

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y
BIOQUÍMICAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA

INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD



TESIS DE GRADO

**VERIFICACION DE VARIACIONES DE PERFILES DE
SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSAS DE
PRIMERA LINEA EN RELACION AL TIEMPO DE
PRIMOCULTIVO Y TEMPERATURA DE EXPOSICION DE
Mycobacterium tuberculosis AISLADAS EN BOLIVIA**

Tesis de grado presentada para la obtención del grado de Licenciatura en Bioquímica

POR: LIZANDRO GUZMAN TORREZ

TUTORA: DRA. MIRTHA CAMACHO PRADO

LA PAZ-BOLIVIA

2019

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD

TESIS DE GRADO

**VERIFICACION DE VARIACIONES DE PERFILES DE
SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSAS DE
PRIMERA LINEA EN RELACION AL TIEMPO DE
PRIMOCULTIVO Y TEMPERATURA DE EXPOSICION DE
Mycobacterium tuberculosis AISLADAS EN BOLIVIA**

Presentado por: Univ. Lizandro Guzman Torrez

Para optar el grado académico de Licenciado en Bioquímica

Nota numeral:.....

Nota literal:.....

Ha sido aprobado con distinción

Director de carrera de Bioquímica: Dr. Yohel Jiménez Velarde

Tutora: Dra. Mirtha Camacho Prado

Tribunal: M.Sc. Aneth Maria Vasquez Michel

Tribunal: Dr. Miguel Estenssoro C.

DEDICATORIA

A mis padres Teófilo Guzman M. y Clarett Torrez G.
cuyo ejemplo y virtudes transmitidas
completan mi formación.

AGRADECIMIENTOS

Lo mejor de la vida es pasarla junto a las personas y seres que amamos, doy gracias a la vida por poner a cada persona en el momento preciso en mi camino, a mi tutora Dra. Mirtha Camacho por permitirme realizar este trabajo junto a ella y a todo su equipo de trabajo conformado por personas ejemplares que me transmitieron su experiencia el fruto de años de trabajo y las palabras de aliento de cada uno de ellos Dr. Gualberto Limache y Biotec. Luis Calderón.

Agradezco la presencia de amigos en cada paso, gracias por su tiempo, gracias por sus palabras, por sus motivaciones día a día sin parar, Claudia Plaza, Richard Quispe mis amigos, compañeros de trabajo y futuros colegas a ustedes sin duda les doy gracias por estar presentes en esos momentos difíciles.

A mi hermana Erika Guzman Torrez y por su puesto a todo el ejército de personas importantes en mi vida que son la motivación e inspiración de cada paso en mi vida.

TABLA DE ABREVIATURAS

RNLT:	Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis
LNR:	Laboratorio de Referencia Nacional
DM:	Diabetes mellitus
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia humana
LAC:	Latinoamérica y el Caribe
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OPS:	Organización Panamericana de la Salud
PNT:	Programa Nacional de Control de la Tuberculosis
TB:	Tuberculosis
TB-MDR:	Tuberculosis multidrogorresistente
TB/VIH:	Co-infección por tuberculosis y VIH
ADN:	Acido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
RIF:	Rifampicina
INH:	Isoniazida
EMB:	Etambutol
SM:	Estreptomicina
ONG:	Organizaciones no gubernamentales
INLASA	Instituto Nacional de Laboratorios en Salud
ARNP:	ARN-polimerasa
LPM:	Lipoarabinomanano
MTC:	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

PG:	Peptidoglicano
AG:	Arabinogalactano
mAGP:	micolilarabinogalactan-peptidoglicano
LM:	Lipomanano
PIM:	Fosfatidil inositol manósidos
GlcNAc:	N-acetilglucosamina
Mur:	Ácido muramico
RNAr:	Ácido ribonucleico ribosómico
RNAm:	Ácido ribonucleico mensajero
RNAt:	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP:	Adenosin trifosfato
NAD:	Nicotinamida adenina dinucleótido
UDP:	Uridina difosfato

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCION	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.2. JUSTIFICACION	5
2. OBJETIVOS	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos	6
Pregunta de investigación	6
Hipótesis	6
3. MARCO TEORICO	6
Tuberculosis.....	6
Tuberculosis en el mundo	7
Tuberculosis en las Américas	8
Tuberculosis en Bolivia	9
Programa Nacional de Control de la Tuberculosis.....	11
Laboratorio de Referencia Nacional de tuberculosis 2016.....	11
Características microbiológicas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
Estructura, función y síntesis de la pared celular.....	13
Estructura de mAGP.....	14
Biosíntesis de mAGP	14
Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
Características de los cultivos.....	15
Requerimientos nutricionales.....	15
Aislamiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
Efecto de la temperatura en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
Prueba de susceptibilidad de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por el método de las proporciones Canetti-Rist.....	18
Envejecimiento biológico en procariontas	19
4. Antibióticos y mecanismo de acción	20

Interferencia con la síntesis de la pared celular	21
Inhibición de la síntesis de proteínas	21
Inhibidores de la fase de activación	22
Inhibidores del inicio de la síntesis proteica	22
Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos.....	22
Antibióticos activos en la membrana citoplasmática.....	23
Resistencia bacteriana a antibióticos	23
Aspectos bioquímicos de resistencia	24
Inactivación de antibióticos	25
Inactivación por hidrolisis	25
Inactivación de antibióticos por transferencia de grupos.....	26
Inactivación de antibióticos por reacciones redox	26
Modificación del sitio de acción.....	28
Alteración de la estructura del peptidoglicano	29
Interferencia en la síntesis de proteínas	29
Interferencia en la síntesis de ADN	29
Bombas de eflujo y permeabilidad de la membrana externa	30
Bombas de eflujo	30
Aspectos genéticos de resistencia	32
Mutación	33
Mutaciones espontaneas	34
Mutagénesis adaptativa.....	35
Hipermutadores.....	35
Tratamiento y medicamentos de primera línea para la tuberculosis	36
Rifampicina.....	36
Mecanismo de acción.....	37
Mecanismo de resistencia a Rifampicina.....	38
Isoniazida	39
Mecanismo de acción.....	40
Mecanismo de resistencia a isoniazida	40
Etambutol.....	41

Mecanismo de acción.....	42
Mecanismo de resistencia a etambutol	42
Estreptomina	43
Mecanismo de acción.....	43
Mecanismo de resistencia a estreptomina.....	43
Resistencia en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	44
Mecanismos de resistencia en <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	44
Resistencia intrínseca.....	45
Resistencia adquirida	46
5. DISEÑO METODOLOGICO	47
Preparación de los medios de cultivo con y sin drogas antituberculosas de primera línea	51
Preparación del medio de cultivo Lowenstein-Jensen sin drogas.....	51
Preparación del medio Lowenstein-Jensen con drogas	52
Determinación de la viabilidad y crecimiento de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a diferentes temperaturas en función al tiempo de envejecimiento	53
Determinación de perfiles de resistencia de cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a diferentes temperaturas en función al tiempo de envejecimiento	55
6. RESULTADOS	57
7. DISCUSION.....	70
8. CONCLUSIONES.....	76
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa que afecta a toda la población sobre todo en países de bajos recursos económicos, su detección por métodos convencionales (cultivo y baciloscopia) y aplicación del método de las proporciones Canetti-Rist depende mucho del envío oportuno de los cultivos al LRN. Para evaluar el efecto que tiene el tiempo y la temperatura de envejecimiento en los perfiles de resistencia en cultivos provenientes de la RNLT se determinó el efecto que tienen sobre la viabilidad y el perfil de resistencia de los cuales se tomaron 64 muestras separadas en dos grupos determinando su viabilidad a 37° C y a temperatura ambiente que comprendía entre 16 y 20° C por un periodo de envejecimiento de 70 y 90 días de antigüedad.

La determinación de la viabilidad se efectuó realizando una suspensión de las colonias de los cultivos eugonicos enviados, la concentración de la suspensión se diluyo aun factor de 1:10 en una batería de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , de las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-6} se tomaron 200 uL y se inocularon en medios de cultivo Lowenstein-Jensen sin droga. Para determinar los perfiles de resistencia se utilizó el mismo procedimiento de dilución de las colonias de los medios de cultivo y de las mismas formas se inocularon las diluciones en medios de cultivo Lowenstein-Jensen con drogas incluidas (INH, RIF, EM, SM) y se identificaron los perfiles de susceptibilidad por el método de las proporciones de Canetti-Rist.

Los resultados mostraron viabilidad en los medios de cultivo a diferentes diluciones y periodos de envejecimiento de acuerdo a la temperatura aplicada; en una de las muestras de estudio se observó desarrollo similar a una biopelícula. Durante la determinación de los perfiles de susceptibilidad se identificaron cambios de susceptibilidad en medio Lowenstein-Jensen que incluía estreptomycin, por lo que se verifica un cambio en el perfil de susceptibilidad a una temperatura de exposición de 37° C, por esta verificación se plantea que el tiempo límite de ejecución al método de las proporciones Canetti-Rist tenga como fecha límite 70 días como máximo para su ejecución.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, envejecimiento en procariotas, susceptibilidad, viabilidad, método de las proporciones Canetti-Rist

SUMMARY

Tuberculosis is a contagious disease that affects the entire population, especially in low-income countries, its detection by conventional methods (culture and smear) and application of the Canetti-Rist proportions method depends a lot on the timely shipment of the crops to the LRN. To assess the effect of time and the temperature of aging on resistance profiles in crops from RNLT, the effect on the viability and resistance profile of which 64 separate samples were taken in two groups was determined by determining its viability at 37° C and at room temperature between 16 and 20° C for an aging period of 70 and 90 days old.

The viability determination was made by suspending the colonies of the eugonic cultures sent, the concentration of the suspension was diluted even a factor of 1:10 in a battery of 10-1, 10-2,10-3,10- 4,10-5 and 10-6, of the dilutions 10-3,10-5 and 10-6, 200 uL were taken and inoculated in Lowenstein-Jensen culture media without drug. To determine the resistance profiles, the same procedure of dilution of the colonies of the culture media was used and in the same ways the dilutions were inoculated in Lowenstein-Jensen culture media with drugs included (INH, RIF, EM, SM) and Susceptibility profiles were identified by the Canetti-Rist proportions method

The results showed viability in the culture media at different dilutions and aging periods according to the temperature applied; development similar to a biofilm was observed in one of the study samples. During the determination of the susceptibility profiles, susceptibility changes were identified in Lowenstein-Jensen medium that included streptomycin, so that a change in the susceptibility profile at an exposure temperature of 37 ° C is severed, for this verification it is stated that the time limit of execution to the method of the proportions Canetti-Rist has as a maximum date 70 days for its execution.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, aging in prokaryotes, susceptibility, viability, method of Canetti-Rist proportions.

1. INTRODUCCION

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad provocada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, que se encuentra distribuida por todo el mundo y continúa siendo una de las causas principales de morbilidad y mortalidad. En el 2016, 10,4 millones de personas fueron diagnosticadas con tuberculosis y 1,7 millones murieron a causa de esta patología (entre ellos, 0,4 millones de personas con VIH). Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos (OMS, 2016).

Esta infección bacteriana es posible curarla a base de antibióticos antituberculosos que se han desarrollado a lo largo de décadas de estudio, sin embargo, el tratamiento oportuno y eficaz depende de las pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas otorgando resultados confiables. En Bolivia el método de las proporciones Canetti-Rist que tiene la capacidad de informar el número total de bacilos utilizados durante la prueba y muestra la proporción de bacilos resistentes que existen en la cepa a probar lo que la convierte en la prueba Gold-Standard en el ámbito bacteriológico y es la que se emplea a nivel Nacional y de Sudamérica (Canetti, G. Rist, N. Grosset, J. 1963).

En el país el Programa Nacional de Control de la Tuberculosis (PNT) es la estructura oficial que controla la tuberculosis y cuenta con 58 laboratorios que realizan cultivo y 590 laboratorios que realizan baciloscopia (Tabla 1) distribuidos por todo el país tanto en sus ciudades capitales como en sus provincias, las cuales están dedicadas a cultivar muestras de esputo y otros líquidos corporales de pacientes infectados con la bacteria, así mismo estos son los encargados de hacer llegar a la brevedad posible los cultivos al LRN en donde se lleva a cabo la prueba de resistencia a drogas antituberculosas de primera y segunda línea por el método ya mencionado (Laboratorio de Referencia Nacional, 2016).

Para que la persona infectada tenga un esquema de tratamiento eficaz y certero la prueba requiere de cultivos frescos de *Mycobacterium tuberculosis* que tengan un periodo de desarrollo de no menos a 30 días de incubación primaria y no mayor a 60 días desde la fecha de inoculación de la muestra. Las bacterias que son resistentes a isoniazida tienen un tiempo de duplicación menor que una cepa sensible por lo que realizar una prueba en cultivos con desarrollo inferior a 30 días podría causar un antibiograma con falsa sensibilidad, por otro lado no se conocen los efectos del antibiograma realizado con un periodo mayor a 60 días dejando dudas en la confiabilidad del resultado, una vez que se verifica el desarrollo en base a su fecha de inoculación (primocultivo) este desarrollo debe estar entre 30 y 60 días y deben ser referidos a estudio (Canetti, G. Rist, N. Grosset, J. 1963).

El presente trabajo nos permitirá determinar la fecha límite de ejecución del método de las proporciones Canetti-Rist a drogas de primera línea para el tratamiento de TB verificando los perfiles de resistencia en función al tiempo de antigüedad y la temperatura de exposición de los cultivos primarios de *Mycobacterium tuberculosis*, lo cual será de gran utilidad para el personal de salud lo que permitirá dar un tratamiento adecuado y eficaz beneficiando directamente al paciente con esquemas de tratamiento certeros.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El LRN en su base de datos, registró cultivos que excedían los 60 días de primocultivo llegando hasta los 77 días (17 días por encima del límite establecido por norma internacional), el efecto sobre los perfiles de susceptibilidad y desarrollo son desconocidos llegando a crear dudas en la aplicación de los resultados del antibiograma al esquema de tratamiento por lo que este estudio pretende disipar estas dudas mostrando datos de los antibiogramas por fuera del tiempo establecido (Laboratorio de Referencia Nacional, 2016).

Se cree que el perfil de susceptibilidad podría ser afectado en relación a su antigüedad debido a posibles modificaciones que se puedan presentar en la maquinaria metabólica del bacilo afectando su viabilidad, es decir que estos cultivos contengan bacilos sin la capacidad para desarrollarse dando como resultados falsos perfiles de susceptibilidad siendo este como primer problema a abordar, es importante determinar las colonias contables de *Mycobacterium tuberculosis* ya que una disminución o la pérdida total de esta capacidad podrían dar falsos sensibles.

Estudios referidos en base al efecto de la temperatura sobre el desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis H37Ra* demostraron que la viabilidad disminuye en función al tiempo y temperatura de exposición y que los lípidos que componen la membrana celular son afectados por estas variantes, por lo que los sitios de acción a drogas antituberculosas podrían ser alterados y estos podrían verse reflejados en los perfiles de susceptibilidad (Takayama, K. et al 1978). Como segundo problema a abordar es demostrar si estas variantes influyen en los perfiles de resistencia de los bacilos aislados.

El PNT cuenta con una red de Laboratorios distribuidos por todo el país que realizan cultivo de micobacterias dando cobertura al diagnóstico, pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas e identificación de micobacterias. De las pruebas bacteriológicas mejor conocidos y establecidos en américa latina y en Bolivia es el método de las proporciones (Canetti-Rist).

Para ejecutar esta prueba se requiere de condiciones como cultivos eugonicos, frescos, que no presenten resequeidad del medio de cultivo y que tengan un crecimiento mayor a 30 días en base a la fecha de primocultivo, por otro lado, la bibliografía internacional recomienda no realizar la prueba de sensibilidad y resistencia en cultivos con un desarrollo de más de 60 días por presentar resultados dudosos. En trabajos internacionales no se han presentado resultados que aclaren esta problemática (Canetti, G. Rist, N. Grosset, J. 1963).

Los problemas operativos, sociales y económicos que presenta nuestro país son los que retrasan la llegada de los de cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* al LRN por lo que una ejecución del método de las proporciones Canatti-Rist podría llegar a tener una fecha de primocultivo mayor a lo establecido por norma lo que provocaría un resultado inherente a la bacteria y no al huésped.

En Bolivia no se han reportado estudios en perfiles de resistencia que tengan un crecimiento mayor a 60 días de incubación a 37°C y a temperatura ambiente a base de la fecha de inoculación y como este afecta a los perfiles de resistencia, esta situación plantea el desafío de enviar los cultivos en el menor tiempo posible al LRN para la ejecución de la prueba de susceptibilidad a drogas antituberculosas, no siendo factible cumplir la recomendación por diferentes razones sobre todo operativas, relativas a la imposibilidad de remitir los cultivos, es por esta razón que se plantea verificar el efecto del tiempo y temperatura sobre los perfiles de resistencia a medicamentos antituberculosos de primera línea (Canetti, G., Rist, N. 1963).

1.2. JUSTIFICACION

Todas las pruebas de laboratorio requieren que las muestras de estudio cumplan con ciertos requisitos para tener confiabilidad en el resultado, y el método de las proporciones Canetti-Rist no es la excepción, su confiabilidad en los resultados se basa en obtener primocultivos de estudio frescos y eugonicos que permitan tener una población representativa de bacilo en estudio.

Como ya se mencionó con anterioridad una ejecución de la prueba de susceptibilidad con una temperatura de incubación de 37°C por un periodo mayor a 60 días no está claro por lo que despejar esta duda tiene una importancia relevante en el tratamiento de pacientes que están infectados por el bacilo, los resultados certeros ayudaran al paciente en su tratamiento dando un esquema correcto, certero y efectivo. Por otra parte, el personal de salud se beneficiará con resultados confiables.

El presente trabajo pretende complementar el método de las proporciones Canetti-Rist verificando los posibles cambios en los perfiles susceptibilidad en base a la fecha de inculo primario en relación al tiempo y exposición a la temperatura, por otra parte,

determinar la viabilidad de los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas antituberculosas de primera línea que se encuentren con periodos de incubación superior a los 60 días de aislamiento primario.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

- ✓ Verificar la variación de los perfiles de susceptibilidad a drogas antituberculosas de primera línea por el método de Canetti-Rist en relación al tiempo y temperatura de exposición de primocultivos de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Bolivia.

Objetivos específicos

- ✓ Determinar la viabilidad de los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* en periodos de tiempo entre 30-60 días y a los 70 y 90 días de envejecimiento del primocultivo en relación a la temperatura de exposición.
- ✓ Determinar la influencia de la temperatura de exposición en los perfiles de susceptibilidad por el método de Canetti-Rist en cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas antituberculosas de primera línea en periodos de tiempo entre 30-60 días y a los 70 y 90 días de envejecimiento del primocultivo.
- ✓ Determinar el tiempo límite de ejecución del método de las proporciones Canetti-Rist a drogas antituberculosas de primera línea en base a la fecha de primocultivo.

