067–73.
63. **Dau Quang Tho, M. Estée Török, Nguyen Thi Bich Yen, Nguyen Duc Bang, Nguyen Thi Ngoc Lan, Vo Sy Kiet, Nguyen van Vinh Chau, Nguyen Huy Dung, Jeremy Day, Jeremy Farrar, Marcel Wolbers, and Maxine Caws.** Influence of Antituberculosis Drug Resistance and *Mycobacterium tuberculosis* Lineage on Outcome in HIV-Associated Tuberculous Meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(6): 3074–3079.
64. **M. Caws, G. E. Thwaites, P. M. Duy, D. Q. Tho, N. T. Ngoc Lan, D. V. Hoa, T. T. Hong Chau, M. N. Thu Huyen, P. T. Hoang Anh, N. V. V. Chau, N. T. Chinh, K. Stepniewska, J. Farrar. 2007.** Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* causing multidrug-resistant tuberculosis meningitis. *Int J Tuberc Lung Dis* 11(2):202–208.
65. **Gangadharam PR, Pratt FP, Perumal VK, Iseman MD.** The effects of exposure time, drug concentration and temperature on the activity of ethambutol versus *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1478 – 82.

66. **Heifets MH.** Etambutol MICs and MBCs for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 927 – 32.
67. **Madison B, Robinson-Dunn B, George I, Gross W, Lipman H, Metchock B, et al.** Multicenter evaluation of ethambutol susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by agar proportion and radiometric methods. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3976 – 9.

URLs (Uniform Resource Locators)

URL 1. <http://scielo.unam.mx/img/revistas/iner/v18n2/a10f1.jpg>. Consultado en Abril de 2013.

URL 2. Nature Reviews Microbiology
http://www.nature.com/nrmicro/journal/v1/n2/fig_tab/nrmicro749_F1.html. Consultado en Enero de 2013.

URL 3. Mexico Tuberculosis Profile, WHO
http://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ%2FSTB_TM_E%2FPublic%2FTBCountryProfile&ISO2=MX&outtype=html. Consultado en Marzo de 2013.

URL 4. SINAVE
<http://www.sinave.gob.mx/>. Consultado en Abril 2013.

URL 5. <http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/default.htm>. Consultado en Febrero de 2012.

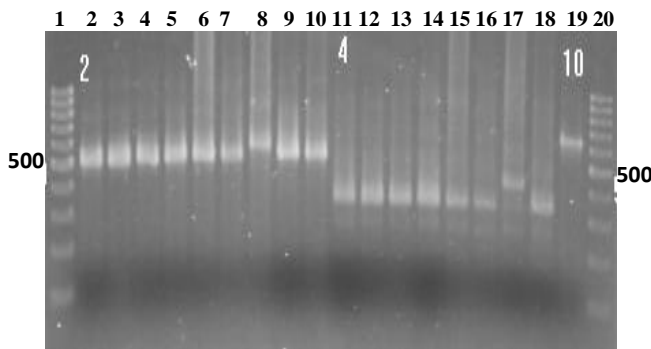
URL 6. Microbiology. A Systems Approach <http://www.lung.ca/tb/images/>. Consultado en Febrero de 2013.

URL 7. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud; disponible en línea:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m006ssa23.html>. Consultado en Febrero de 2013.

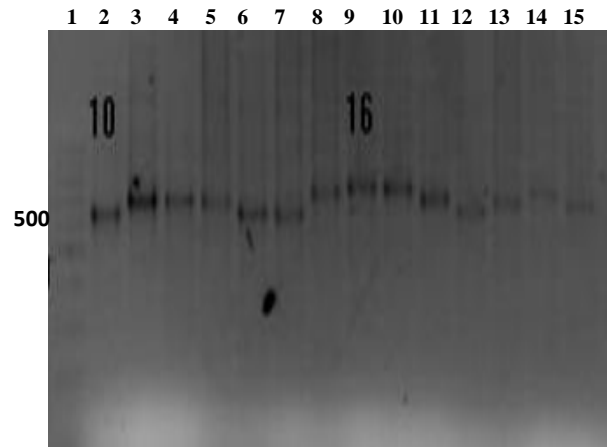
URL 8.
http://www.redbioquimicasf.com.ar/bibliografia/bacterio/curso_tbc/curso_tbc_modulo_8.pdf. Consultado en Enero de 2013

URL 9. http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.5.4.4. Consultado en Abril de 2013

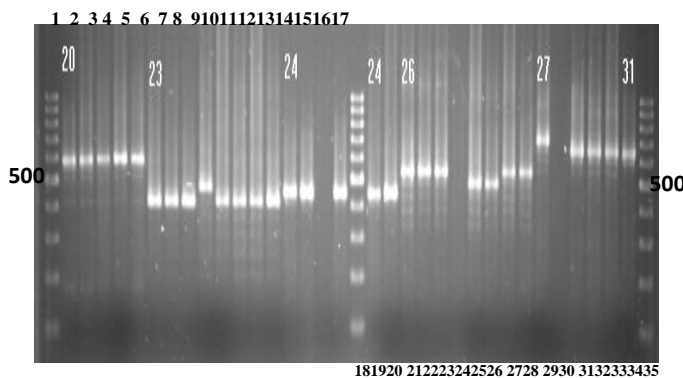
Apéndice I. **MIRU**



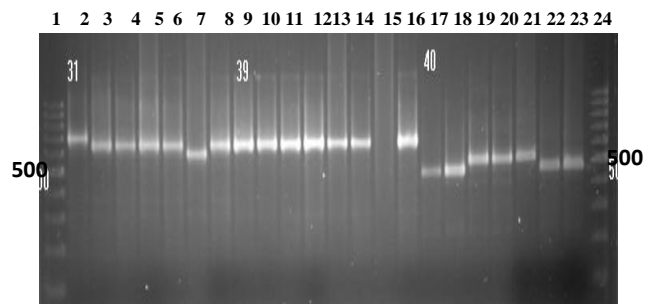
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 y 20 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 10, **MIRU 2** cepas CI01, CI02, CI03, CI04, CI22, CI23, CI24, CI25, CI26. Carriles 11 – 18, **MIRU 4** cepas CI01, CI02, CI03, CI04, CI22, CI23, CI24, CI25. Carril 19, **MIRU 10** cepa CI01.



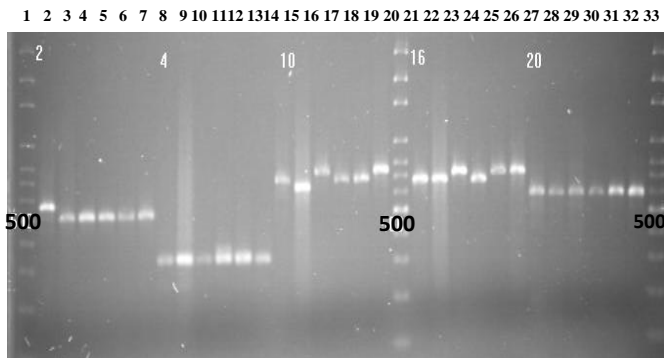
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 8, **MIRU 10** cepas CI02, CI03, CI04, CI22, CI23, CI24, CI26. Carriles 9 – 15, **MIRU 16** cepas CI01, CI02, CI03, CI04, CI22, CI23, CI24.



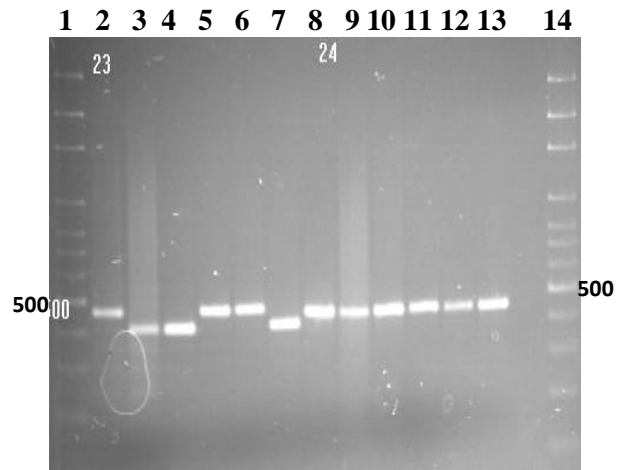
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1, 18, 35 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 6, **MIRU 20** cepas CI03, CI22, CI23, CI24, CI25. Carriles 7 – 13, **MIRU 23** cepas CI01, CI02, CI03, CI04, CI22, CI23, CI24, CI25. Carriles 14 – 17, 19 y 20, **MIRU 24** cepas CI01, CI02, CI03, CI04, CI23, CI24. Carriles 21 – 28, **MIRU 26** cepas CI01, CI02, CI03, CI04, CI22, CI23, CI24, CI25. Carriles 29 – 33, **MIRU 27** cepas CI01, CI02, CI03, CI23, CI24. Carril 35, **MIRU 31** cepa CI01.



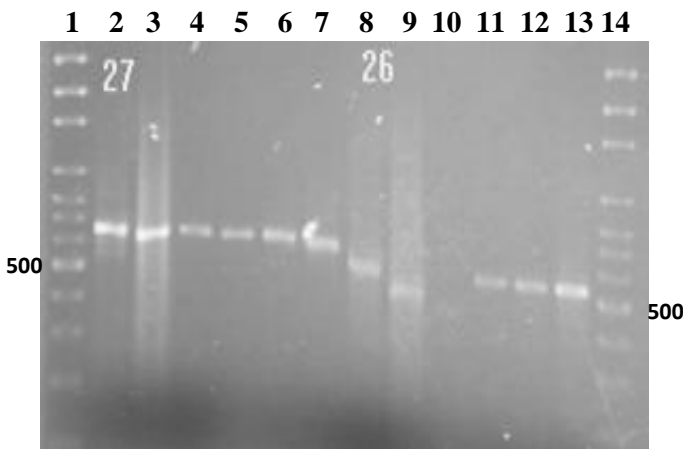
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1, 24 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 8, **MIRU 31** cepas CI02, CI03, CI04, CI22, CI23, CI24, CI25. Carriles 9 – 16, **MIRU 39** cepas CI01, CI02, CI03, CI04, CI22, CI23, CI24, CI25. Carriles 17 – 23, **MIRU 40** cepas CI01, CI02, CI03, CI04, CI22, CI23, CI24.



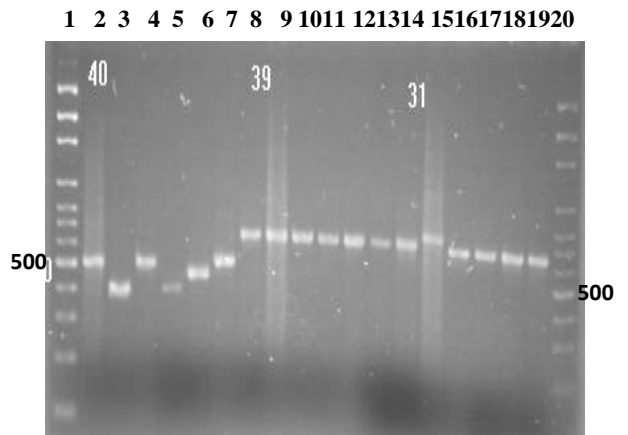
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1, 20, 33 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 7, **MIRU 2** cepas CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20. Carriles 8 – 13, **MIRU 4** cepas CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20. Carriles 14 – 19 **MIRU 10** cepas CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20. Carriles 21 – 26, **MIRU 16** CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20. Carriles 27 – 32 **MIRU 20** cepa CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20.