Pregunta de investigación

¿El perfil de susceptibilidad a drogas antituberculosas de *Mycobacterium tuberculosis* en relación al tiempo y exposición a la temperatura tendrá alguna variación?

Hipótesis

- El perfil de susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* varía en relación a la antigüedad del aislamiento y exposición a la temperatura siendo diferentes a medida que avanza el tiempo del cultivo, lo que ocasiona resultados erróneos y por consiguiente un esquema de tratamiento incorrecto.

3. MARCO TEORICO

Tuberculosis

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la Tuberculosis (TB) es una enfermedad contagiosa provocada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, este microorganismo ingresa por medio de inhalación hacia los pulmones lugar donde se ubican para su replicación afectando principalmente a los pulmones. La tuberculosis pulmonar es

la forma más frecuente de la infección observándose casos con más del 80% de incidencia que por otra parte es la forma contagiosa de la enfermedad. La tuberculosis extra-pulmonar que es la que infecta otras partes del cuerpo además de los pulmones como: ganglios linfáticos, columna vertebral, articulaciones, tracto genitourinario, sistema nervioso central en si la tuberculosis puede afectar cualquier parte del organismo (OMS, 2016).

La TB se desarrolla en dos etapas: la primera es cuando un individuo es infectado por otro individuo infectado y la segunda etapa cuando se desarrolla la enfermedad. La enfermedad se desarrolla en función a la concentración de bacilos en los pulmones y la difusión del aire hacia ellos. La persona infectada tose libera a los microorganismos en pequeñas gotas suspendiéndose por varias horas llegando a secarse así la persona que ingresa en la habitación inhala estas gotas y se contagia. Las personas infectadas por la tuberculosis no presentan los síntomas asociadas con la infección (OMS, 2016).

Entre los pacientes con TB alrededor de un 89-90% no desarrollan la enfermedad a menos que se encuentren inmunológicamente comprometidos (OMS, 2016).

Tuberculosis en el mundo

En el 2015 el mayor número de nuevos casos de tuberculosis se registró en Asia, con un 61% de incidencia, seguido de África, con una incidencia del 26%. Por otra parte, alrededor del 87% de nuevos casos de tuberculosis se registraron en 30 países considerados de alta carga de morbilidad por esta enfermedad (figura 1). Seis de ellos acaparan el 60% de los nuevos casos de tuberculosis: la India, Indonesia, China, Nigeria, el Pakistán y Sudáfrica. El logro de avances a nivel mundial está supeditado a la mejora de los servicios de prevención y tratamiento de la tuberculosis en los citados países.

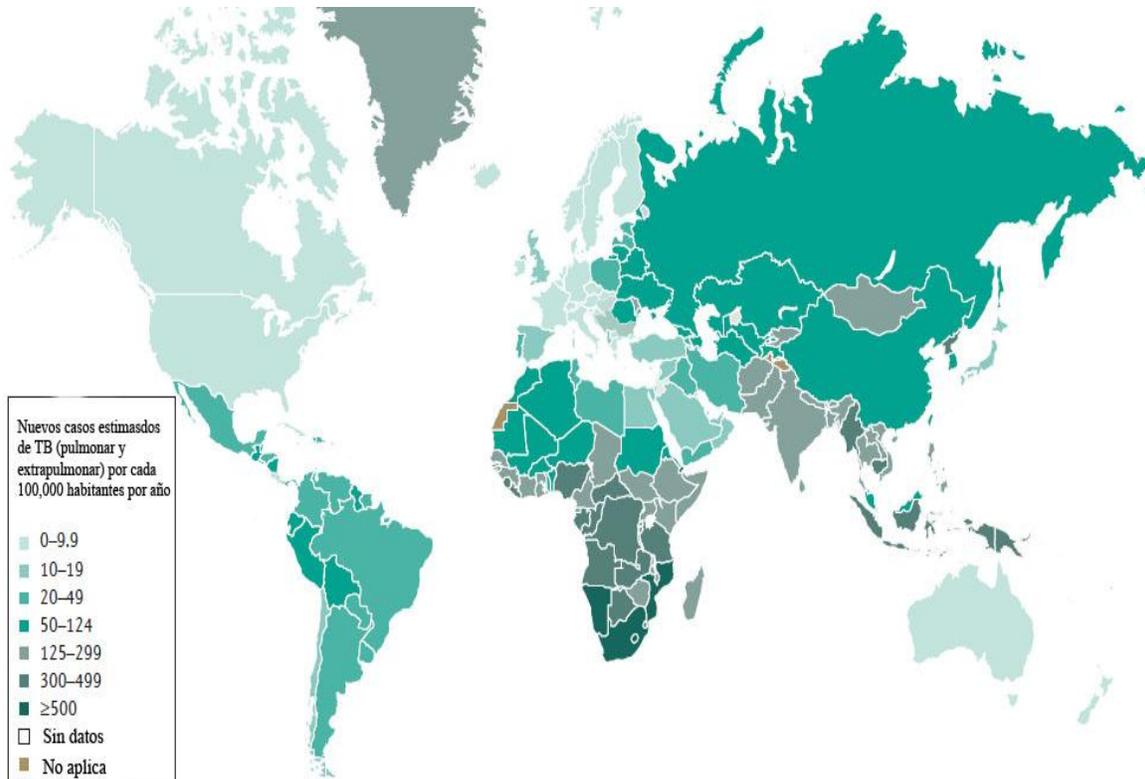


Figura 1. Incidencia global de la enfermedad activa de TB (pulmonar y extra pulmonar). Los países de altos ingresos económicos, incluidos la mayoría de los países de Europa occidental, Canadá, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelandia, tienen las tasas más bajas de tuberculosis activa, por lo general <10 casos por 100.000 habitantes por año. Por el contrario, los países de bajos ingresos económicos tienen tasas más altas de TB. Los datos para fundamentar estas estimaciones se adquirieron mediante una combinación de notificaciones de casos con opiniones de expertos, encuestas de prevalencia, notificaciones de casos con ajustes estándar y metodologías de captura-recaptura. Reimpreso del Informe Mundial sobre la Tuberculosis 2015, 20ª edición, Organización Mundial de la Salud, Copyright (2015).

Tuberculosis en las Américas

En las Américas la tuberculosis es considerada una enfermedad peligrosa y problemática para la salud pública en todo el mundo, en la región de las Américas en donde se estiman aproximadamente 270, 000 casos y 23, 000 muertos cada año por esta enfermedad la OMS estima los casos notificados aumenta cada año (figura 2) . La TB afecta preponderantemente a las poblaciones más vulnerables, entre las que se cuentan las personas con bajos recursos económicos y sobre todo individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), personas con diabetes, personas que han desarrollado adicción a drogas, alcohol, tabaco y otro tipo de adicciones. La concentración de la TB en grandes ciudades como Guayaquil, Lima y Montevideo, se reportan más del 50% de todos los casos del país y también la mayoría de los casos con TB resistente a los medicamentos. Son las grandes ciudades las que también concentran los mayores desafíos sociales y que cuentan con áreas urbanas y suburbanas con mayor número de habitantes que podrían

diseminan con mucha facilidad la infección. La pobreza y extrema pobreza son otros factores que están implicados en la incidencia de tuberculosis (OMS 2018).



Nº	PAÍS	CASOS ESTIMADOS	PORCENTAJE SOBRE EL TOTAL DE CASOS	PORCENTAJE ACUMULADO
1	Brasil	91.000	32%	32%
2	Perú	37.000	13%	45%
3	México	28.000	10%	55%
4	Haití	20.000	7%	62%
5	Colombia	16.000	6%	68%
6	Venezuela	13.000	5%	73%
7	Argentina	12.000	4%	77%
8	Bolivia	12.000	4%	81%
9	Estados Unidos	10.000	4%	85%
10	Ecuador	7.200	3%	87%
	Resto de América	35.800	13%	100%
	Total	282.000	100%	100%

Figura 2. Países con mayor número de casos estimados de TB en las Américas en el año 2017 (OMS 2018).

Tuberculosis en Bolivia

En Bolivia la tuberculosis continúa representando un problema de salud relevante. Desde 1990 hasta la actualidad, la prevalencia y la tasa de incidencia notificada, han disminuido lentamente, manteniéndose con una brecha entre la tasa de incidencia estimada y notificada de 37,5 % (Figura 3) (Arias, F. Bonilla, C. 2016), para el 2017 Bolivia la OMS reportó los casos estimados en las Américas dejando a nuestro país en el octavo lugar con casos estimados para ese año (OMS 2018).

Tasa de Incidencia Estimada y Notificada de Tuberculosis TSF. Bolivia 2000-2014.

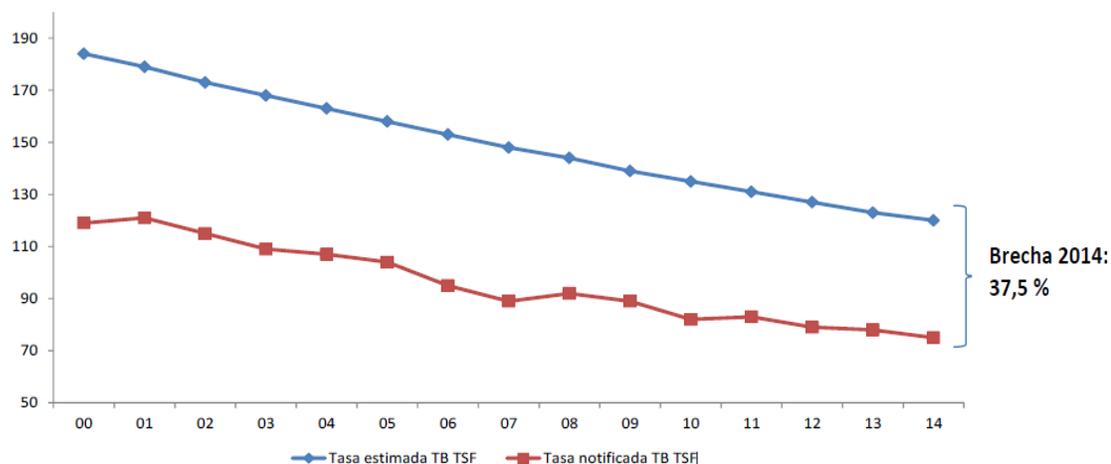


Figura 3. Relación entre la incidencia estimada y notificada en función al tiempo y detección de sintomáticos respiratorios (Laboratorio de Referencia Nacional 2016)

La brecha entre la incidencia notificada y la estimada, se ha mantenido prácticamente constante a lo largo del último decenio; lo cual podría ser atribuido, en consonancia con lo referido anteriormente, a una debilidad en la captación de sintomáticos respiratorios y en el diagnóstico de los casos con TB, ocasionado por un acceso limitado a los servicios de salud y la red de laboratorios, fallas en la identificación del SR por parte del personal de salud y fallas en el transporte de muestras; otro aspecto que podría estar influyendo, es la alta rotación de los recursos humanos en los servicios de salud y en la red de laboratorios, con la consecuente necesidad de capacitación del personal (Arias, F. Bonilla, C. 2016).

La OMS acerca de la incidencia, estimó 13.000 casos nuevos para el año 2014 y el PNCT notificó 7.572 casos en el mismo periodo, lo que significa que según la OMS en el país en promedio se enfermaron de tuberculosis 36 casos/día y según el PNCT en promedio fueron 21 casos/día. Esta situación, es preocupante ya que se pueden estar embalsando casos de tuberculosis en la comunidad. Aunque no todo puede ser explicado por fallas programáticas y debilidades del sistema de salud, sino que también hay que mirar algunos aspectos relacionados con las determinantes sociales y aspectos sociodemográficos, como la pobreza y extrema pobreza, además de la concentración poblacional en zonas urbanas, que por si se convierten en áreas de alta vulnerabilidad y alto riesgo social, donde conviven otras enfermedades infecciosas y crónicas (VIH, DM), además de estilos de vida, que favorecen el desarrollo de la tuberculosis (Arias, F. Bonilla, C. 2016).

Programa Nacional de Control de la Tuberculosis

El Programa Nacional de Control de Tuberculosis cumple con varias funciones operativas desde reducir la transmisión la tasa de morbilidad y mortalidad de TB hasta la realización de pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas. El PNT cuenta con una Red Nacional de Laboratorios distribuidos por todo el país tanto en sus ciudades capitales como en sus provincias (tabla 1) las cuales están encargados de realizar pruebas rápidas como la tinción de Ziehl-Neelsen para la detección del bacilo en muestras de esputo y cultivos para la confirmación de TB y envió de estos al LRN para su realización de perfiles de resistencia por el método de las proporciones Canetti-Rist.

TABLA 1

Cobertura de Red de laboratorios de tuberculosis. Instituto de Laboratorios en Salud Bolivia 2015

SEDES	POBLACION	BACILOSCOPIAS	HABITANTES/BK	CULTIVOS	HABITANTES/LAB. CULTIVOS
LA PAZ	2.741.554	121	22.657	18	152.308
ORURO	490.612	40	12.265	6	81.768
POTOSI	798.664	61	13.092	3	266.221
COCHABAMBA	1.938.401	91	21.301	10	193.840
SUCRE	600.728	49	12.259	9	66.747
TARIJA	508.757	57	8.925	6	84.792
BENI	425.780	36	11.827	2	212.890
SANTA CRUZ	2.776.244	111	25.011	3	925.414
PANDO	109.173	24	4.548	1	109.173
BOLIVIA	10.389.913	590	17.604	58	179.084

Laboratorio de Referencia Nacional de tuberculosis 2016

Características microbiológicas de *Mycobacterium tuberculosis*

EL género *Mycobacterium* está formado por bacilos aerobios inmóviles y no esporulados con un tamaño de 0,2 a 0,6 x 1 a 10 μm . En algunos casos, estos bacilos forman filamentos ramificados; sin embargo, estos pueden romperse con facilidad. La pared celular es rica en lípidos, lo que hace que su superficie sea hidrofóbica confiriendo a las micobacterias resistencia frente a muchos desinfectantes y frente a las tinciones habituales de laboratorio. Cuando han sido teñidos, los bacilos tampoco se pueden decolorar con las soluciones ácidas, motivo por el que reciben el nombre de bacilos acidorresistentes. Debido a que la pared celular de las micobacterias es compleja y a que este grupo de microorganismos es exigente desde el punto de vista nutricional, la mayoría de las micobacterias crecen

lentamente y se dividen cada 12 a 24 horas dependiendo de las fuentes nutricionales que se encuentren en el medio de cultivo. El aislamiento de los microorganismos de crecimiento lento (p. ej., *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium-intracellulare* [complejo *Mycobacterium avium*], *Mycobacterium kansasii*) puede necesitar entre 3 y 8 semanas de incubación (Murray, P. Rosenthal, K. Pfäuer, M., 2007).

Las bacterias se clasifican en el género *Mycobacterium* en función de: 1) su capacidad de acidoresistencia; 2) la presencia de ácidos micólicos con 60 a 90 átomos de carbono que se escinden por pirólisis en ésteres metilo de ácidos grasos de C22 y C26, y 3) un elevado contenido (61%-71%) de guanosina + citosina (G + C) en su ácido desoxirribonucleico (ADN). Las micobacterias poseen una pared celular compleja y rica en lípidos (figura 4). Esta pared celular es la responsable de muchas de las propiedades características de las bacterias (p. ej., su acidoresistencia, crecimiento lento, resistencia a detergentes, resistencia a los antibióticos antibacterianos frecuentes, antigenicidad, formación de agregados). La estructura básica de la pared celular es característica de las bacterias gram positivas: una membrana citoplásmica interna cubierta con una gruesa capa de peptidoglucanos y carente de membrana externa (Murray, P. Rosenthal, K. Pfäuer, M., 2007).

No obstante, 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, manósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomanano (LAM) (Murray, P. Rosenthal, K. Pfäuer, M. 2007).

El LAM presenta una relación funcional con los liposacáridos O antigénicos presentes en otras bacterias. La capa de peptidoglucano forma el esqueleto básico al que se unen los arabinogalactanos, unos polisacáridos ramificados formados por D-arabinosa y D-galactosa. El residuo terminal de D-arabinosa se esterifica para dar lugar a ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular a los que se anclan moléculas de glucolípidos de superficie (Murray, P. Rosenthal, K. Pfäuer, M. 2007).

También se detectan otros lípidos, glucolípidos y peptido-glucolípidos. Los componentes lipídicos representan el 60% del peso de la pared celular. A lo largo de las capas de la pared celular se intercalan proteínas transportadoras y porinas, las cuales constituyen el 15% del peso de la misma. Las proteínas constituyen antígenos importantes a nivel biológico ya que estimulan la respuesta inmunitaria celular del paciente frente a la infección. Las características de crecimiento y morfológicas de las colonias se utilizan en la identificación preliminar de las micobacterias, *Mycobacterium tuberculosis* y otras especies relacionadas (conocidas como complejo *Mycobacterium tuberculosis*) son bacterias de crecimiento lento. Las colonias de estas bacterias no están pigmentadas o tienen un color beis (Murray, P. Rosenthal, K. Pfäuer, M. 2007).

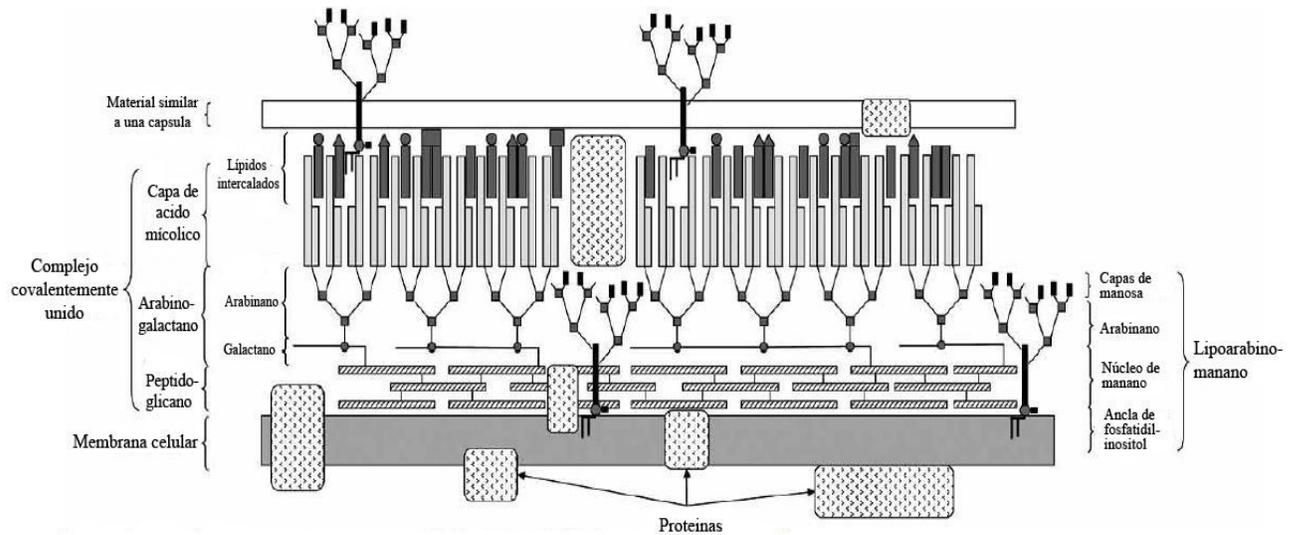


Figura 4. Representación esquemática de la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Patrick, J. Brennan, D. Crick, C. 2007).