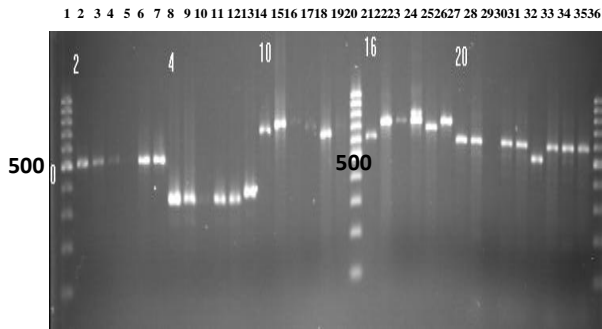
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1, 14 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 7, **MIRU 23** cepas CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20. Carriles 8 – 13, **MIRU 24** cepas CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20.



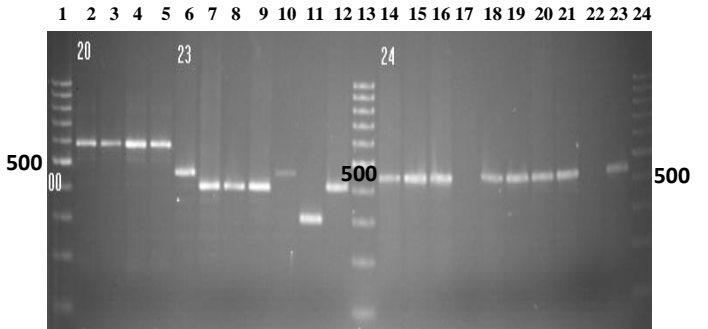
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1, 14 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 7, **MIRU 27** cepas CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20. Carriles 8 – 13, **MIRU 26** cepas CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20.



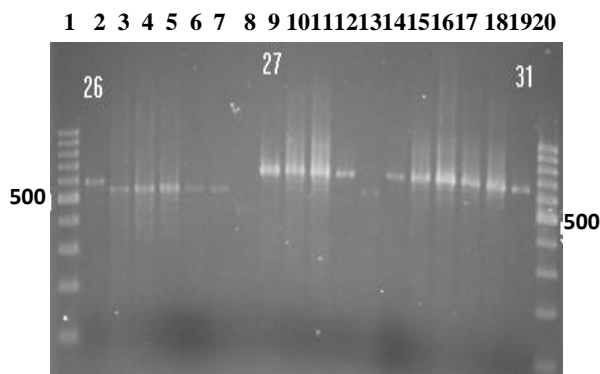
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1, 20 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 7, **MIRU 40** cepas CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20. Carriles 8 – 13, **MIRU 39** cepas CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20. Carriles 14 – 19, **MIRU 31** cepas CI10, CI14, CI15, CI17, CI18, CI20.



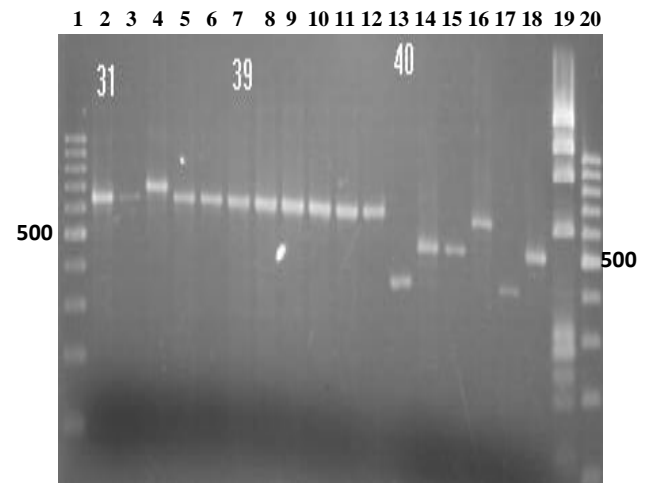
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1, 20 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 7, **MIRU 2** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21. Carriles 8 – 13, **MIRU 4** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21. Carriles 14 – 19, **MIRU 10** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21. Carriles 21 – 26, **MIRU 16** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21. Carriles 27 – 35, **MIRU 20** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21, CI01, CI02, CI04.



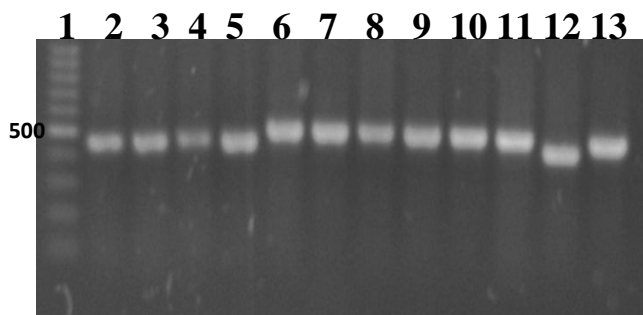
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1, 13, 24 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 5, **MIRU 20** cepa CI05, CI06, CI07, CI08, CI09. Carriles 6 – 12, **MIRU 23** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21, CI09. Carriles 13 – 23 **MIRU 24** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21, CI05, CI06, CI07, CI09.