La envoltura de la célula se compone de tres constituyentes principales; La membrana plasmática, el núcleo de la pared celular y los glucanos, lípidos y proteínas extraíbles, unidos de forma no covalente (Patrick, J. Brennan, D. Crick, C.2007).

Estructura, función y síntesis de la pared celular

La pared celular se compone de dos segmentos, superior e inferior. Más allá de la membrana está el peptidoglicano (PG) en la unión covalente a arabinogalactano (AG), que a su vez está unido a los ácidos micólicos con su larga meromicolato y cortas cadenas a esto se denomina núcleo de la pared celular del complejo micolilarabinogalactan-peptidoglicano (mAGP). El segmento superior está compuesto por lípidos libres, algunos con ácidos grasos más largos que complementan las cadenas a más cortas, y algunos con ácidos grasos más cortos que complementan las cadenas más largas. Intercalados de alguna manera son las proteínas de la pared celular, los fosfatidil inositol manósidos (PIM), los lípidos que contienen tiocerol, lipomanano (LM) y lipoarabinomano (Brennan, P.J. 2003).

Cuando la pared celular se rompe, por ejemplo, se extraen con varios disolventes, los lípidos libres, las proteínas, el LAM y los PIM se solubilizan, y el complejo de ácido micólico arabinogalactan-peptidoglycano permanece como el residuo insoluble. En términos simplistas, se puede considerar que estos lípidos, proteínas y lipoglicanos son las moléculas efectorinas de señalización en el proceso de la enfermedad, mientras que el núcleo insoluble es esencial para la viabilidad de la célula (Brennan, P.J. 2003).

Estructura de mAGP

Una serie de investigaciones intensivas desde 1950 a 1975 permitió la definición de la matriz insoluble de la pared celular como una PG reticulada ligada a AG y esterificada en los extremos distales por los ácidos micólicos. Históricamente, se piensa que la PG consiste en unidades alternas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y un ácido murámico modificado (Mur). Las cadenas laterales tetrapéptidas de PG consisten en L-alanil-D-isoglutaminil-meso-diaminopimelil-D-alanina (L-Ala-D-Glu-A2pm-D-Ala) con el Gluamidado más.1-4 Este tipo de PG es uno de los más comunes en las bacterias (Schleifer, K.H. Kandler, O. 1972).

Sin embargo, la PG micobacteriana difiere de dos maneras: algunos o todos los residuos Mur están N-acilados con ácido glicólico (MurNGly), y los enlaces cruzados incluyen una proporción entre dos Residuos de A2pm, así como entre A2pm y D-Ala. Se sabía, incluso en la década de 1950, que el polisacárido principal de la pared celular es una AG de cadena ramificada serológicamente activa con los restos de arabinosa (Ara) formando los extremos reductores. Se propuso una fórmula estructural, que resultó ser incorrecta, consistente en repetir unidades de 11-16 residuos de azúcar (Lederer, E. et-al 1975).

Biosíntesis de mAGP

La importancia de comprender la biosíntesis del complejo peptidoglicano-arabinogalactano del ácido micólico es más en el contexto del desarrollo de nuevos fármacos contra la tuberculosis (TB) y menos en la definición de los factores bacterianos responsables del proceso de la enfermedad (Brennan, P.J. 2003).

Uno de los grandes desarrollos en los últimos años en la definición química del núcleo de la pared celular fue el reconocimiento del puente diglicosil-P que se encuentra entre el PG lineal y el galactano lineal, basado en la biosíntesis de la pared celular en otras bacterias, que la unidad de enlace completa, galactano y arabinano se sintetizan como una unidad en un lípido portador de polipropil-P. El trabajo posterior ha proporcionado la base experimental de lo que una vez fue especulación. La síntesis de todo el núcleo se inicia en un decaprenil-P con síntesis de la unidad enlazadora, y luego hay una extensión concomitante de las cadenas de galactano y arabinano, mientras que este intermedio se transporta a través de la membrana citoplásmica (Mikusova, K. Mikus, M. Besra, G.S. Hancock, I. Brennan, P. J. 1996).

Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

En todos los casos las personas que han sido diagnosticadas con la enfermedad catalogados como pacientes tuberculosos se deben realizar un examen microscópico de esputo (baciloscopia) para determinar si son pacientes contagiosos, la baciloscopia es el único

método rápido que permite el diagnóstico de tuberculosis en países en vías de desarrollo y el cultivo es la herramienta complementaria de la baciloscopia que permite con certeza realizar la confirmación del diagnóstico de la enfermedad, evaluar el seguimiento de tratamiento hasta su curación permitiendo realizar su identificación y pruebas de sensibilidad y resistencia (Ratledge, C. Stanford, J. 1982).

El cultivo es un método bacteriológico muy sensible que permite detectar al bacilo en pequeñas concentraciones en la muestra de esputo detectando un mínimo de 10 a 100 bacilos por mililitro, el cultivo aumenta la sensibilidad de la baciloscopia en un 30-60%, dependiendo del laboratorio (Ratledge, C. Stanford, J. 1982).

Características de los cultivos

En los cultivos provenientes de muestras biológicas como el de esputo los bacilos tuberculosos suelen crecer muy pobremente en los medios de cultivos tradicionales como Lowenstein- Jensen y de Ogawa (figura 5), después de periodos prolongados el crecimiento de colonias suele ser muy pocas, sin embargo, en algunas ocasiones ocurren variantes de crecimiento más rápidas. Los cultivos primarios de crecimiento lento se han denominado "disgónicos" y la variante de crecimiento rapido "eugónicos". En los cultivos disgonicos como (figura 14) las colonias son pequeñas de color gris y en muy pocas cantidades en cambio los cultivos eugonicos (figura 13) se observan colonias grandes, abundantes y efluentes (Ratledge, C. Stanford, J. 1982).

Requerimientos nutricionales

Las bacterias miembros del genero *Mycobacterium* pueden utilizar un amplio rango de componentes carbonados para su crecimiento y varios componentes nitrogenados como fuente de nitrógeno. Las micobacterias pueden crecer utilizando glicerol como fuente de carbono metabolizando el glicerol a piruvato, la asparagina o iones NH_4 son utilizados como fuente de nitrógeno, glutamina, acido aspártico y glutamato pueden substituir a la asparagina, la adición de citrato al medio de cultivo puede favorecer al desarrollo del cultivo con pequeños inóculos de muestra (Ratledge, C. Stanford, J. 1982).

Los elementos inorgánicos que comúnmente son requeridos por microorganismos en un pequeño número para su crecimiento son necesarios para su desarrollo, estos elementos se dividen en (potasio, fosforo, magnesio y azufre). Los requerimientos de K^+ , Mg^+ , SO_4^{-2} y PO_4^{-3} por las micobacterias son agregadas en formas de sales en los medios de cultivos (Tabla 3), la deficiencia de estos elementos puede provocar una alteración en el metabolismo de la bacteria, la deficiencia causa el agotamiento de la metionina y la cisteína, lo que lleva a la interrupción de la síntesis de proteínas y ADN; sin embargo, el

ARN continúa sintetizándose, la deficiencia de magnesio ocasiona una alteración en la ramificación celular (Ratledge, C. Stanford, J. 1982).

A diferencia de otras micobacterias, *Mycobacterium bovis* no crece con facilidad en medios de cultivo a base de glicerol como fuente de carbono requiere de otras formas de fuentes de carbono como glutamato de sodio o piruvato. Un elemento clave para el desarrollo de las micobacterias es la adición de albumina en los medios de cultivo que son incorporados en los medios de cultivo preparados a base de huevo (Lowenstein - Jensen, medio de Ogawa) que son los empleados por el Programa Nacional de Tuberculosis (Ratledge, C. Stanford, J. 1982).

Aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis exige la detección, aislamiento e identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, así como la determinación de su perfil de susceptibilidad frente a las drogas antituberculosas. La detección precoz del individuo bacilífero es uno de los pilares básicos de una buena organización en la lucha contra la tuberculosis (Ratledge, C. Stanford, J. 1982).

La sensibilidad y especificidad de los distintos métodos de detección es variable y depende mucho de la experiencia e idiosincrasia de cada laboratorio en particular y de cómo los adapte a su rutina de trabajo. En general, el examen microscópico directo de las muestras clínicas, mediante técnicas específicas de tinción (baciloscopia), es la técnica menos sensible pero la más rápida. El cultivo es el método más sensible en bacteriología se realiza en diferentes medios de cultivo como Lowenstein-Jensen, Ogawa y Middlebrook obteniendo diferentes tipos de desarrollo de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* (figura 5) (Ratledge, C. Stanford, J. 1982).

CARACTERÍSTICAS E INTERPRETACIÓN DE LOS CULTIVOS		
	CONTAMINADO	TUBOS SEMBRADOS PRESENTAN ALGUNA ALTERACION FISIO-QUIMICA
	NEGATIVO	SIN DESARROLLO DESPUES DE 60 DIAS DE INCUBACION
	POSITIVO DE 1-19 COLONIAS	CULTIVO POSITIVO DESPUES DE 60 DIAS DE INCUBACION
	POSITIVO (+)	CON DESARROLLO DE 20-100 COLONIAS
	POSITIVO (++)	CON DESARROLLO DE MAS DE 100 COLONIAS
	POSITIVO (+++)	COLONIAS INCONTABLES (EFLUENTES)

Figura 5. Interpretación del desarrollo de cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*. Insituto de Laboratorios en Salud 2016.

Efecto de la temperatura en *Mycobacterium tuberculosis*

La temperatura afecta sobre todo en la viabilidad, ciertas bacterias gram negativas como *Aeromonas aerogenes*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas sp*, presentaron una disminución en su viabilidad cerca de la fase logarítmica durante el enfriamiento rápido de 37°C a 10°C, tal fenómeno es denominado como "choque frío". Varias cepas de *Chromobacterium violaceum* mueren por enfriamiento rápido o gradual de 30°C a 0°C durante la fase logarítmica o estacionaria (Gorrill, R. H. McNeil, E. M. 1960).

En organismos superiores como animales, plantas y en microorganismos se demostró que las bajas temperaturas cambian la estructura de los ácidos grasos aumentando el grado de insaturación, se cree que esto podría provocar una mayor fluidez manteniendo un metabolismo constante. *Mycobacterium tuberculosis* experimenta una alteración en su viabilidad después de estar varias semanas a 4°C (Takayama, K. et-al. 1978).

Mycobacterium tuberculosis H37Ra (bacilo tuberculoso atenuado) pierde de forma gradual la capacidad de desarrollo después de 7 días cuando se encuentra en un ambiente con una temperatura de 16°C a 20°C y esta disminución de la viabilidad aumenta en función del tiempo. Después de incubar a 16°C durante 24 días y reincubar a 37°C la viabilidad de la cepa se ve afectada notoriamente como señala (Takayama, K. et al. 1978) y a los 32 días se ve poco o casi ningún tipo de desarrollo (Gorrill, R. H. McNeil, E. M. 1960).

El efecto que este cambio de temperatura en la síntesis de ácidos grasos es determinante para su viabilidad, en *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra experimentos mostraron que a es incapaz de sintetizar cantidades significativas de ácidos grasos insaturados a bajas temperaturas (Takayama, K. et-al. 1978).

Tres procesos se ven afectados por la incubación a bajas temperaturas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra: (1) la proporción de ácidos micólicos y (2) la proporción de ácidos grasos C₁₆₋₁₉ monoinsaturados con respecto al total de ácidos grasos sintetizados y (3) la proporción de ácidos grasos saturados C₂₄₋₂₆ al total de ácidos grasos sintetizados aumenta considerablemente. Estos procesos afectados se asocian con la síntesis de ácidos micólicos que es vital para la supervivencia de la bacteria (Takayama, K. et al. 1978).

Prueba de susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* por el método de las proporciones Canetti-Rist

Como resultado de una consulta internacional de especialistas en bacteriología de la tuberculosis, organizada por la OMS en 1961 (Canetti et al. 1963) describieron criterios y técnicas para pruebas confiables de resistencia micobacteriana. De los cuales el método de las proporciones cumplía con los requisitos que debe tener una prueba de susceptibilidad de las cuales se describen cuatro usos principales y fundamentales:

1. **Para fines científicos:** contribuyen a nuestra comprensión de los mecanismos de la quimioterapia y de las razones del éxito y el fracaso.
2. **Para estudios epidemiológicos:** ya sea en un momento determinado o en dos momentos diferentes en el mismo país, o para comparaciones entre países.

3. **Para la planificación del tratamiento a gran escala:** ya que, por ejemplo, se puede estimar la proporción de pacientes con organismos totalmente sensibles en la comunidad.
4. **Para uso en el paciente individual:** para decidir los regímenes que podrían ser efectivos, especialmente en el retratamiento.

Todas las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* contienen algunos bacilos que son resistentes a los fármacos antibacilares. Sin embargo, en cepas resistentes, la proporción de tales bacilos es considerablemente mayor que en cepas sensibles. El método de las proporciones consiste en calcular la proporción de bacilos resistentes presentes en una cepa. Para este método se emplea el medio de cultivo de Lowenstein-Jensen. Dos diluciones bacilares apropiadas se inoculan en un medio que contiene un fármaco y un medio libre de fármaco, para proporcionar colonias numerables en ambos medios. La relación entre el número de colonias obtenidas en el medio que contiene el fármaco y el número de colonias obtenidas sobre el medio libre de fármacos indica la proporción de bacilos resistentes presentes en la cepa. Por debajo de una cierta proporción, la cepa se clasifica como sensible; Arriba, como resistente.

No se debe estudiar el perfil de susceptibilidad de una cepa que tenga menos de 30 días de incubación, debido a que los gérmenes resistentes a la isoniazida son generalmente más lentos en su multiplicación, se corre el riesgo de que las colonias de estudio se llegaran a clasificar como sensible a una cepa que no lo es. Por otra parte, es dudoso efectuar pruebas de sensibilidad en cultivos con más de 60 días. Cuando el número de colonias desarrolladas en el cultivo a partir del cual se realiza la prueba es pequeño (por ejemplo, menor a diez colonias) debe informarse, ya que esta muestra puede no ser representativa de la población bacilar que se encuentra en la lesión, realizar subcultivos de estas muestras no aumentara la representatividad de esa muestra (Canetti, G. Fox, W. Khomenko, A. Mahler, H. T. et al. 1969).

Envejecimiento biológico en procariontas

La senescencia (o envejecimiento) es un deterioro de la función con la edad que se manifiesta como una disminución de la supervivencia y la reproducción. Investigaciones recientes han revelado subpoblaciones de células microbianas que envejecen y mueren rutinariamente, incluso en presencia de abundantes nutrientes. Aunque los mecanismos de la senescencia microbiana aún no están claros, una investigación más a fondo podría proporcionar información relevante para el envejecimiento en todas las formas de vida (Stephens, C. 2005).

En el contexto de la biología, los términos "envejecimiento" y "senescencia" implican algo más que el paso del tiempo en la vida útil de un organismo. Con respecto a los microbios,

la medida crítica del envejecimiento sería una reducción de la capacidad reproductiva: intervalos de generación más largos que darían como resultado menos descendientes en función del tiempo (Ackermann, M. C, Stephen. Jenal. U. 2003).

Si bien se ha demostrado que los requisitos para el envejecimiento en organismos unicelulares sean una división asimétrica en una célula juvenil, esto es similar a la idea de que el requisito crítico para el envejecimiento en organismos unicelulares es la presencia de una célula madre que proporciona una célula de descendencia más pequeña como lo han demostrado organismos como *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Caulobacter crescentus*, sin embargo se tiene evidencia de que en organismos con división simétrica y sin una fase juvenil usando como marcador fenotípico los polos estructurales como *Escherichia coli* presenta una disminución de la producción de la biomasa, reducción de la tasa de división celular y una probabilidad elevada de muerte lo que se traduce como un envejecimiento de vida (Ackermann, M. C, Stephen. Jenal. U. 2003).

4. Antibióticos y mecanismo de acción

Los antibióticos son moléculas sintetizadas por microorganismos o derivados sintéticos que son capaces de impedir el desarrollo de las bacterias, en la actualidad se han desarrollado antibióticos modificados artificialmente con el fin de mejorar las terapias y evitar el desarrollo de resistencia.

Para que un antibiótico pueda cumplir su misión de inhibir el desarrollo ante una bacteria es necesario que cumpla algunos requisitos como:

- a) Un antibiótico debe tener un objetivo susceptible en la célula.
- b) El antibiótico no deber ser modificado o inactivado.
- c) El antibiótico debe llegar a su objetivo en concentraciones suficientes (Sutcliffe, J. Muller, J. 1999).

Los antibióticos tienen mecanismos de acción diferentes atacando a estructuras que para una bacteria es muy útil y necesario para vivir y cumplir sus funciones.

De acuerdo al efecto que tienen los antimicrobianos se han clasificado de una forma un tanto tradicional ya muy conocida y difundida en el campo de la bacteriología médica, para una bacteria un antibiótico solo puede considerarse los términos bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) y bacteriostático (solo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano) y no así toxico (Martinez, L. 2008).

Lo limites de ambos conceptos se consideran en la actualidad un tanto difusos, Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración

que alcance en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo. En general, son bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplasmática o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del DNA, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, quitando de lado los aminoglucosidos (Martinez, L. 2008).

Interferencia con la síntesis de la pared celular

La pared celular bacteriana compuesta en su mayoría por peptidoglicano juega un rol importante en la supervivencia de la bacteria soportando una presión osmótica (mayor dentro la célula) permitiéndole soportar cambios bruscos en solución hipotónicas e hipertónicas. Una pérdida de esta estructura condicionaría a la bacteria a su destrucción provocada por un elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el citoplasma y el medio externo celular (Dover, L. Alderwick, L. Brown, A. et al 2007).

Un objetivo muy ingenioso para deshacerse de las bacterias es eliminar las proteínas encargadas de la síntesis de la pared celular atacando al peptidoglicano u otras moléculas asociadas como los ácidos micólicos estas son estructura que se encuentra en mayor proporción convirtiéndolas en blancos de acción farmacológica, fármacos como las cefalosporinas, penicilinas, la isoniazida y otros son encargados de actuar en estas estructuras (Strohl, W. 1997).

Inhibición de la síntesis de proteínas

Las proteínas son macromoléculas necesarias en todo proceso metabólico tanto como formas catalíticas y estructurales, se han sintetizados antibióticos que actúan inhibiendo su síntesis de una forma muy selectiva gracias a que existe una diferencia estructural de las ribosomas de procariontes y eucariotes, las bacterias poseen un ribosoma conformado por dos subunidades (30S y 50S) que contienen ARN-ribosómico (ARNr 16S en la subunidad 30S, y ARNr 5S y ARNr 23S en la subunidad 50S) y otras proteínas denominadas S (*small* o pequeñas, encontradas en la sub-unidad 30S) o L (*large* o grande, en la subunidad 50S) estas estructuras brindan objetivos de acción para diferentes antibióticos (determinados nucleótidos para las oxazolidinonas, algunas proteínas S para las tetraciclinas o proteínas L para el cloranfenicol). Dentro de los mecanismos de acción generalmente la mayoría de los antibióticos se comportan como bacteriostáticos, aunque los aminoglucosidos se comportan más como bactericidas. Para lograr inhibir proteínas la droga actúa a nivel de los ribosomas afectando a la elongación de estas macromoléculas, las subunidades 50S y 30S son los objetivos de las drogas como los macrolidos, aminoglucosidos y otros (Strohl, W. 1997).

En un proceso metabólico activo el proceso de síntesis proteica se lleva a cabo en diferentes etapas y los antibióticos actúan en de acuerdo a la etapa de la síntesis de proteínas (Strohl, W. 1997).

Inhibidores de la fase de activación

Los ribosomas encargados de la síntesis de proteínas tienen la función de unir las cadenas de aminoácidos preformados uniéndolos a la cadena peptídica que está en formación, el ARN de transferencia (ARNt) es el encargado de llevar a cabo el transporte de esta cadena de aminoácidos que se unirá al ARN mensajero (ARNm) codificante de la proteína en formación, cada aminoácido se une con su ARNt específico mediante una enzima también específica de aminoácido (ARNt aminoacil sintetasa). En las bacterias, el primer aminoácido de la cadena peptídica es la metionina, es decir, la síntesis proteica se inicia con la formación del complejo formilmetionil-ARNt que reconocerá el codón de iniciación AUG del ARNm (adenosina-uracilo-guanosina). El mecanismo de acción de la mupirocina, antibiótico bacteriostático obtenido de especies de *Pseudomonas spp.*, que inhibe competitivamente la enzima isoleucil-ARNt sintetasa, con lo cual no puede incorporarse el aminoácido isoleucina al péptido en formación y la síntesis de proteínas se interrumpe (Ochsner, U. Sun, X. Jarvis, T. Critchley, I. et-al. 2007).

Inhibidores del inicio de la síntesis proteica

El ARNm tiene un codón específico donde se une el ARNt donde se encuentra el aminoácido formilmetionina ambos se unen en las subunidades 30S y 50S formando un complejo de iniciación de síntesis de proteínas, este complejo tiene dos sitios importantes, el locus A donde se fija los aminoacil-ARNt y el locus P donde se introduce el péptido en formación este punto es donde el formilmetionil-ARNt será introducido para dar inicio a la elongación de la cadena peptídica, este punto de elongación e iniciación proteica es el sitio de acción para algunos antibióticos como los aminoglucósidos y Oxazolidinonas (Strohl, W. 1997).

Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos

El genoma bacteriano contiene información para la síntesis de proteínas que se transmite a través del ARN mensajero producido a partir del molde de ADN (transcripción), y para la síntesis de ARN ribosómico que formara parte de los ribosomas bacterianos. La información del ADN debe duplicarse (replicación) cuando la bacteria se divide, para transmitir esta información a la descendencia. La replicación y la transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos.

Una de las drogas antituberculosas que tiene este mecanismo de acción es la rifampicina logrando intervenir la ARN-polimerasa inactivando la formación del ADN. Otras drogas

intervienen en enzimas como las topoisomerasas y las girasas durante la replicación causando ruptura de la doble cadena (Strohl, W. 1997).

Antibióticos activos en la membrana citoplasmática

Todas las células tienen mucho en común y comparten estructuras celulares similares, todos poseen una barrera de permeabilidad selectiva llamada membrana citoplasmática que separa el medio interno del medio externo, participa en funciones de vital importancia en la difusión de moléculas y transporte activo. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, y provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. Los antimicrobianos que actúan en esta estructura se comportan como bactericidas, incluso en bacterias en reposo, y pueden tener alta toxicidad sobre las células humanas, al compartir algunos componentes de la membrana citoplasmática (Livermore, D. 2003).

Resistencia bacteriana a antibióticos

En toda la historia del hombre las infecciones han causado un sinnúmero de muertes desde épocas imperiales hasta nuestros tiempos, razones por las cuales se han desarrollado formas de combatir y eliminar las bacterias causantes de estas infecciones. Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming las infecciones eran tratadas con gran éxito sin problema alguno (Livermore, D. 2003).

Para el año 1950 con la aparición de una variedad de agentes antimicrobianos se pensaba que cualquier infección bacteriana sería tratada con éxito este pensamiento cambió cuando se empezaron a detectar bacterias que presentaban resistencia a los antibióticos habituales de esa época patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y sin duda alguna *Mycobacterium tuberculosis*. Los esquemas de tratamiento dejaron de ser eficaces y el número de fallecimientos se incrementaban conforme el tiempo transcurría. Ya para 1960 se detectaron genes involucrados en los mecanismos de resistencia a antibióticos (Becerra, G. Placencia, A. et al 2009).

La aparición de cepas resistentes se debe a diferentes factores como el uso indiscriminado, uso inadecuado, perfil de resistencia erróneo, migración de personas, hacinamiento, mutaciones inducidas por el propio fármaco antimicrobiano. Al mismo tiempo que fueron surgiendo bacterias multiresistentes nuestro conocimiento y entendimiento sobre los mecanismos moleculares y bioquímicos fueron aumentando llegando a comprender los principales mecanismos por los cuales las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos (Senka, D. Jagoda, S. et al 2008).

Los mecanismos de resistencia como las bombas de eflujo, resistencia intrínseca, resistencia adaptativa a antibióticos, indiferencia al fármaco, inactivación de antibióticos, formación de polímeros extracelulares, modificación del sitio de acción, cambios en la permeabilidad de la membrana celular, mutaciones, mutagenesis adaptativa, cepas hipermutables y transferencia horizontal de genes son algunas formas conocidas de resistencia, una o varios tipos de resistencia pueden estar presentes en una sola bacteria causando una resistencia a un gran espectro de antibióticos (Senka, D. Jagoda, S. et-al 2008).

Aspectos bioquímicos de resistencia

Comprender los mecanismos de resistencia a antibióticos es un tema de gran importancia desde el punto de vista bioquímico, saber los mecanismos sobre los cuales las bacterias manifiestan su resistencia es un tema de gran importancia para la salud. (Wright, G. D. 2005)

Aunque los mecanismos por los cuales se adquiere resistencia varían de especie a especie, los mecanismos estudiados y ya conocidos son:

- Inactivación del antibiótico: Inactivación directa de la molécula activa del antibiótico.
- Modificación del sitio de acción u objetivo: Alteración de la sensibilidad del antibiótico por modificación directa del sitio de acción.
- Bombas de eflujo y cambios en la permeabilidad de la membrana externa (OM): reducción de la concentración de fármaco sin modificación del compuesto en sí. (Wright, G.D.2005)

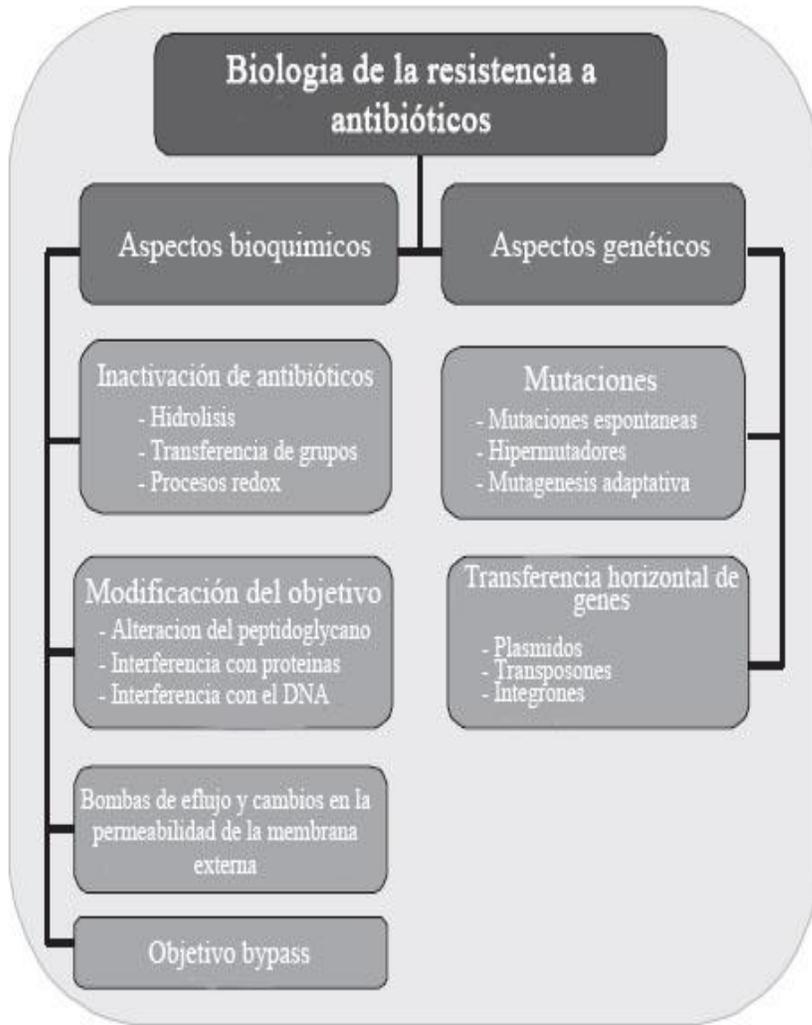


Figura 6. Aspectos bioquímicos y genéticos de los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias (Senka, D. Jagoda, S. Blaenka, K. 2008).

Inactivación de antibióticos

En este proceso de mecanismo de acción se encuentran de por medio la liberación de enzimas (que participan en el proceso de degradación y modificación de la droga misma), otros procesos bioquímicos como transferencia de grupos funcionales, hidrolisis y reacciones redox.

Inactivación por hidrolisis

En la actualidad se sabe que muchos antibióticos tienen enlaces químicos como ésteres y amidas susceptibles a hidrolisis química. Se sabe que hay varias enzimas que producen esta

actividad liberadas por las bacterias atacando al antibiótico antes de que alcance su objetivo o sitio de acción. Las amidasas hidrolíticas clásicas y mejor conocidas son las β -lactamasas que escinden el anillo β -lactámico de las penicilinas y cefalosporinas (figura 7) (Senka, D. Jagoda, S. Blazenka, K. 2008).

Las β -lactamasas según su esquema de clasificación funcional y perfil de inhibidores se clasifican en tres grupos principales de acuerdo a su sustrato e inhibidor: las cefalosporinas del grupo 1 que no están inhibidas del todo por el ácido clavulánico; las cefalosporinas del grupo 2 las penicilinasas, las cefalosporinasas y las β -lactamasas que por lo general son inhibidas por los inhibidores β -lactámicos; y el grupo 3 metalo β -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos y que están poco inhibidos por casi todas las moléculas que contienen β -lactámicos (Bush, K. Jacoby, G. Medeiros, A. 1995).

En este mecanismo de resistencia las β -lactamasas (EC 3.5.2.6) designadas así por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica como "enzimas que hidrolizan amidas, amidinas y otros enlaces C-N (Webb, E. C. 1984). Estas enzimas son la principal causa de resistencia bacteriana a los antibióticos β -lactámicos y han sido tema de extensos estudios microbiológicos, bioquímicos y genéticos (Bush, K. Jacoby, G. Medeiros, A. 1995).

Otros ejemplos de enzimas hidrolíticas incluyen esterasas que se han relacionado con resistencia a antibióticos macrólidos y epoxidadas de apertura de anillo que causan resistencia a fosfomicina (Kim, Y. Cha, C.J. Cerniglia, C.E 2002).

Inactivación de antibióticos por transferencia de grupos

La familia más diversa de enzimas resistentes es el grupo de las transferasas. Estas enzimas inactivan los antibióticos (aminoglucósidos, cloranfenicol, estreptogramina, macrólidos o rifampicina) por sustitución química (los grupos adenilil, fosforil o acetilo se agregan a la periferia de la molécula de antibiótico). Los antibióticos modificados se ven afectados en su unión a un objetivo. Las estrategias químicas incluyen O-acetilación y N-acetilación, O-fosforilación, O-nucleotidilación, O-ribosilación, O-glucosilación y transferencia de tiol. Todas estas estrategias de modificación covalente requieren un co-sustrato para su actividad (ATP, acetyl-CoA, NAD⁺, UDP-glucosa o glutatión) y, en consecuencia, estos procesos están restringidos al citoplasma (Vetting, M. et al 2004).

Inactivación de antibióticos por reacciones redox

En bacterias patógenas los procesos de óxido-reducción no han sido explotados en su totalidad, sin embargo, hay algunas bacterias capaces de realizar este proceso por ejemplo

Streptomyces virginiae productor del antibiótico estreptogramina tipo A y virginamicina M1 es capaz de reducir los grupos cetonas de su propio antibiótico.

En *Escherichia coli* la sobreexpresión de la enzima TetX oxida la tetraciclina de amplio espectro. TetX es una monooxigenasa dependiente de flavina que hidroxila de manera selectiva el sustrato de tetraciclina, lo que da como resultado un compuesto inestable que experimenta una descomposición no enzimática (Vetting, M. et al 2004).

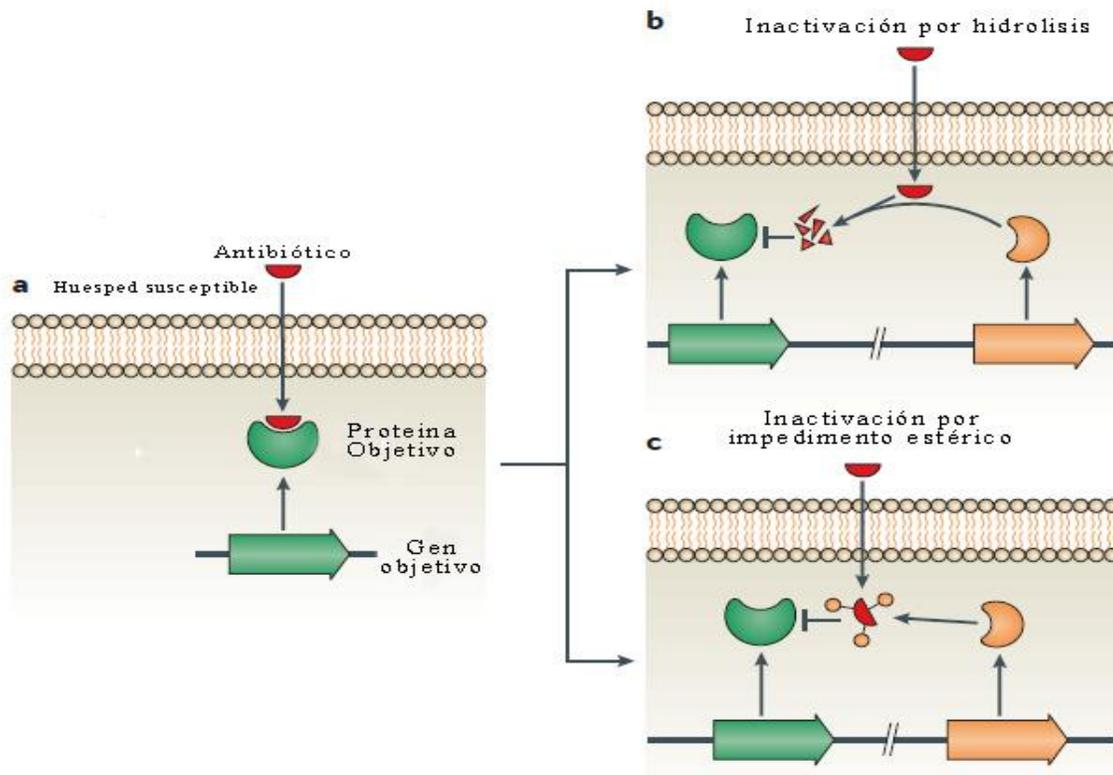


Figura 7. Interacción directa con antibióticos. **a** Un huésped susceptible con un objetivo de acción que es inhibido de manera eficiente por un antibiótico. **b** La adquisición y producción de una enzima que destruye el antibiótico (por ejemplo, β -lactamasas) evita la unión al objetivo y confiere resistencia. **c** La adquisición y producción de una enzima que modifica la estructura del antibiótico (por ejemplo, las enzimas modificadoras de aminoglucósidos) también puede evitar la unión al objetivo de acción y conferir resistencia (Blair, J. Webber, M. Baylay, A.J. Ogbolu, D. O. Piddock, L. 2014).