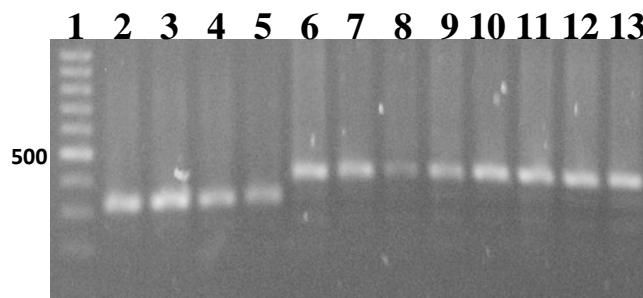
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1, 20 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 8, **MIRU 26** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21, CI15. Carriles 9 – 18, **MIRU 27** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21, CI04, CI05, CI06, CI09. Carril 19, **MIRU 31** cepa CI11.



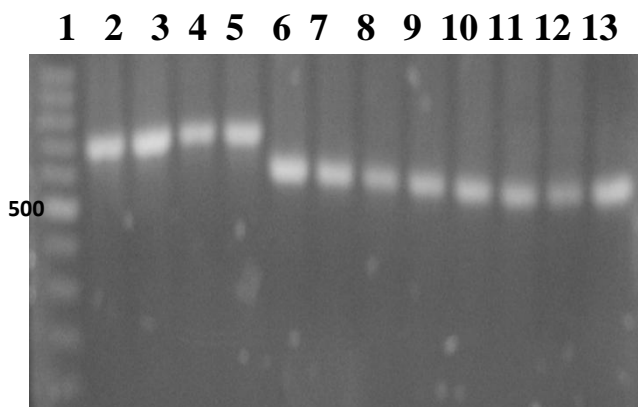
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1, 20 Marcador de Peso Molecular (PM). Carriles 2 – 6, **MIRU 31** cepas CI12, CI13, CI16, CI19, CI21. Carriles 7 – 12, **MIRU 39** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21. Carriles 13 – 18, **MIRU 40** cepas CI11, CI12, CI13, CI16, CI19, CI21.



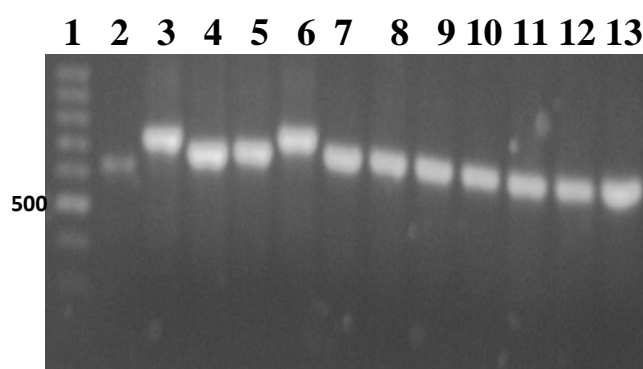
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 2**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.



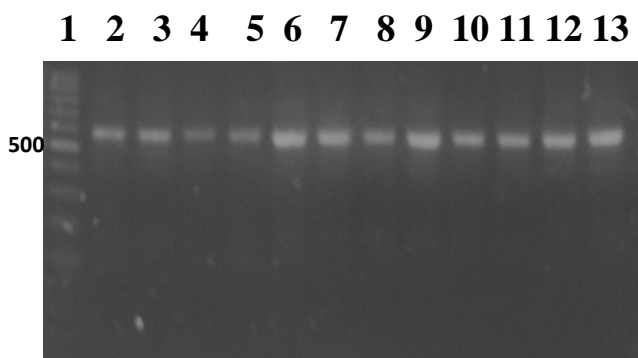
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 4**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.



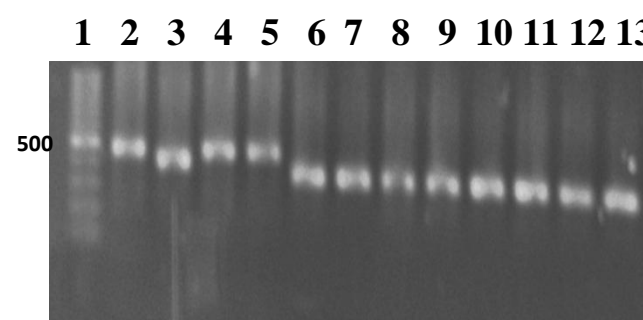
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 10**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.



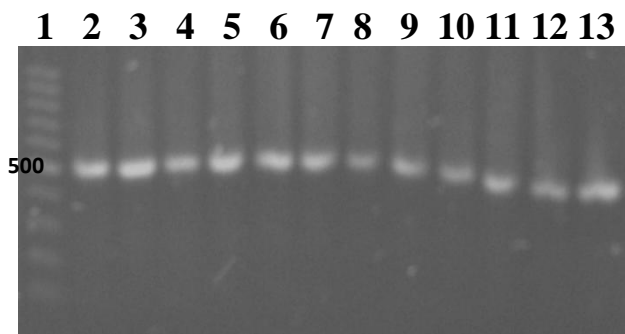
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 16**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.



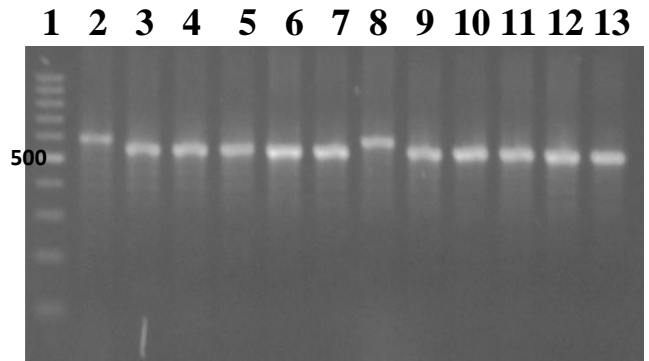
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 20**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.



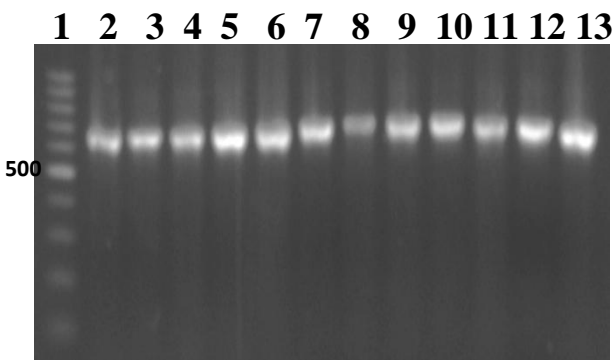
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 23**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.



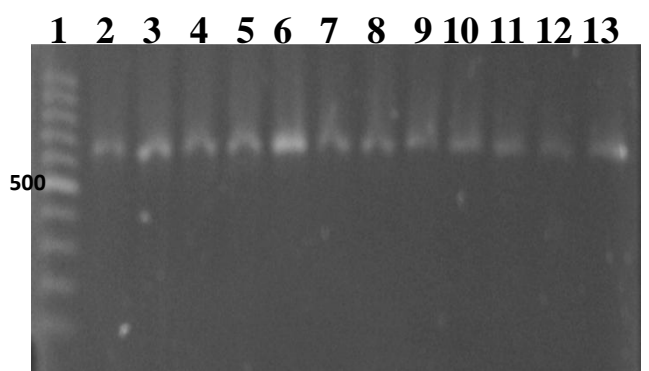
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 24**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.



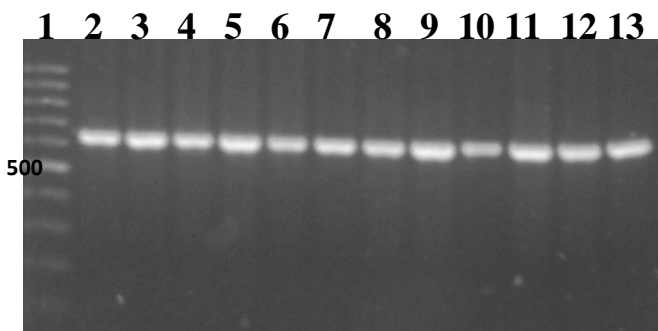
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 26**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.



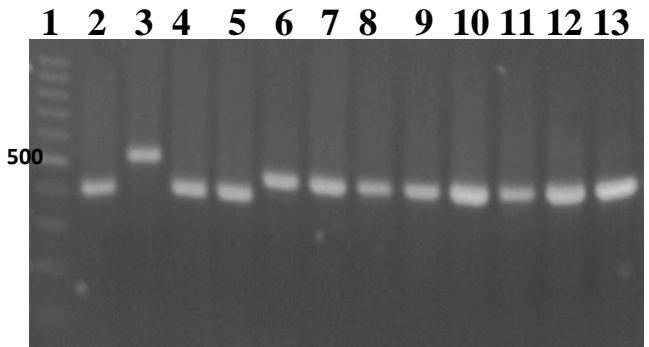
Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 27**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.



Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 31**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.

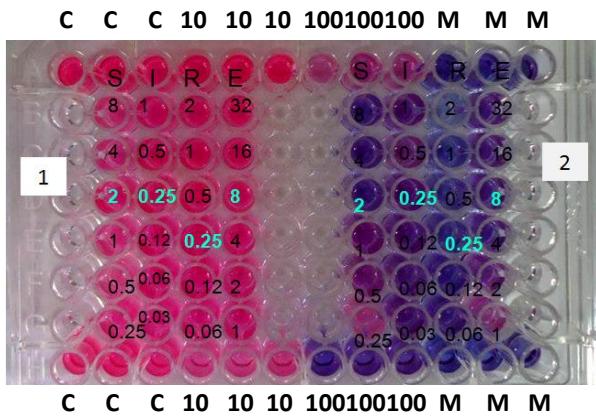


Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU39**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.

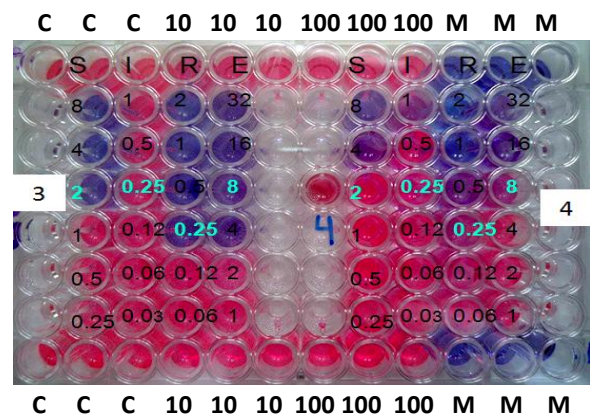


Electroferograma de VNTR-MIRU de 12 loci, Carril 1 Marcador de Peso Molecular (PM). **MIRU 40**, carriles 2 – 13, cepas CI27, CI28, CI29, CI30, CI31, CI32, CI33, CI34, CI36, CI36, CI37, CI38.