Modificación del sitio de acción

Otro tipo de mecanismo de resistencia principal es la modificación del objetivo, diana o sitio de acción donde el antibiótico se une de manera específica inactivando el componente celular vital. Sin embargo, la célula puede sufrir cambios en su genoma mediante mutaciones provocando modificaciones estructurales es el sitio de acción disminuyendo la afinidad del antibiótico y aun así continuando con su función celular (figura 8) (Spratt, B.G. 1994)

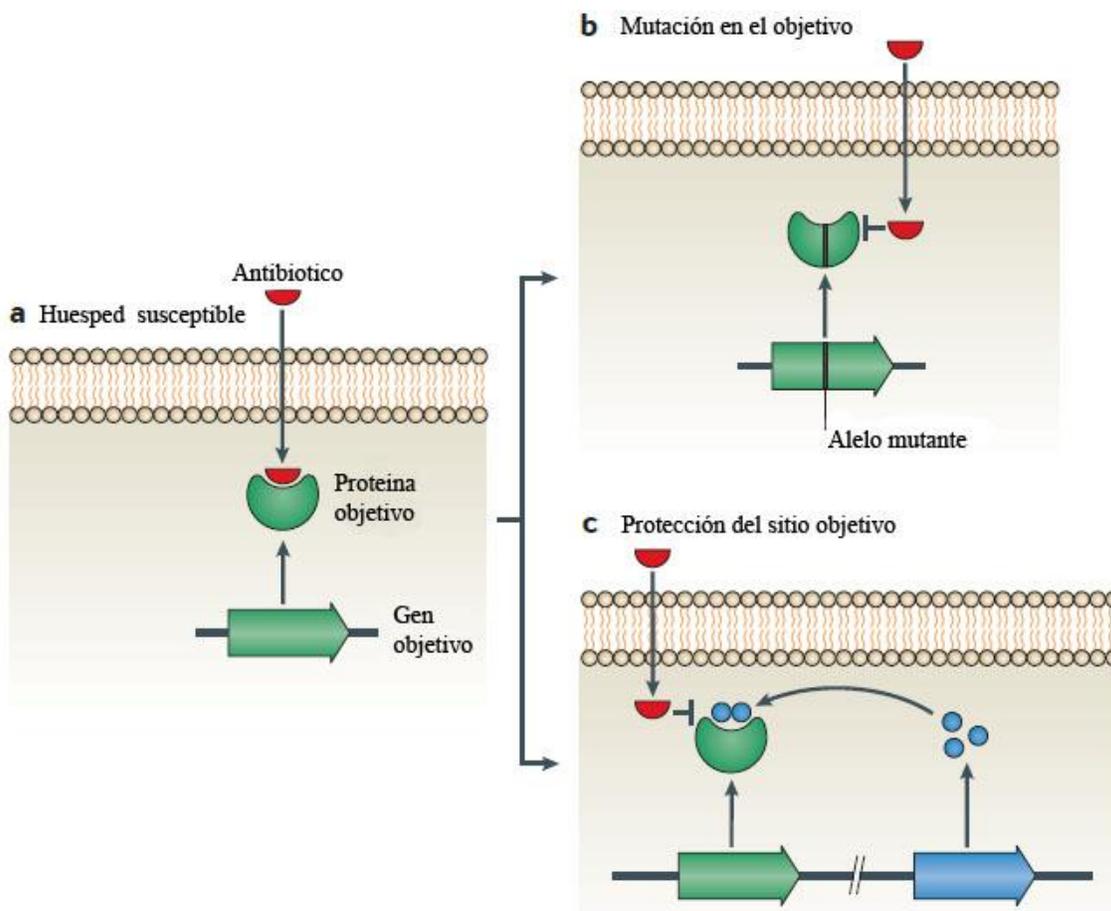


Figura 8. Cambios en el sitio objetivo. **a** Huésped susceptible en el que un antibiótico puede unirse fuertemente a su objetivo específico y ejercer un efecto inhibitorio. **b** Mutación del sitio diana (por ejemplo, como se encuentra en mutaciones en genes de topoisomerasa en muchas especies que confieren resistencia a fluoroquinolonas) o recombinación para proporcionar un alelo mosaico (como se encuentra en las proteínas mosaico de unión a penicilina en neumococos y gonococos que confieren β -lactama resistencia) da como resultado un objetivo funcional con afinidad reducida por el antibiótico, que no se une de manera eficiente y, por lo tanto, tiene un efecto reducido o insignificante. **c** La modificación del objetivo mediante la adición de un grupo químico también puede prevenir la unión del antibiótico sin alterar la secuencia de proteína primaria del objetivo, que conserva su actividad (Blair, J. Webber, M. Baylay, A.J. Ogbolu, D. O. Piddock, L. 2014).

En algunos casos la alteración del sitio de acción puede presentar una alteración que la célula se ve obligada a reemplazar con otras modificaciones en su estructura interna, este es el caso de la resistencia a meticilina por *Staphylococcus aureus* adquiriendo una modificación en su función y forma estructural. (Leski, T.A. Tomasz, A. 2005).

Alteración de la estructura del peptidoglicano

El peptidoglicano es una estructura de la pared celular que la convierte en un objetivo clave para el uso de antibióticos, esta estructura es esencial para el crecimiento y supervivencia de la bacteria, enzimas encargados de la síntesis de esta estructura la son blancos de ataque para antibióticos usados en la clínica. La presencia de mutaciones provoca una alteración en las proteínas de unión a penicilinas (PBP_S) dando como resultado una baja afinidad de unión a beta-lactámicos y ampicilinas. La resistencia a meticilina y oxacilina en *S. aureus* se asocia con la adquisición de un elemento genético móvil llamado *SCCmec*, que contiene el gen de resistencia *mecA* (Tenover, F.C.2006).

Interferencia en la síntesis de proteínas

Un amplio rango de antibióticos actúa en diferentes niveles en la síntesis de proteínas. La resistencia a los antibióticos que interfieren con la síntesis proteica como tetraciclinas, aminoglucósidos, cloranfenicoles, macrólidos y algunas vías ARN-Polimerasa por medio de la rifampicina. La resistencia a la estreptomina adquirida cromosómicamente en *Mycobacterium tuberculosis* se debe frecuentemente a mutaciones en el gen *rpsL* que codifica la proteína ribosómica S12. Los microorganismos que producen aminoglucósidos han desarrollado un mecanismo de alto nivel de resistencia a los antibióticos mediante la metilación postranscripcional del ARNr 16S en el sitio de unión a aminoglucósido. Este mecanismo de resistencia se ha informado recientemente en patógenos humanos de infecciones nosocomiales y aislados de animales (Maravic G. V. Cubrilo, S. Tkaczuk, K.L. Bujnicki, J.M.)

Interferencia en la síntesis de ADN

Las fluoroquinolonas interactúan con las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV y evitan la replicación y la transcripción del ADN. La resistencia es conferida por mutaciones en regiones específicas de los genes estructurales que alteran suficientemente estas enzimas para prevenir la unión de antibióticos (Khodursky, A.B. Zechiedrich, E.L. Cozzarelli, N.R. 1995). Las mutaciones más comunes en esta región causan resistencia a través de la disminución de la afinidad del fármaco por el complejo alterado de girasa-ADN. (Willmott, C.J. Maxwell, A. 1993).

Bombas de eflujo y permeabilidad de la membrana externa

Las bombas de eflujo son las proteínas de membrana que exportan los antibióticos fuera de la célula y mantienen sus concentraciones intracelulares en niveles bajos. La permeabilidad reducida de la membrana externa resulta en una reducción de la absorción de antibióticos. La absorción reducida y el eflujo activo inducen resistencia de bajo nivel en muchas bacterias clínicamente importantes (Nikaido, H. 1994).

Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo afectan a todas las clases de antibióticos, especialmente los macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas porque estos antibióticos inhiben diferentes aspectos de la biosíntesis de proteínas y ADN y, por lo tanto, deben ser intracelulares para ejercer su efecto (Van Veen, H.W. Konings, W.N. 1997).

Este tipo de mecanismo de resistencia varía tanto en su especificidad como en su mecanismo. Aunque algunos son específicos del fármaco, muchos sistemas de eflujo son transportadores multidrogas que son capaces de expulsar un amplio espectro de fármacos estructuralmente no relacionados, lo que contribuye significativamente a la resistencia a múltiples fármacos bacterianos (MDR) (Van Veen, H.W. Konings, W.N. 1997).

Las bombas de eflujo bacterianas transportan activamente muchos antibióticos fuera de la célula y son los principales contribuyentes a la resistencia intrínseca de las bacterias Gram-negativas a muchos de los fármacos que se pueden usar para tratar las infecciones bacterianas Gram-positivas. Cuando ocurre una sobreexpresión, las bombas de eflujo también pueden conferir altos niveles de resistencia a antibióticos clínicamente útiles. Algunas bombas de eflujo tienen una especificidad de sustrato reducida (por ejemplo, las bombas Tet), pero muchas transportan una amplia gama de sustratos estructuralmente diferentes y se conocen como bombas de eflujo de resistencia a múltiples fármacos (figura 9) (Floyd, J. L. Smith, K. P. Kumar, S. H. 2010).

Existen ejemplos bien estudiados de bombas de eflujo MDR que están presentes en todas las bacterias, y se siguen describiendo nuevas bombas que exportan antibióticos. En los últimos 2 años, estos han incluido MdeA en *Streptococcus mutans*, FuaABC en *Stenotrophomonas maltophilia*, KexD en *Klebsiella pneumoniae* y LmrS en *Staphylococcus aureus* (Floyd, J. L. Smith, K. P. Kumar, S. H. 2010).

Las bombas de eflujo multiflujo inducibles son responsables de la resistencia intrínseca a los antibióticos de muchos organismos, y la mutación de los elementos reguladores que controlan la producción de bombas de eflujo puede conducir a un aumento de la resistencia a los antibióticos. Por ejemplo, la bomba de eflujo MexAB-OprM en *Pseudomonas aeruginosa* normalmente está regulada positivamente por la presencia de fármacos, pero las

mutaciones en su regulador (mexR) conducen a la sobreexpresión de MexAB-OprM, que confiere una mayor resistencia a los antibióticos, como b-lactámicos (Poole, K. 2001).

Las bombas de eflujo actualmente se clasifican en cinco grupos. 1) La superfamilia principal del facilitador (MFS) 2) la superfamilia del cassette de unión al adenosín trifosfato (ATP) son muy grandes y las otras tres son familias más pequeñas: 3) la familia de resistencia pequeña a múltiples fármacos (SMR), 4) la división de resistencia a división por nodulación (RND) superfamilia y 5) la familia de extrusión de compuestos tóxicos y multidroga (MATE). Los transportadores de eflujo se pueden clasificar en bombas simples o multicomponentes (Okusu, H. Ma, D. Nikaido, H. 1996).

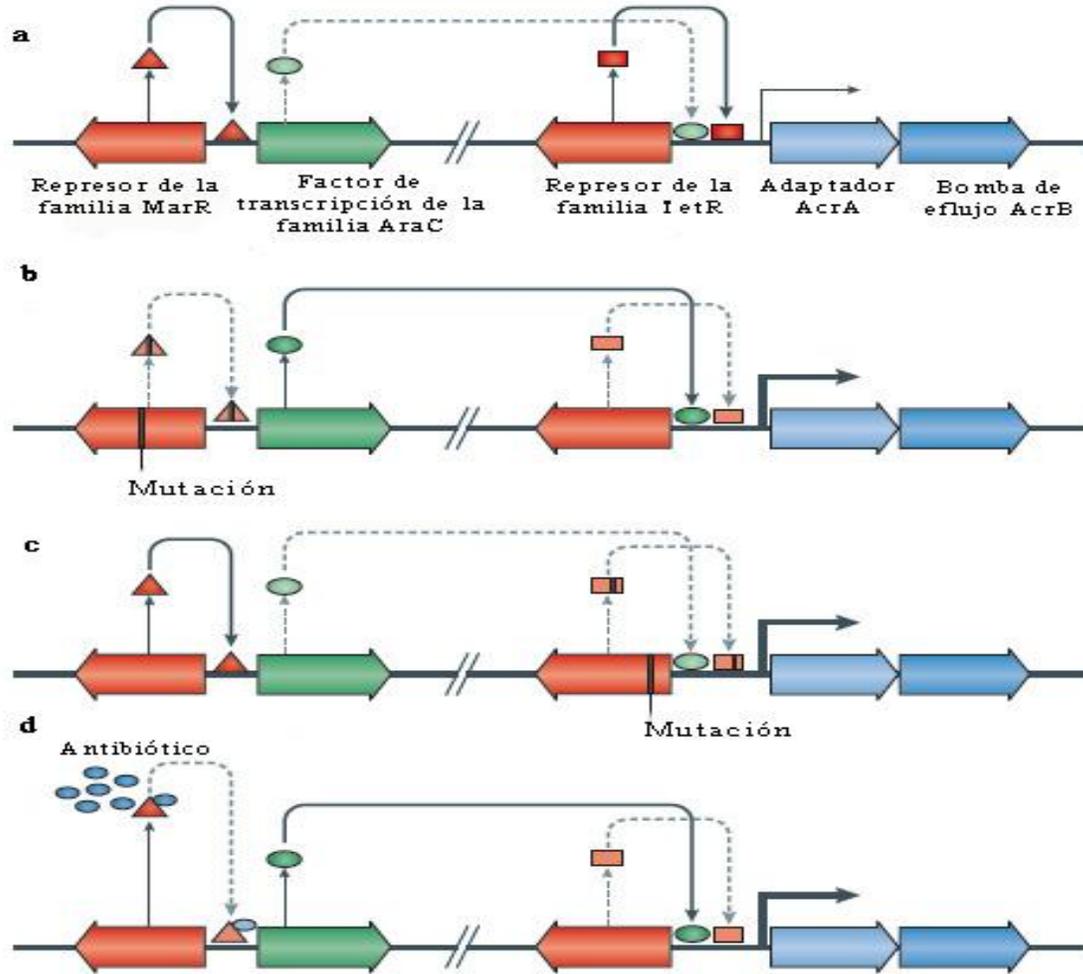


Figura 9. Vías que regulan el eflujo multidrogas **a** La expresión basal de resistencia las bombas de expulsión de la división de nodulación (RND) están controladas por una familia localmente codificada de TetR represor, y los niveles del factor de transcripción de la familia AraC, que pueden aliviar la represión mediada por TetR se mantienen bajos mediante la represión del represor de la familia de la proteína de resistencia a múltiples antibióticos (MarR). **b** Las mutaciones en el gen represor de la familia marR hacen que el represor pierda la capacidad de inhibir los activadores de la familia AraC. La expresión incrementada del activador AraC confiere una expresión aumentada de la bomba de eflujo RND AcrB y el adaptador periplásmico AcrA. **c** La mutación en el gen represor de la familia TetR reduce la unión del represor cadena arriba de acrA y acrB, lo que conduce a una transcripción incrementada de acrAB. **d** Los antibióticos se unen a MarR y provocan cambios conformacionales que evitan la represión del activador de AraC. El aumento de la expresión del activador AraC conduce a una mayor transcripción de acrA y acrB. Las vías activadas están indicadas por flechas sólidas y las rutas inhibidas están indicadas por flechas discontinuas (Blair, J. Webber, M. Baylay, A.J. Ogbolu, D. O. Piddock, L. 2014).

Aspectos genéticos de resistencia

Los estudios de una amplia variedad de patógenos bacterianos han identificado numerosos loci genéticos asociados con la resistencia a los antibióticos. Para algunos tipos de

resistencia existe una gran diversidad de determinantes genéticos responsables. La resistencia puede ser una propiedad intrínseca de las propias bacterias o puede ser adquirida. La resistencia antibiótica bacteriana adquirida puede ser el resultado de una mutación de la célula genes, la adquisición de genes de resistencia extraños o una combinación de estos dos mecanismos. Por lo tanto, hay dos formas principales de adquirir resistencia a los antibióticos: i) mediante la mutación en diferentes loci cromosómicos y ii) a través de la transferencia horizontal de genes (es decir, adquisición de genes de resistencia de otros microorganismos). Esto plantea varias preguntas sobre la evolución y la ecología de los genes de resistencia a antibióticos. Las ideas filogenéticas sobre la evolución y diversidad de varios genes de resistencia a antibióticos sugieren que al menos algunos de estos genes tienen una larga historia evolutiva de diversificación que comenzó mucho antes de la era antibiótica (Aminov, R.I. Mackie, R.I. 2007).

Mutación

Todos los organismos contienen una secuencia determinada de nucleótidos dentro de su genoma. Una mutación es una modificación heredable en la secuencia de pares de base del genoma llevando a cabo algunas modificaciones en la síntesis y metabolismo, de estas alteraciones algunas pueden ser malas y otras buenas. (Brock, Madigan, M. T. 2009, p. 312).

Aunque muchas mutaciones ocurren al azar, en todas las regiones pueden llegar a tener una mutación, las alteraciones que ocurren dentro del ADN codificante (3% del total) son las que traen peores consecuencias, este tipo de mutación conocida como mutación génica afecta principalmente a la parte estructural de ARN o proteínas sintetizadas alterando la secuencia de aminoácidos por otra parte las alteraciones que ocurren en otra región del gen denominada región no-codificante (región reguladora) produce variaciones en la expresión de proteínas provocando sobreexpresión o represión de proteínas. (Luque, J. Herraes, A. 2006, p. 344)

En cualquier genoma procariota, las mutaciones se producen constantemente debido a cambios en la base de nucleótidos causados por agentes exógenos, errores de ADN polimerasa, deleciones, inserciones y duplicaciones. Para procariotas hay una tasa constante de mutación espontánea de 0,0033 mutaciones / replicación de ADN que es uniforme para un amplio espectro de organismos. La tasa de mutación de genes individuales varía significativamente entre los genes y dentro de ellos. Algunas mutaciones son tan raras que algunos investigadores no logran detectarlas en cambio otras mutaciones ocurren tan a menudo que es difícil mantener un cultivo stock genéticamente estable. (Drake, J. W. 1999)

Las razones de estas variaciones son inciertas, pero se cree que están bajo la influencia de la secuencia de ADN local. Por ejemplo, se han detectado diferencias significativas entre las velocidades evolutivas de genes de proteínas de choque térmico dentro del género *Mycobacterium*. Los sitios no sinónimos del gen *GroEL* han evolucionado dos veces más rápido que los del gen *Hsp65*. Los genes de resistencia a los antibióticos que codifican funciones de replicación fundamentales del organismo tales como *rpoB* y *gyrA* son típicamente altamente conservados (Telenti, A. P. Imboden, 1993; Hughes, A. L. 1993).

Mutaciones espontaneas

Explorar los orígenes de los mutantes resistentes comenzó con la era de los antibióticos en la década de 1940, cuando los investigadores realizaron experimentos clásicos que demostraban que las mutaciones que confieren resistencia a ciertos antibióticos surgen antes o en ausencia de presión selectiva. Estos eventos de mutación ocurren aleatoriamente como errores de replicación o una reparación incorrecta de un ADN dañado en células que se dividen activamente. Se denominan mutaciones dependientes del crecimiento (mutaciones espontáneas) y presentan un modo importante de generar resistencia a los antibióticos (Krasovec, R. Jerman, I. 2003).

La resistencia a los antibióticos se produce por mutaciones puntuales de nucleótidos que son al mismo tiempo permisivas para el crecimiento y pueden producir un fenotipo de resistencia. (Woodford, N. Ellington, M.J. 2007).