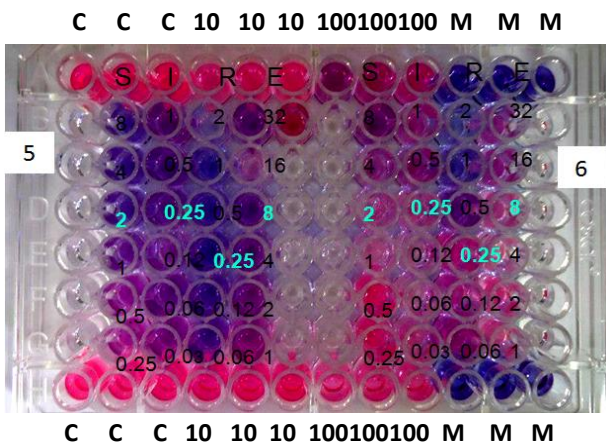
Apéndice II. Alamar Azul



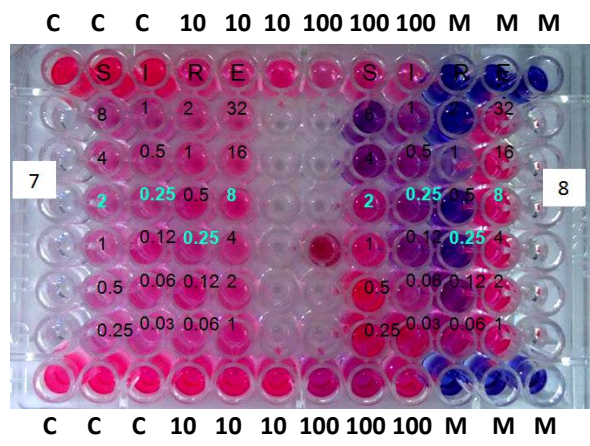
Revelado de placa para CI01, Fenotipo: **MDR**; y CI02, Fenotipo: **H**.



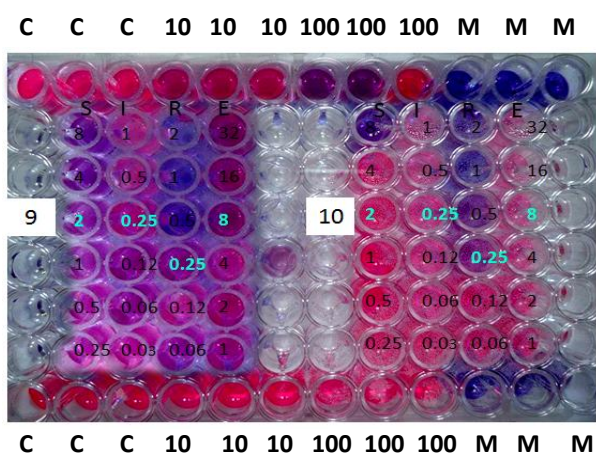
Revelado de placa para CI03, Fenotipo: **H**; y CI04, Fenotipo: **MDR**.



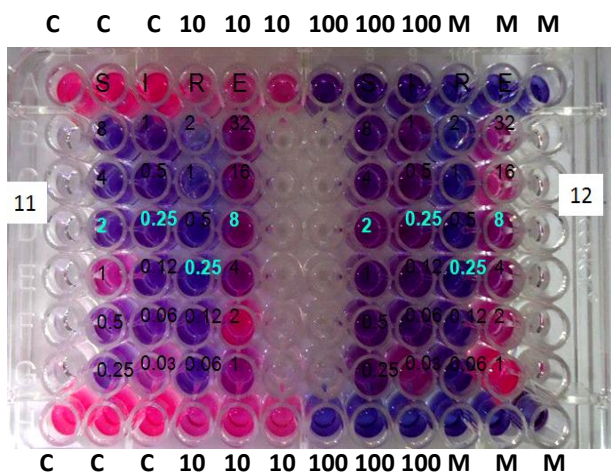
Revelado de placa para CI05, Fenotipo: **PS**; y CI06, Fenotipo: **MDR**.



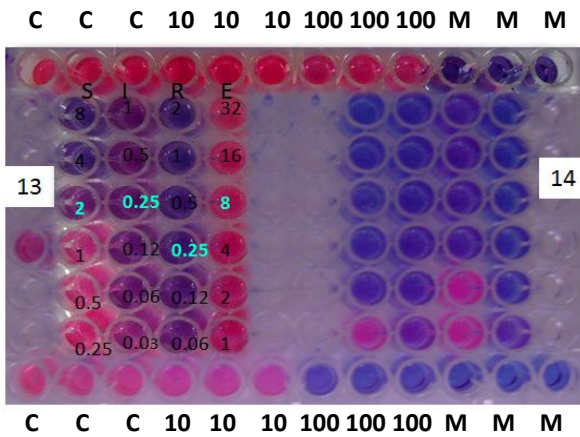
Revelado de placa para CI07, Fenotipo: **MDR**; y CI08, Fenotipo: **SHE**.



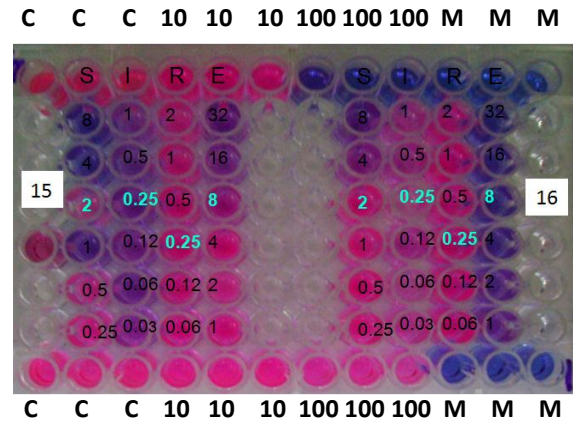
Revelado de placa para CI09, Fenotipo: **MDR**; y CI10, Fenotipo: **MDR**.
 Controles de cepa (C), dilución de cepa (1:10, 1:100) y medio (M);



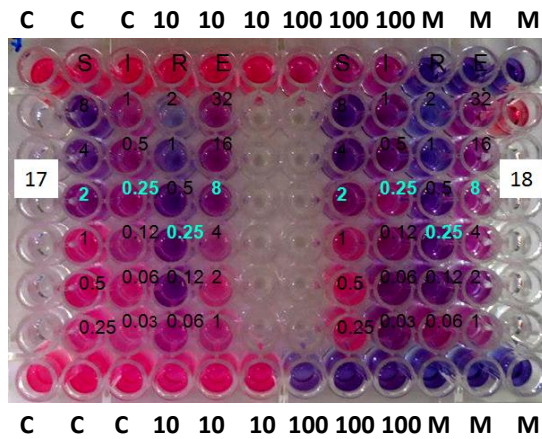
Revelado de placa para CI11, Fenotipo: **E**; y CI12, Fenotipo: **SHE**.



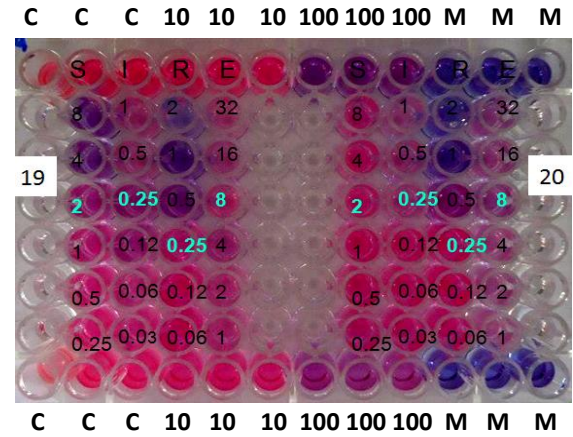
Revelado de placa para CI13, Fenotipo: **SHE**; y CI14, Fenotipo: **PS**.



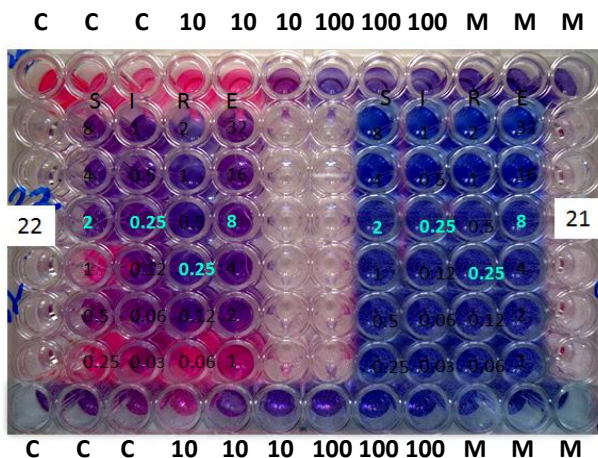
Revelado de placa para CI15, Fenotipo: **SER**; y CI16, Fenotipo: **SHE**.



Revelado de placa para CI17, Fenotipo: **SHE**; y CI18, Fenotipo: **MDR**.

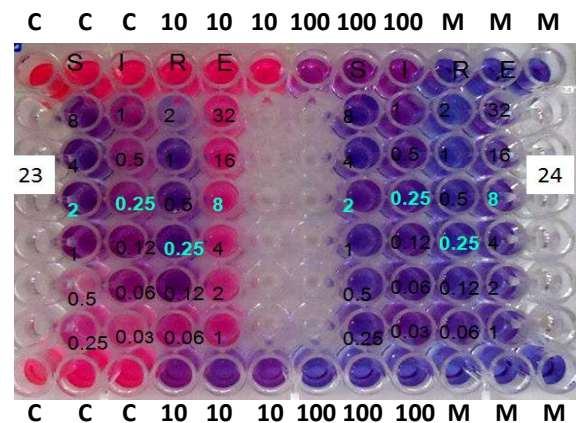


Revelado de placa para CI19, Fenotipo: **MDR**; y CI20, Fenotipo: **MDR**.

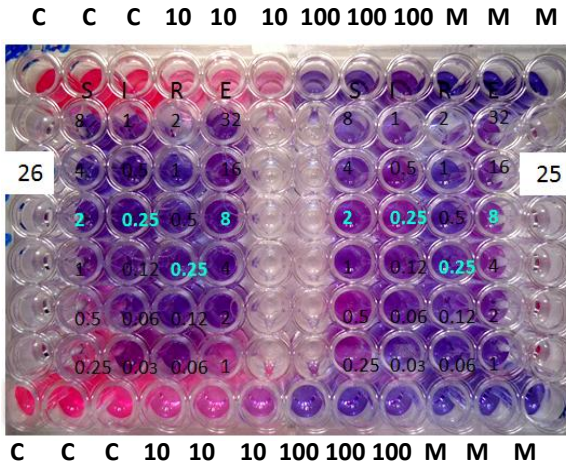


Revelado de placa para CI21, Fenotipo: **ND**; y CI22, Fenotipo: **PS**.

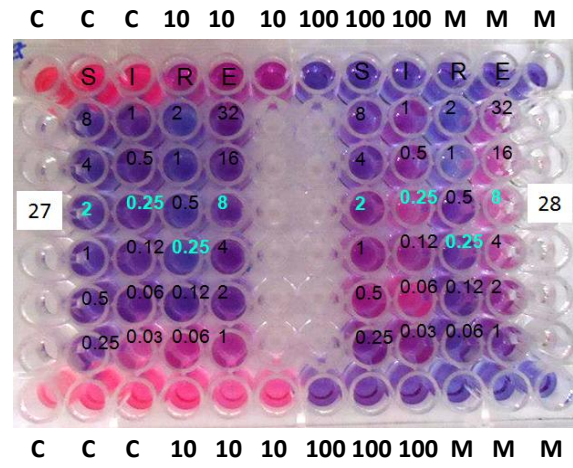
Controles de cepa (C), dilución de cepa (1:10, 1:100) y medio (M);



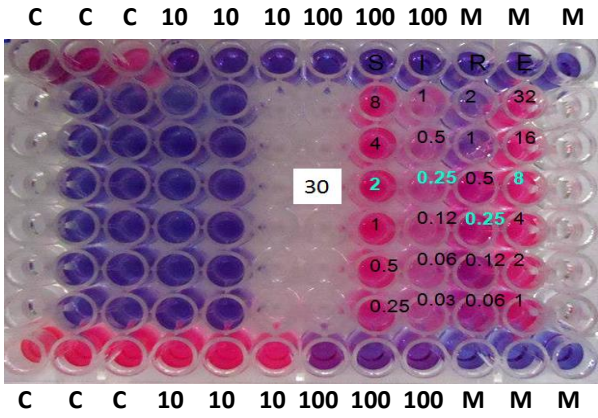
Revelado de placa para CI23, Fenotipo: **MDR**; y CI24, Fenotipo: **PS**.