Existe un número sustancial de mecanismos bioquímicos de resistencia a antibióticos que se basan en eventos mutacionales, como las mutaciones de las secuencias de genes que codifican el objetivo de ciertos antibióticos (por ejemplo, la resistencia a rifamicinas y fluoroquinolonas es causada por mutaciones en los genes que codifican los objetivos de estas dos moléculas, *RpoB* y ADN-topoisomerasas, respectivamente). La variación en la expresión de antibiótico por mutación (por ejemplo, la expresión o ausencia reducida de la porina *OprD* de *P. aeruginosa* reduce la permeabilidad de la pared celular a antibióticos carbapenémicos). Además de estos ejemplos, hay algunos patógenos clínicamente relevantes para los que no se han informado mecanismos de resistencia mediados por plásmidos o transposones (*Mycobacterium tuberculosis* aislado en pacientes infectados carece de los mecanismos de transferencia horizontal y, en consecuencia, puede adquirir resistencia a los antibióticos exclusivamente por mutaciones) (Ramaswamy, S. Musser, J.M. 1998).

Mutagénesis adaptativa

El proceso de mutación se ha estudiado clásicamente en bacterias que se dividen activamente, ya que se asumió que la mayoría de las mutaciones ocurren como consecuencia de errores durante el proceso de replicación del ADN (mutaciones espontáneas). Sin embargo, los datos experimentales más recientes han demostrado claramente que las mutaciones también surgen en células que no se dividen o se dividen lentamente y tienen alguna relación con la presión selectiva utilizada. Estas mutaciones, denominadas mutaciones adaptadas, surgen solo en presencia de presión selectiva no letal que las favorece. Esta es la característica principal que distingue ellos de las mutaciones espontáneas dependientes del crecimiento. El proceso de mutación adaptativa puede ser una de las principales fuentes de mutantes resistentes a antibióticos en condiciones naturales. (Taddei, F. Radman, M. Maynard-Smith, J. Toupance, B. 1997).

Los principales factores en este proceso son la respuesta al estrés (como parte de la respuesta SOS finamente regulada), las polimerasas de ADN V (*umuCD*) propensas a error y IV (*dinB*), que aumentan transitoriamente la tasa de mutación (Piddock, L.J. Wise, R. 1987). Se ha demostrado que algunos antibióticos (quinolonas, por ejemplo) pueden inducir la respuesta mutagénica SOS y aumentar la tasa de aparición de resistencia en *Escherichia coli* y se vio que puede expresar un fenotipo hipermutable frente a estreptomycin (Ren, L. Rahman, M.S. Humayun, M.Z. 1999).

Hipermutadores

Se ha aceptado ampliamente que la mutación es la consecuencia inevitable de los errores producidos en el proceso de replicación del ADN o de la falla de los sistemas que evitan los errores. Mantener la estabilidad de la información genética es vital para la perpetuación de las especies. Las bajas tasas de mutación espontánea se mantienen por la actividad de muchos mecanismos moleculares que protegen y reparan el ADN, así como por los mecanismos que aseguran la alta fidelidad de la replicación del ADN (Nakamura, S. Nakamura, M. Kojima, T. Yoshida, H. 1989).

Sin embargo, las bacterias con una tasa de mutación elevada (cepas hipermutables o mutadores) entre las poblaciones naturales y de laboratorios se han encontrado estudios experimentales que indican que la frecuencia de mutadores observada entre las bacterias naturales y clínicas, los aislamientos son mucho más altas de lo esperado, lo que sugiere que hay situaciones en la naturaleza en las que ser un mutador confiere una ventaja selectiva. Según el modelo actualmente más aceptado de "estado hipermutable", durante una presión selectiva antibiótica no letal prolongada, una pequeña población bacteriana entra en un estado transitorio de una alta tasa de mutación. Si una célula en este estado hipermutable logra una mutación útil, aliviando así la presión selectiva, la célula comienza

a crecer y reproducirse, y al mismo tiempo sale del estado hipermutable. Aún no está claro qué es lo que realmente hace que las células ingresen al estado hipermutable; sin embargo, parece que una hipermutación está regulada por un ADN-polimerasa mutador (pol IV) inducible por SOS (Krasovec, R. Jerman, I. 2003).

Tratamiento y medicamentos de primera línea para la tuberculosis

Aunque la TB es una enfermedad conocida desde hace mucho tiempo, su tratamiento farmacológico es relativamente reciente. Los progresos en la terapéutica se han dado de forma lenta pero continua desde que Waksman descubrió la estreptomina en 1944. A partir de ese momento en el tratamiento de la TB existen 3 fechas decisivas: el descubrimiento de la isoniazida en 1952, la introducción de la rifampicina en 1967 y cuando la pirazinamida se incorpora al tratamiento como medicamento de primera línea al final la década de los 70, lo que permitió acortar el tratamiento a 6 meses. Una terapia farmacológica eficaz reduce rápidamente la población de bacilos viables y con ello el riesgo de transmisión. El tratamiento de los casos de esputo positivo debe realizarse con la máxima premura (García, R. Lado, F. et-al 2003).

Es imprescindible conocer los principios bacteriológicos que rigen la quimioterapia de la TB para evitar errores en el planteamiento terapéutico, ya que un tratamiento incorrecto podría conducir al fracaso y al desarrollo de resistencias a los fármacos antibacilares. Los fármacos que se emplean en la pauta corta de 6 meses son la isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZ), etambutol (EMB) y estreptomina (SM). Son considerados fármacos de primera línea en función de su eficacia y tolerabilidad. Sin embargo, el tratamiento de pacientes tuberculosos plantea diversas dificultades: los bacilos son sólo sensibles a los fármacos bactericidas cuando están activos metabólicamente y en replicación; además, durante periodos indefinidos permanecen subpoblaciones de bacilos que sólo se activan de modo transitorio durante lapsos muy cortos y por último, puede haber mutantes farmacorresistentes incluso en poblaciones de bacilos que nunca han estado previamente expuestas a los antibióticos (García, R. Lado, F. et-al 2003).

Rifampicina

La rifampicina (RIF) es un derivado semisintético de la rifamicina antibiótico macrolido complejo, potente antibiótico de amplio espectro actuando frente a las micobacterias como bactericida y esterilizante. La acción bactericida altamente efectiva de este medicamento contra *M. tuberculosis* lo ha convertido en un componente clave de la terapia (The World Health Organization 1997).

Actúa frente a bacterias típicas y atípicas del genero *Mycobacterium*. Interviniendo como bactericida en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y esterilizando bacilos intracelulares y extracelulares (Osorio, L. Villegas, M. 1998).

Junto con INH, RIF es un importante agente anti-TB de primera línea y ha sido incluido en la quimioterapia estándar desde la década de 1980 (Mitchinson. D, 2000).

Mecanismo de acción

Así mismo el mecanismo de acción que tiene esta droga es fijarse de manera específica a la subunidad β del ARN-polimerasa dependiente del ADN (figura 11) de los bacilos y bloquear la elongación de ARNm cuando ésta alcanza 2 o 3 nucleótidos (Martinez, J. Sanchez, F. 2007).

La Rifampicina está incluida en una categoría selecta de agentes que retienen actividad contra bacilos tuberculosos de crecimiento lento, e incluso no replicantes (Sala, C. Dhar, N. Hartkoorn, R. et al 2010).

La mayoría de las bacterias poseen una sola enzima de ARN-Polimerasa dependiente de ADN que comprende varias subunidades $\alpha\beta\beta'\omega$ formando una estructura de tipo 'garra de cangrejo' (Borukhov S, Nudler E. 2008). Las subunidades β y β' constituyen los componentes principales de cada pinza de la garra, formando un surco que acomoda al molde de la doble cadena de ADN y proporciona un sitio catalítico para la formación de enlaces fosfodiéster, un canal secundario para nucleótidos entrantes y una salida separada para el crecimiento del ARN transcrito. En un ajuste complementario, RIF se une a la subunidad β codificada por *rpoB*, inhibiendo así la transcripción (figura 10). El análisis estructural del *Thermus aquaticus* ARNP (ARN-polimerasa) mostro el sitio de unión de RIF que está ubicado dentro del canal de ADN / ARN, pero no en el sitio activo (Campbell, E.A. Korzheva, N. Mustaev, A. et al. 2001).

Además, el ARNP unido a RIF retiene la capacidad de catalizar la formación del primer enlace fosfodiéster en un transcrito de ARN naciente, lo que sugiere que el RIF no inhibe la catálisis. En cambio, parece que el medicamento obstruye la ruta de una cadena de ARN en crecimiento de dos o tres nucleótidos de longitud: una vez que el elongamiento transcripcional está en pleno progreso, el ARNP ya no es vulnerable a la inhibición mediada por RIF. Por esta razón, la actividad RIF está restringida a una etapa muy específica de la transcripción (Campbell, E.A. Korzheva, N. Mustaev, A. et al. 2001). Sin embargo, el mecanismo preciso mediante el cual la interferencia transcripcional mediada por RIF conduce a la muerte celular no se comprende del todo bien.

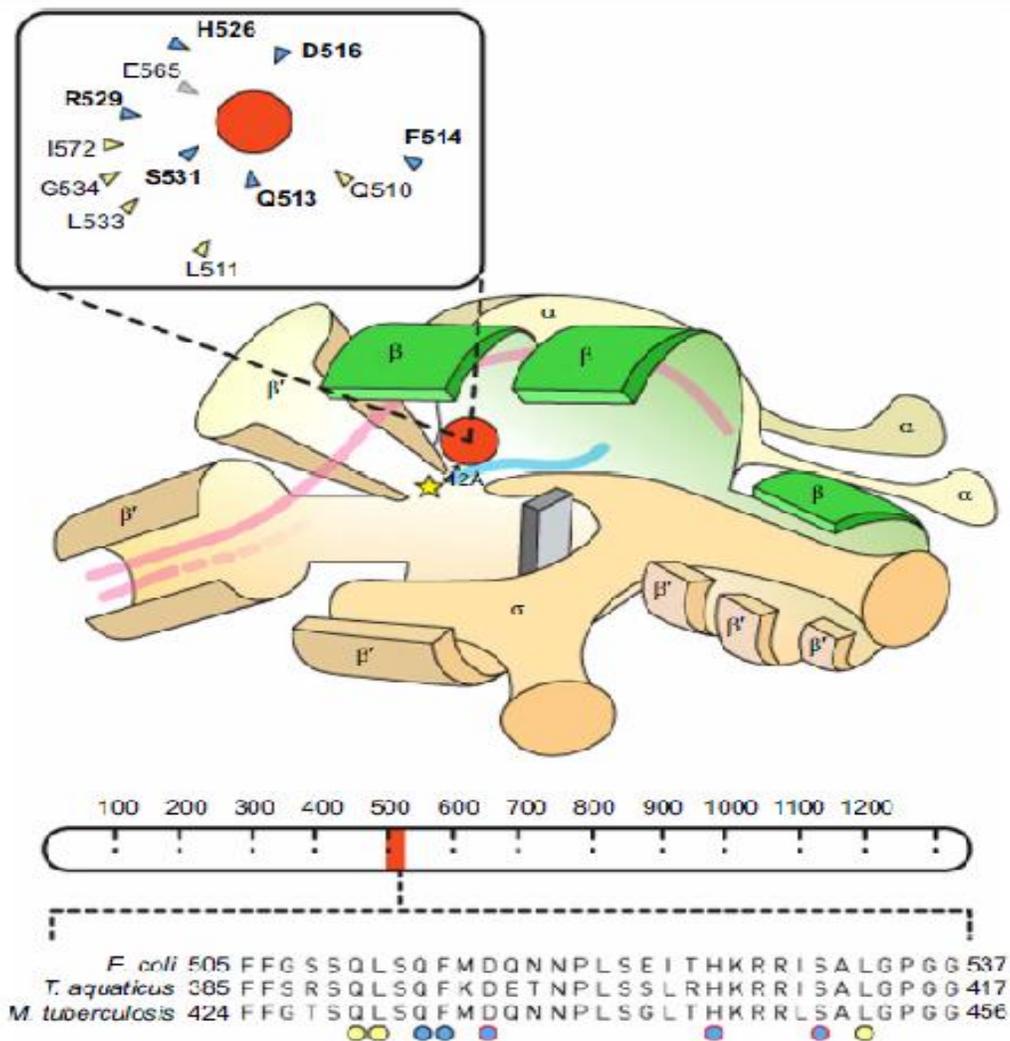


Figura 10. Representación esquemática de RNAP mostrando los sitios de mutación de tres diferentes bacterias ubicando una relación en el punto de mutación (Koch, A. Mizrahi, V. Warner, D.F. 2014)

Mecanismo de resistencia a Rifampicina

Se han descrito 2 mecanismos de resistencia para este fármaco: el primero por mutación del gen *rpoB* lo que genera una disminución en la afinidad por el antibiótico en la subunidad beta del ARN bacteriano; el segundo con disminución de la permeabilidad del fármaco en la membrana de la micobacteria. La resistencia a este medicamento se debe a una alteración en la ARN-polimerasa. Los primeros estudios en *Escherichia coli* mapearon mutaciones RIF^R en tres grupos distintos (I, II y III) dentro del gen *rpoB* (Campbell, E.A. Korzheva, N. Mustaev, A. et al. 2001). Durante muchos años se supo que las mutaciones sin sentido y las deleciones cortas en la región central del gen de la subunidad beta de la ARN-polimerasa (*rpoB*) dan como resultado una *Escherichia coli* resistente a rifampicina (Lisitsyn, N.

Sverdlov, A. et-al. 1984). Esta visión llevó a la caracterización del gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis* y a la identificación de una amplia variedad de mutaciones que confieren resistencia a RIF (Miller, L. P. Crawford, J. T. Shinnick, T. M. 1994).

Las micobacterias, al igual que otros géneros bacterianos, adquieren resistencia a la rifampicina mediante mutaciones en una región ya caracterizada de 81 pb (27 codones) de la región central del gen que codifica la subunidad β de la polimerasa del RNA (*rpoB*) (Miller, L. P. Crawford, J. T. Shinnick, T. M. 1994).

Incluso más del 96% de las cepas resistentes a RIF posee mutaciones en esta región y a pesar de que se han descrito 35 variantes alélicas, con ligeras variaciones en su distribución geográfica, las mutaciones más comunes (65–86%) son las que afectan al codón 526 o al codón 531 y dan lugar a una resistencia de alto nivel (CIM 432 mg/ml) (Musser, J. M. 1995).

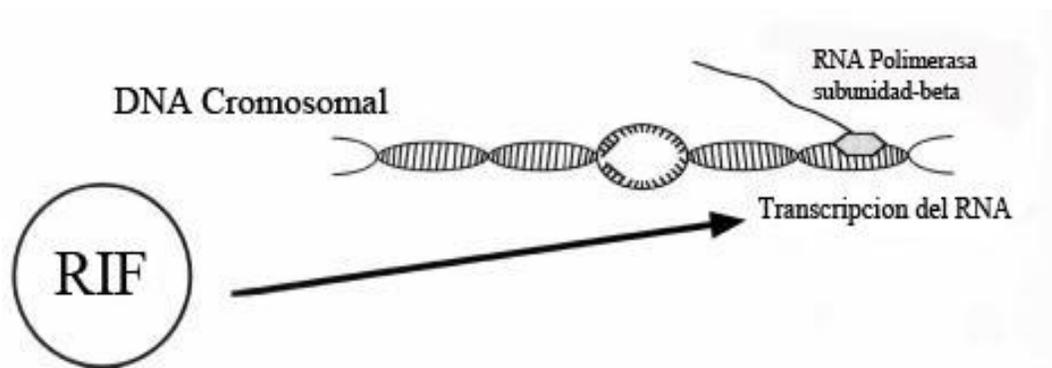


Figura 11. Mecanismo de acción de RIF, inhibe la transcripción uniéndose a la subunidad β de la RNA polimerasa (Parsons, L.M. Driscoll, J.R. Taber, H.W. Salfinger, M. 1997).

Isoniazida

La INH es un fármaco sintético de primera línea introducido en terapéutica en 1952. Los miembros del complejo tuberculoso son, generalmente, muy sensibles a la INH, mientras que el papel de la INH en el tratamiento de otras micobacterias es muy limitado, de hecho, esta droga es un profármaco que requiere activación de una catalasa-peroxidasa. Poco después de la introducción de la isoniazida, se observó que los aislados clínicos resistentes a la isoniazida con frecuencia perdían la actividad de la catalasa y la peroxidasa (Middlebrook, G. 1954).

Sin embargo, la asociación de esta enzima con la activación de isoniazida no se demostró hasta principios de la década de 1990, cuando se clonó y secuenció el gen primario de catalasa-peroxidasa micobacteriana (*katG*) (Zhang, Y. Heym, B. Allen, B. Young, D. Cole, S. 1992).

Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de INH, así como los mecanismos que confieren resistencia a INH, son complejos y no se comprenden completamente. Sin embargo, la evidencia sugiere que INH inhibe la biosíntesis de los ácidos micólicos de la pared celular (figura 12) (ácidos grasos β -hidroxilados de cadena larga α -ramificado), lo que hace que las micobacterias sean susceptibles a los radicales de oxígeno reactivos y otros factores ambientales (Shoeb, H.A Bowman, B.U. Jr Ottolenghi, A.C. Merola, A.J. 1985).

La activación de INH a un intermedio electrófilo inestable requiere la enzima catalasa-peroxidasa (KatG, codificada por *katG*) y un sumidero de electrones (peróxido de hidrógeno). Sin embargo, KatG es la única enzima capaz de activar INH y, en consecuencia, las cepas de MTB mutantes KatG son invariablemente resistentes a INH (Shoeb, H.A Bowman, B.U. Jr Ottolenghi, A.C. Merola, A.J. 1985).

Mecanismo de resistencia a isoniazida

Los primeros estudios realizados por Middlebrook demostraron que la resistencia a INH se asociaba con la pérdida de la actividad de catalasa. Los estudios genéticos demostraron que la transformación de las cepas *M. smegmatis* y MTB resistentes a INH con una *KatG* funcional restableció la susceptibilidad a INH y propuso la hipótesis de que la eliminación de *katG* puede causar resistencia a INH en MTB (Sherman, D.R. et al. 1995).

Sin embargo, en ausencia de una respuesta genética inducible por peróxido, mediada en la mayoría de las bacterias por el factor de transcripción *OxyR*, *KatG* es la única proteína MTB inducible por peróxido. En consecuencia, la resistencia de MTB a INH es paradójica; Tiene que sacrificar la función de *KatG*. La capacidad de MTB para adaptarse a la pérdida de la función *KatG* y combatir los peróxidos orgánicos es notable (Sherman, D.R. et al. 1995).

La resistencia a la isoniazida es un proceso complejo. Las mutaciones en varios genes, incluyendo *katG*, *ahpC*, *inhA*, *kasA* y *ndh*, se han asociado con la resistencia a la isoniazida. La isoniazida activada interfiere con la síntesis de ácidos micólicos esenciales al inhibir la enoil-ACP reductasa dependiente de NADH, que está codificada por *inhA*. Se ha demostrado que dos mecanismos moleculares son la causa principal de la resistencia a

isoniazida: mutaciones en *katG* y mutaciones en *inhA*, o más frecuentemente en su región promotora (Silva, M.S, Senna, S.G. Ribeiro, M.O. et al. 2003).