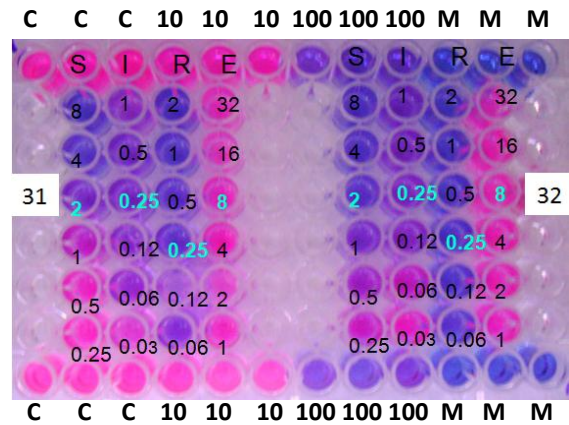
Revelado de placa para CI25, Fenotipo: **SHE**; y CI26, Fenotipo: **PS**.



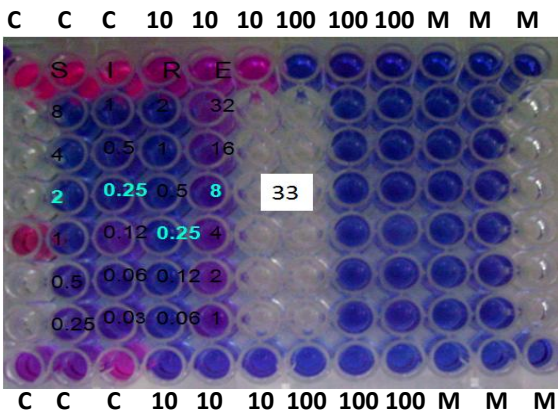
Revelado de placa para CI27, Fenotipo: **PS**; y CI28, Fenotipo: **MDR**.



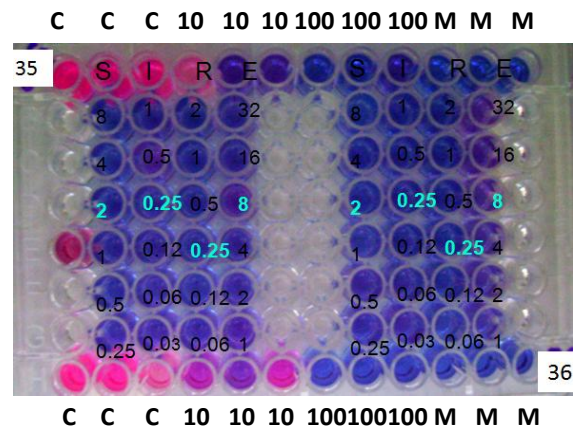
Revelado de placa para CI29 – CI30, Fenotipo: **SHE**.



Revelado de placa para CI31, Fenotipo: **E**; y CI32 – CI34, Fenotipo: **E**.

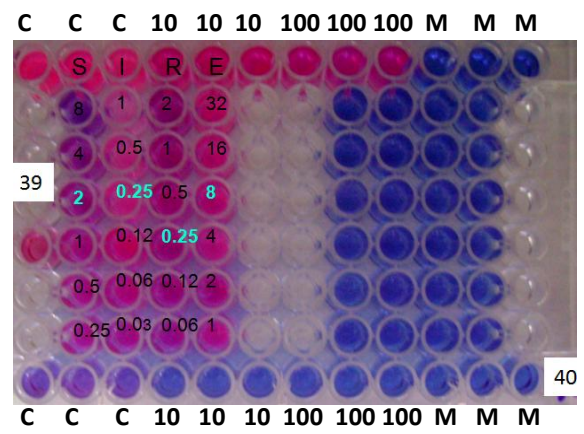
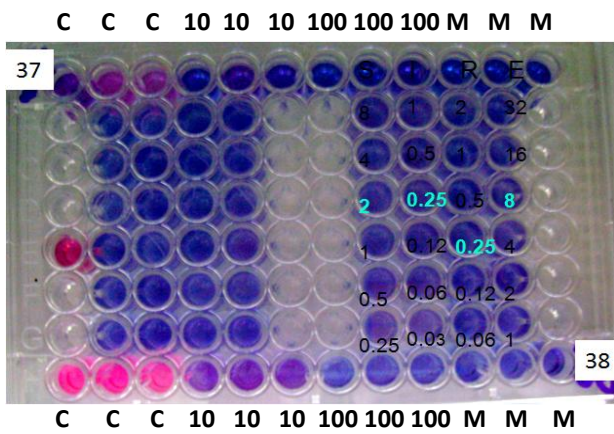


Revelado de placa para CI33, Fenotipo: **E**.



Revelado de placa para CI35, Fenotipo: **PS**; y CI36, Fenotipo: **PS**.

Controles de cepa (C), dilución de cepa (1:10, 1:100) y medio (M);



Revelado de placa para CI37, Fenotipo: **ND**; y CI38, Fenotipo: **PS**.

Controles de cepa (C), dilución de cepa (1:10, 1:100) y medio (M);

Revelado de placa para CI39, Fenotipo: **MDR**; y CI40, Fenotipo: **ND**.