Se han encontrado que las mutaciones en *katG*, *inhA* y *ahpC* estaban más fuertemente asociadas con la resistencia a la isoniazida, una disminución o pérdida total de la actividad de catalasa / peroxidasa como resultado de las mutaciones de *katG* son las alteraciones genéticas más comunes asociadas con la resistencia a la isoniazida (Zhang, Y. Heym, B. Allen, B. et al 1992).

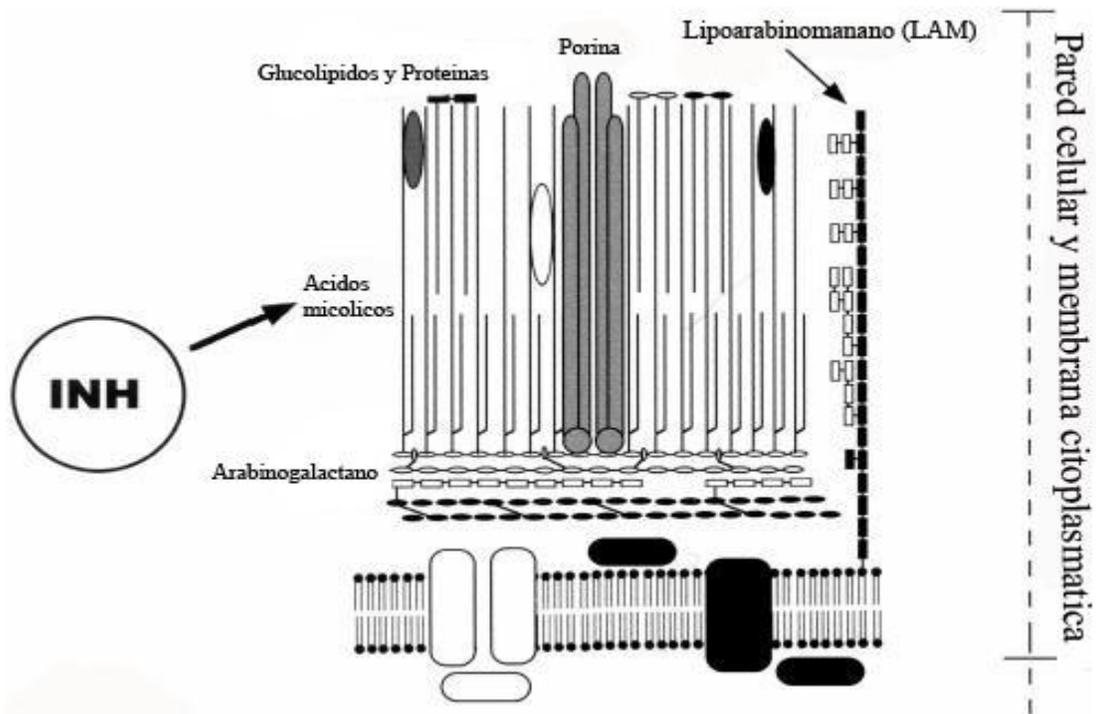


Figura 12. Sitios de acción previamente demostrados y propuestos de isoniazida (INH), esta droga antituberculosa inhibe la síntesis de ácidos micólicos (Parsons, L.M. Driscoll, JR. Taber, H.W. Salfinger, M. 1997)

Etambutol

Etambutol [(S, S9) -2,29- (etilendiimino) di-1-butanol; EMB] es uno de los principales medicamentos utilizados por primera vez en 1966 en combinación con isoniazida, rifampicina, estreptomina y pirazinamida para tratar la tuberculosis. El etambutol fue el último fármaco agregado al régimen actual de 4 fármacos utilizado para tratar la tuberculosis. El etambutol se agrega a la isoniazida, rifampicina y pirazinamida durante las primeras semanas de terapia para prevenir la resistencia a la rifampicina en los casos en que existe una resistencia a la isoniazida no reconocida (Takayama, K. Armstrong, E.L. Kunugi, K.A. et al.1979).

Mecanismo de acción

El etambutol es un inhibidor de la pared celular de algunas micobacterias; impidiendo el ingreso de la D-arabinosa en el arabinogalactano, lo que resulta en la acumulación de una molécula portadora de lípidos (Osorio, L. Villegas, M. 1998).

Mecanismo de resistencia a etambutol

La resistencia es el resultado de varios eventos genéticos responsables de la sobreexpresión del operón de genes homólogos *embCAB*, que codifica para la proteína Emb, a quienes se les atribuye la actividad de arabinosil transferasa, importantes en la biosíntesis de exopolisacaridos como el arabinomanano (Osorio, L. Villegas, M. 1998).

Solo el isómero dextro de Emb es biológicamente activo, una observación consistente con la idea de que el fármaco se une a un objetivo celular específico. Se identificaron tres genes organizados como un operón y se designaron *embCAB*, los genes *embCAB* de *Mycobacterium tuberculosis correspondientes* se identificaron a partir de una biblioteca de cósmidos ordenada que codifican las proteínas Emb. A estas proteínas se les atribuyen una función catalítica de arabinosil transferasa importante en la biosíntesis de moléculas extracelulares como el arabinomanano (Talenti, A. Philipp, W.J. Sreevatsan, S. Bernascono, C. 1997).

Pese a que el mecanismo por el cual *Mycobacterium tuberculosis* adquiere resistencia a etambutol no se ha establecido con claridad, hay varios estudios que podrían dar una cierta aclaración a este proceso de resistencia (Talenti, A. Philipp, W.J. Sreevatsan, S. Bernascono, C. 1997).

Hace algunos años, se demostró que en *Mycobacterium tuberculosis* los genes *embCAB* se organizaron como un operón de 10 kbp que codifica para la arabinosil transferasa micobacteriana. Usando un panel de *M. tuberculosis* que comprende aislados resistentes al etambutol, se encontró que cerca del 50% de ellos tenían mutaciones en el codón 306 de *embB* (Talenti, A. Philipp, W.J. Sreevatsan, S. Bernascono, C. 1997).

Recientemente, se ha postulado que las mutaciones en *embB306* pueden estar relacionadas con grados variables de resistencia al etambutol y que esta alteración molecular podría ser necesaria, pero no suficiente, para la resistencia del etambutol de alto nivel. Los estudios de intercambio alélico mostraron que las mutaciones individuales que producen ciertas sustituciones de aminoácidos causaron resistencia al etambutol, mientras que otras sustituciones de aminoácidos tuvieron poco o ningún efecto sobre la resistencia al etambutol (Safi, H. Sayers, B. Hazbon, M.H. et al. 2008).

Estreptomycin

La estreptomycin es un antibiótico glucosídico de aminociclitol perteneciente a los aminoglucosidos que fue el primer antibiótico utilizado en el tratamiento de la TB. La estreptomycin se aisló por primera vez del microorganismo del suelo *Streptomyces griseus*. En procariotas, su mecanismo de acción es inhibir el inicio de la traducción mediante la unión al ARNr 16S. Inicialmente, se observó que las cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes antes del tratamiento eran notablemente uniformes en su susceptibilidad a la estreptomycin. Desafortunadamente, como se usó como monoterapia, la resistencia a la estreptomycin emergió con bastante rapidez (Crofton, J. Mitchison, D.A. 1948).

Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la estreptomycin se basa en la unión del antibiótico a la estructura ribosomal 30S logrando inducir cambios en su conformación induciendo el bloqueo del ARNm provocando que la síntesis de proteínas se vea afectados tanto en su inicio como en la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena polipeptídica (Crofton, J. Mitchison, D.A. 1948).

Mecanismo de resistencia a estreptomycin

En *Mycobacterium tuberculosis* la base genética de la resistencia a la estreptomycin se debe principalmente a mutaciones en *rrs* o *rpsL*, que producen alteraciones en el sitio de unión a estreptomycin. Sin embargo, tales mutaciones se identifican en poco más del 50% de las cepas estudiadas hasta la fecha (Gillespie, S.H. 2002).

La mayoría de las mutaciones puntuales que producen resistencia a la estreptomycin se producen en *rpsL*, siendo la mutación más común K43R. También se han encontrado algunos aislados clínicos que muestran resistencia de bajo nivel a la estreptomycin y ninguna mutación en *rpsL* o *rrs*, (Zhang Y, Telenti A. 2000) y consecuentemente han sido teorizados como un mecanismo alternativo para la resistencia a la estreptomycin. Más recientemente se ha demostrado que las mutaciones en *gidB*, que codifica una 7 metilguanosina metiltransferasa conservada específica para el ARNr 16S puede conferir un bajo nivel de resistencia a la estreptomycin (Silva, P.E. Bigi, F. Santangelo, M.P. et al. 2001)

La frecuencia con la que aparecen mutantes resistentes en *Mycobacterium tuberculosis* es de 10^6 . En las micobacterias, el mecanismo conocido de resistencia a los aminoglucosidos es por alteración de la diana sobre la que actúan (ARN 16S) como consecuencia de mutaciones cromosómicas. Estas mutaciones afectan a los genes que codifican el ARNr 16S (*rrs*) y la proteína ribosómica S12 (*rpsL*). Es interesante recordar que la mayoría de eubacterias tienen varias copias del operón ARNr, mientras que *Mycobacterium*

tuberculosis solo tiene una. Así, en *Mycobacterium tuberculosis*, una mutación que origine cambios en los nucleótidos ya puede provocar resistencia (comportamiento dominante) (Musser, J. 1995).

Las mutaciones que afectan al gen *rpsL* se dan en el 52–59% de las cepas resistentes y producen una resistencia de alto nivel mientras que las mutaciones que afectan al gen *rrs* provocan una resistencia de un 8-21 % de las cepas desarrolladas esto logra una resistencia intermedia (Musser, J. 1995).

Resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis una bacteria biológicamente compleja cuenta con una gran gama de acciones anti droga tuberculosas sin duda alguna, la primera barrera de defensa es su pared celular altamente especializada y bioquímicamente compleja, es de carácter hidrofóbo causando una disminución en la permeabilidad de la mayoría de los componentes externos. Un sistema complejo de bombas de eflujo, enzimas que degradan las drogas antituberculosas y los genes encargados de esta función son encontradas en *Mycobacterium tuberculosis* (Zang, Y. Telenti, A. 2000).

Sin embargo, estudios de genética microbiana han mostrado que la resistencia de antibióticos antituberculosos se deben a una acumulación de mutaciones en la doble cadena de DNA provocadas por mutaciones espontaneas modificando los sitios de acción, los sitios de mutación, delección o inserción están asociados a provocar resistencia a drogas de primera línea (rifampicina, isoniazida, etambutol, pirazinamida y estreptomycin) y a varias drogas de segunda línea, no siempre las mutaciones en un punto de la doble cadena provocan un fenotipo MDR (multidrogorresistente) que es cuando la bacteria adquiere una resistencia a rifampicina e isoniazida. Esta forma de resistencia es habitualmente conocida por el mal uso de las drogas antituberculosas (Zang, Y. Telenti, A. 2000).

Mecanismos de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*

La historia de la TB cambió drásticamente después de la introducción de los primeros fármacos con actividad frente a micobacterias. Lo que hasta ese momento se consideraba como una enfermedad que debía tratarse en sanatorios se convirtió en una enfermedad que podía administrarse con antibióticos. Sin embargo, poco después de la introducción del primer antibiótico en 1944, surgió la resistencia a los medicamentos, principalmente debido al uso de la estreptomycin como monoterapia (Wolinsky, E. Reginster, A. Steenken, WJr. 1948).

Resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca a los medicamentos de *Mycobacterium tuberculosis* se ha atribuido tradicionalmente a la estructura inusual de su pared celular que contiene ácido micólico que otorga a las bacterias una baja permeabilidad para muchos compuestos, como los antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos (Jarlier, V. Nikaido, H. 1994).

En las bacterias, la permeabilidad de la membrana y las acciones de los mecanismos de transporte activo impiden el acceso de ciertos fármacos a los objetivos intracelulares. Estos constituyen un mecanismo general de resistencia a los medicamentos capaz de conferir resistencia a una variedad de fármacos estructuralmente no relacionados y compuestos tóxicos (Piddock, L.J. 2006).

Más recientemente, el papel de los mecanismos de eflujo también se ha reconocido como un factor importante en la resistencia natural de las micobacterias contra los antibióticos como la tetraciclina, las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos, entre otros (De Rossi, E. Ainsa, J.A. Riccardi, G. 2006).

La resistencia a los medicamentos en *Mycobacterium tuberculosis*, como en cualquier otra bacteria, es el resultado de múltiples mecanismos que operan simultáneamente. Podría ser debido a la acumulación de mutaciones en los genes diana durante un período de tiempo, exclusión de antibióticos por la pared celular altamente impermeable, la amplia gama de mecanismos de eflujo mediados por varios transportadores ABC (Cassette de unión a ATP) y proteínas de la súper familia principal facilitadora (SFM) (De Rossi, E. Ainsa, J.A, Riccardi, G. 2006) y para nombrar algunas otras formas de resistencia como las enzimas modificadoras y degradantes de antibióticos (Ainsa, J.A. et al. 1997).

Muy a menudo, los fármacos en investigación que tienen una inhibición enzimática excelente no presentan una inhibición igualmente potente de las bacterias, y este es un desafío importante en el campo del descubrimiento de fármacos para la TB. Entre otras causas, los mecanismos de eflujo contribuyen de manera importante a la resistencia intrínseca a las drogas. Se han descrito bombas de efluentes de *M. tuberculosis* pertenecientes a diferentes clases en los últimos años, y algunas bombas han sido bien caracterizadas (Ramon-Garcia S, Martin, C. Thompson, C.J. Ainsa, J.A. 2009).

Pertencen a la familia de MFS, súper familia ABC y SMR (resistencia a múltiples fármacos pequeños). La resistencia a medicamentos mediada por eflujo en *M. tuberculosis* podría deberse a una o más bombas de efusión que funcionan solas o en coordinación. Esto es posible debido a la redundancia de sus funciones, que pueden superponerse ampliamente (Piddock, L.J. 2006).

Los sistemas de eflujo de resistencia son característicamente dependientes de la energía, ya sea por la fuerza motriz del protón o por la hidrólisis del ATP. Recientemente, se han descrito en micobacterias bombas de resistencia y de eflujo mediadas por eflujo que confieren resistencia a uno o varios compuestos (Pidcock, L.J. 2006).

El genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* tiene 20 marcos de lectura abiertos que codifican proteínas putativas de eflujo (Danilchanka, O. Mailaender, C. Niederweis, M. 2008), aunque la mayoría de ellos aún no se han caracterizado.

Resistencia adquirida

A diferencia de la situación en otras bacterias donde la resistencia farmacológica adquirida está generalmente mediada por transferencia horizontal por elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones o integrones, en *M. tuberculosis*, la resistencia farmacológica adquirida está causada principalmente por mutaciones espontáneas en los genes cromosómicos, lo que produce la selección de cepas resistentes durante la terapia farmacológica (Kochi, A. Vareldzis, B. Styblo, K. 1993).

El *M. tuberculosis* tiene la particularidad de que en presencia o no de medicamentos acumula mutaciones espontáneas y al azar, confiriéndole una característica especial al generar cambios en los sitios de acción de los medicamentos antituberculosos y de esta forma adquirir resistencia a los mismos (Kochi, A. Vareldzis, B. Styblo, K. 1993).

Son tres los mecanismos por los que la *M. tuberculosis* puede generar resistencia a los fármacos: 1) Generando mecanismos de barrera que impidan la entrada del fármaco a la célula. 2) Generando enzimas que inactiven los fármacos a nivel intracelular 3) Modificando el blanco de acción del fármaco, donde se presentarían mutaciones puntuales en algún gen del microorganismo, siendo esta última la más comúnmente utilizada por este germen. Estos mecanismos no son excluyentes y algunas poblaciones bacterianas pueden combinar uno o varios mecanismos para generar resistencia. Hay que tener en cuenta que la mutación *per se* de un sitio de acción no siempre conlleva a resistencia. La probabilidad de que se genere resistencia para INH es (1:10⁸), RIF es (1:10⁸), Etambutol (E) (1:10⁶) y estreptomycin (S) (1:10⁵); por lo que la probabilidad para que se dé una doble mutación a medicamentos como INH y RIF es de (1:10¹⁶) (Osorio, L. Villegas, M. 1998).

En procariotas, las mutaciones espontáneas se producen a una tasa baja de 0,0033 por replicación. La tasa de mutación por pares de bases es inversamente proporcional al tamaño del genoma. Estudios anteriores han demostrado que la tasa de mutación depende de la naturaleza de la selección del fármaco, pero para la mayoría de los fármacos principales contra la TB, esto ocurre a una tasa de 10⁻⁹ mutaciones por división celular. Esta es la razón principal por la que se administran medicamentos antituberculosos como combinación, ya

que el riesgo de que un mutante contenga dos mutaciones de resistencia es $<10^{-18}$ (Gillespie, S.H. 2007).

5. DISEÑO METODOLOGICO

Tipo de estudio

Descriptivo observacional

Población de estudio

En el presente trabajo se consideraron 64 cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* correspondientes al primer trimestre de la gestión 2016 provenientes de diferentes laboratorios que conforman la RLNT, de los cuales se dividieron en 2 grupos de 32 cultivos por grupo para considerar el efecto de la temperatura y tiempo en sus diferentes perfiles de susceptibilidad en base a su fecha de primocultivo.

Criterios de inclusión

- Cultivos eugonicos (con desarrollo de colonias abundante y con población representativa como se muestra en la figura 13)
- Cultivos con más de 30 días de incubación en base a la fecha de primocultivo

Criterios de exclusión

- Cultivos disgónicos (desarrollo escaso de colonias como se muestra en la figura 14)
- Cultivos con más de 60 días de incubación después de la fecha de primocultivo
- Cultivos diferentes a *Mycobacterium tuberculosis* (cepas atípicas)
- Cultivos secos (medio de cultivo deshidratado por la temperatura de incubación)

Criterios de eliminación

- Se eliminaron 6 cepas que se contaminaron en el proceso correspondiente a los diferentes laboratorios regionales, 2 cepas de Potosí, 3 cepas de Tarija y 1 cepa de la región del Beni.

Lugar

Las muestras se procesaron en el laboratorio de la unidad de Tuberculosis del INLASA de las muestras procedentes de las diferentes regiones del país que fueron enviados en el primer trimestre de la gestión 2016 (tabla 2).

Técnicas de estudio

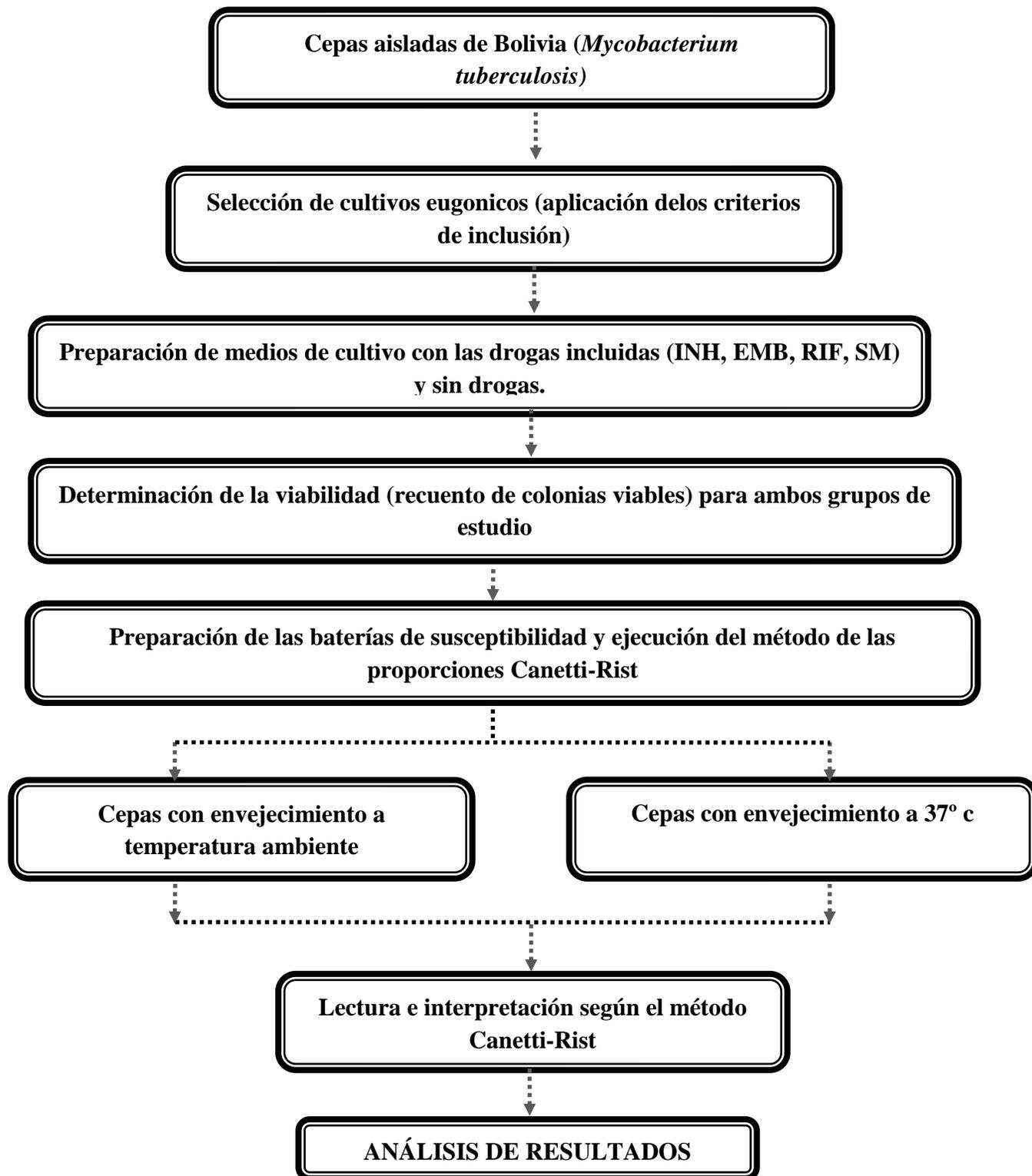
- Pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas por el método de las proporciones Canetti-Rist.
- Recuento de colonias en medio de cultivo Lowenstein-Jensen

Tabla 2

Cultivos recolectados de los diferentes laboratorios de la red nacional de Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA 2016).

Ciudad	Cultivos eugonicos
LA PAZ	4
COCHABAMBA	20
SANTA CRUZ	21
TARIJA	9
BENI	4
SUCRE	3
POTOSI	3
TOTAL	64

Procesamiento de las muestras



Selección de cepas para estudio

Para el presente estudio se emplearon cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en la RNLT de Bolivia, los cuales están encargados de cultivar y enviar las cepas a Laboratorio de LRN, enviando cultivos eugonicos y disgonicos. Los cultivos que se tomaron en cuenta para el estudio de susceptibilidad a drogas antituberculosas fueron los que presentaron desarrollo eugonico debido a que la población bacteriana es representativa y factible para realizar el estudio (figura 13 y 14).



Figura 13. Cultivo eugonico de *Mycobacterium tuberculosis* (Laboratorio de Referencia Nacional de Tuberculosis 2016)



Figura 14. Cultivo disgonico de *Mycobacterium tuberculosis* (Laboratorio de Referencia Nacional de Tuberculosis 2016)

Se seleccionaron todas las muestras del primer trimestre de la gestión 2016 con un total de 64 muestras (tabla 2).

Preparación de los medios de cultivo con y sin drogas antituberculosas de primera línea

Para los diferentes estudios realizados se preparó el medio de cultivo Lowenstein-Jensen con y sin la incorporación de drogas antituberculosas de primera línea.

Preparación del medio de cultivo Lowenstein-Jensen sin drogas

Tabla 3

Preparación de tampón fosfato

REACTIVO	CANTIDAD	UNIDAD
Fosfato mono potásico (KH_2PO_4)	2.4	g
Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.24	g
Citrato de magnesio	0.6	g
L-Asparagina	3.6	g
Agua destilada	600	mL

Los reactivos se disolvieron en 500 mL de agua destilada y se homogenizaron hasta obtener una solución homogénea, seguidamente se determinó el pH y se procedió a esterilizar en autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos.

Tabla 4

Preparación del reactivo inhibidor

REACTIVO	CANTIDAD	UNIDAD
Verde de malaquita	2	g
Agua destilada	100	mL

Se disolvió el inhibidor en el volumen total de agua y se esterilizó en autoclave a temperatura de 121°C por 15 minutos, se procedió a filtrar la solución con la ayuda de una gasa y algodón.

La albumina requerida para el cultivo se obtuvo de 25 huevos de gallina los cuales deben ser previamente lavados, enjuagados y desinfectados usando etanol al 70% para evitar contaminación del medio.

En un matraz Erlenmeyer de 2000 mL se homogenizó los huevos hasta que no se observe rastros de yemas enteras, se añadió 600 mL del tampón fosfato, 20 mL del inhibidor verde de malaquita, 12 mL de glicerina Bi-destilada estéril y 2 g de Asparagina. Se homogenizó y

se procedió a repartir 5 mL de la solución preparada en tubos de 150X15 mm. La solución se llevó a un coagulador de 50-60 grados y una temperatura de 80° C durante 15 minutos.

Preparación del medio Lowenstein-Jensen con drogas

La preparación de los medios de cultivo Lowenstein-Jensen con drogas se preparó agregando la droga a la solución ya descrita con anterioridad. El medio de cultivo se prepara incorporando las drogas previo al proceso de coagulación.

Tabla 5

Solventes para preparar las soluciones stock. Cantidad que se debe agregar a 100 mg de cada droga

DROGA	SOLVENTE	VOLUMEN DE SOLVENTE PARA 100 mg DE DROGA	CONCENTRACION FINAL DE DROGA ug/ mL
Isoniazida	Agua destilada	10.0 mL	10000
Estreptomina	Agua destilada	8.0 mL	10000
Etambutol clorhidrato	Agua destilada	8.9 mL	10000
Rifampicina*	Alcohol etílico 95%	5.0 mL	20000

Tabla 6

Preparación de las diluciones de drogas a partir de las soluciones stock para agregar el medio. Cantidades para 500 mL de medio

DROGA	DILUCION A PARTIR DE SOLUCION STOCK	VOLUMEN DE DISOLUCION QUE SE AGREGA A 500 mL
Isoniazida	Dilución A: 1:10 concentración 1000 ug/mL Dilución B: 1:10 concentración 100 ug/mL	1 mL
Estreptomina	Dilución A 1:5 concentración 2000 ug/mL	1 mL
Etambutol clorhidrato	Dilución A: 1:10 concentración 1000 ug/mL	1 mL
Rifampicina	Solución madre sin diluir	1 mL

Las soluciones Stock deben ser preparadas a partir de las drogas puras el mismo día de la preparación de los medios de cultivo.

Tabla 7

Concentración de drogas antituberculosas en el medio Lowenstein-Jensen para la prueba de susceptibilidad (Método de las proporciones Canetti-Rist)

DROGA	CONCENTRACION ug/mL	CANTIDAD ug PARA 500 mL DE MEDIO
Isoniazida	0.2	100
Estreptomicina	4.0	2.000
Etambutol clorhidrato	2.0	1.000
Rifampicina	40.0	20.000

La dilución de las drogas antituberculosas contenida en 1 mL se incorporó a 500 mL del medio agitando suavemente durante 5 minutos.

Seguidamente se procedió a realizar el control de esterilidad incubando los medios de cultivo a 37°C por 3 días.

Determinación de la viabilidad y crecimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a diferentes temperaturas en función al tiempo de envejecimiento

Una de las causas para que el método de las proporciones Canetti-Rist se invalide puede ser a una pérdida progresiva de la función biológica de viabilidad de la micobacteria ocasionado por el envejecimiento dando cultivos sin desarrollo debido a esta razón y no así por efecto de la droga obteniendo resultados como falsos sensibles.

Para la determinación analítica de la viabilidad se utilizaron las cepas aisladas en los diferentes laboratorios pertenecientes a la Red Nacional de Tuberculosis de *Mycobacterium tuberculosis* que corresponde a 64 cepas de estudio aisladas en medio de Ogawa.

Para que el estudio tenga un valor estadísticamente significativo los 64 cultivos se dividieron en 2 grupos de 32 muestras para ambos casos.

El inóculo se preparó realizando una suspensión de colonias en estudio a una concentración de 1 en la escala de McFarland debido a que la recolección de las colonias conlleva un arrastre de medio y esto hace que la concentración del bacilo no sea un aproximado al de la escala McFarland, realizando una dilución seriada a escala decimal en 6 tubos que

contengan 4,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de la suspensión madre de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} con una concentración final de 1/10 de la suspensión inicial.

Para lograr observar colonias contables se tomó 200 uL de la dilución 10^{-6} preparada que corresponde a un factor de 1/1000000 de cada muestra recolectada y se inocularon por duplicado en medios de cultivo de Lowenstein-Jensen sin drogas incluidas ya preparados y se llevaron a incubación por un periodo de 45 días a 37° C.

Para ambos grupos de estudio todos los cultivos se dejaron envejecer hasta llegar a los 70 y 90 días de antigüedad, y el mismo procedimiento se repitió, para el primer grupo se dejó envejecer a una temperatura constante de 37° C (tabla 8) y el segundo a temperatura ambiente que corresponde en un rango de 16 a 20° C (tabla 9), estas dos temperaturas se determinaron en base a revisión bibliográfica y experiencia en el campo laboral ya que se presentaron casos en los que el medio de cultivo presento resequedad y por el retraso de envíos de los cultivos por los problemas ya mencionados con anterioridad.

La comparación de las medias del recuento de colonias de los grupos estudiados se utilizó el estadístico ANOVA.

Tabla 8

Recolección y selección de cultivos del grupo 1 (37° C) del primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA 2016).

Ciudad	Cantidad de cepas recolectadas
La paz	1
Cochabamba	11
Santa cruz	10
Beni	2
Potosí	1
Tarija	3
Total cepas	28

Tabla 9

Recolección y selección de cultivos del grupo 2 (entre 16 y 20° C) del primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA 2016).

Ciudad	Cantidad de cepas recolectadas
La paz	3
Cochabamba	9
Santa cruz	11
Beni	1
Tarija	3
Sucre	3
Total cepas	30

Determinación de perfiles de resistencia de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a diferentes temperaturas en función al tiempo de envejecimiento

El método de las proporciones se preparó realizando una suspensión de las cepas en estudio que se mantuvieron envejeciendo a una incubación constante de 37° C para el grupo 1 y a temperatura ambiente (entre 16 y 20° C) para el grupo 2, después los primocultivos se prepararon a una concentración de 1 en la escala Mcfarland, el procedimiento se realizó tomando con el asa bacteriología estéril una parte de cada colonia para obtener una muestra representativa de la población del bacilo de cada cultivo, luego se introdujo las colonas en un frasco con perlas de vidrio estéril para homogenizar la muestra en un Vortex y se ajustó la suspensión con agua destilada a 1 en la escala Mcfarland que contiene 1 mg/mL (suspensión madre) a partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas a escala decimal en 6 tubos que contengan 4,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de la suspensión madre de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} con una concentración final de 1:10 de la suspensión inicial.

Para la siembra de las suspensiones bacilares se tomaron las diluciones con escala decimal de 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-6} y se inocularon 200 uL de esta suspensión en medios de cultivo Lowenstein-Jensen con las drogas antituberculosas incorporadas (RIF, SM, INH y EMB) a diferentes concentraciones (tabla 7) y sin la incorporación de la droga como patrón de crecimiento, debido a que se puede llegar a obtener colonias incontables como punto de comparación se inoculan diferentes diluciones desde la más diluida 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-3} para realizar una buena lectura de la prueba, la incubación se llevó a cabo por 45 días a 37°C, es importante que las primeras 48 horas se deje la tapa rosca sin ajustar para que el agua en exceso del inóculo se evapore y la concentración de bacilos se ajuste.

Para determinar las bacterias mutadas identificadas por el método de las proporciones se realizó un recuento de las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* de las diluciones en los medios de control (medio Lowenstein-Jensen sin droga) de la prueba y se comparó el desarrollo en los medios con drogas incorporadas.

La identificación de sensibilidad se realizó a través de la comparación del recuento de colonias con la proporción crítica establecida para cada droga en los dos medios de cultivo preparados (con droga y sin droga) tomando en cuenta como punto de corte de sensibilidad el 1% de crecimiento de colonias en el cultivo con droga, el desarrollo de colonias en medios de cultivo con la droga incorporada mayor con recuento mayor al 1% en comparación con su patrón se considera como resistente a la droga.

Este procedimiento se realizó en tres ocasiones tomando como control los resultados de los cultivos de 30 y 60 días y con un envejecimiento de 70 y 90 días

Análisis estadístico

Para la comparación de las medias de los grupos estudiados se utilizará el estadístico ANOVA y el método de Tukey.

Financiamiento

El presente trabajo fue financiado por el INLASA y el Programa Nacional de Control de Tuberculosis.

Aspectos bioéticos

No aplica debido a que el estudio se realizó con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y no así con pacientes.

Todos los resultados mostrados son una combinación de los factores estudiados de tiempo y temperatura sobre los perfiles de susceptibilidad.

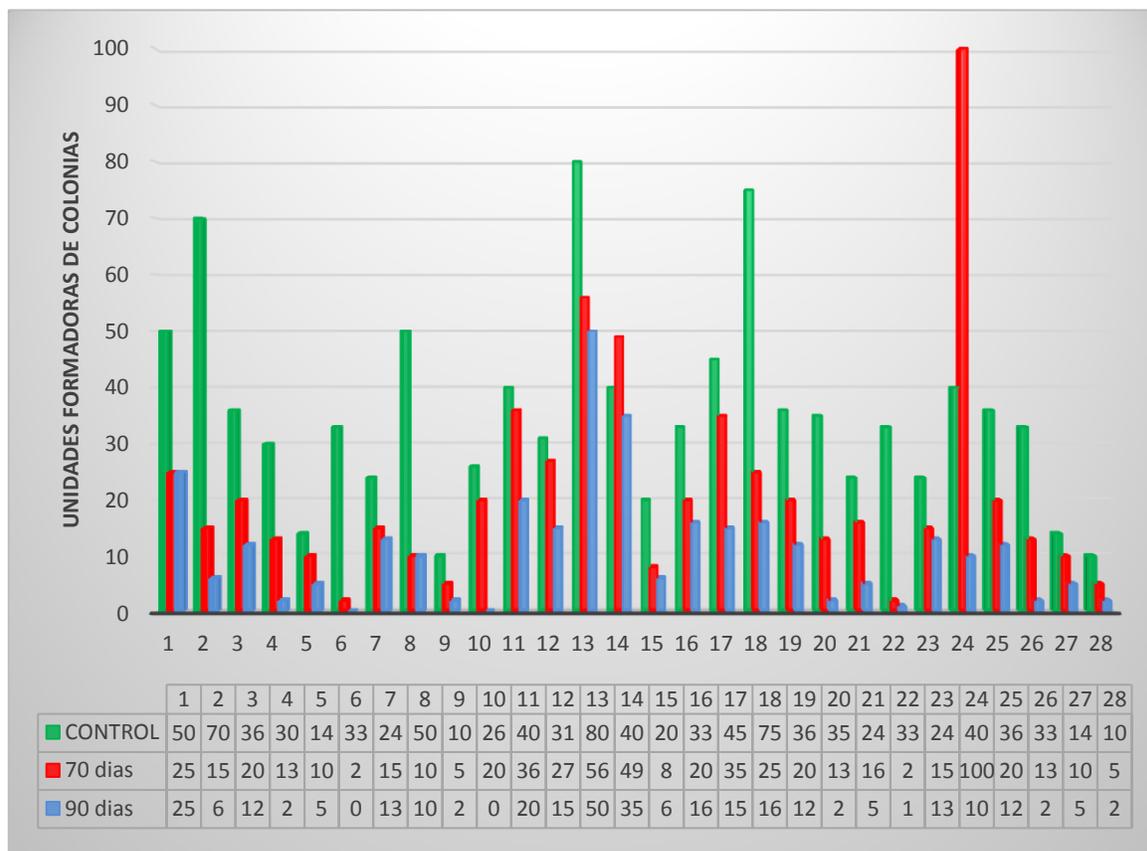
6. RESULTADOS

Influencia del envejecimiento en periodos de tiempo entre 30-60 días (grupo control) y 70 y 90 días en relación a la temperatura de exposición en la viabilidad y crecimiento en los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*.

El recuento de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* aislados en Bolivia muestra una disminución progresiva en función al tiempo en comparación con el recuento de las colonias control (grafica 1).

Comparando el recuento de colonias con un envejecimiento de 70 y 90 días después de la fecha de primocultivo tomando como control a los recuentos de colonias frescas de 30 y 60 días utilizando el estadístico ANOVA con una confiabilidad de $p < 0.05$ se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio y utilizando el test de Tukey se muestra una diferencia del grupo control con los grupos de 70 y 90 días.

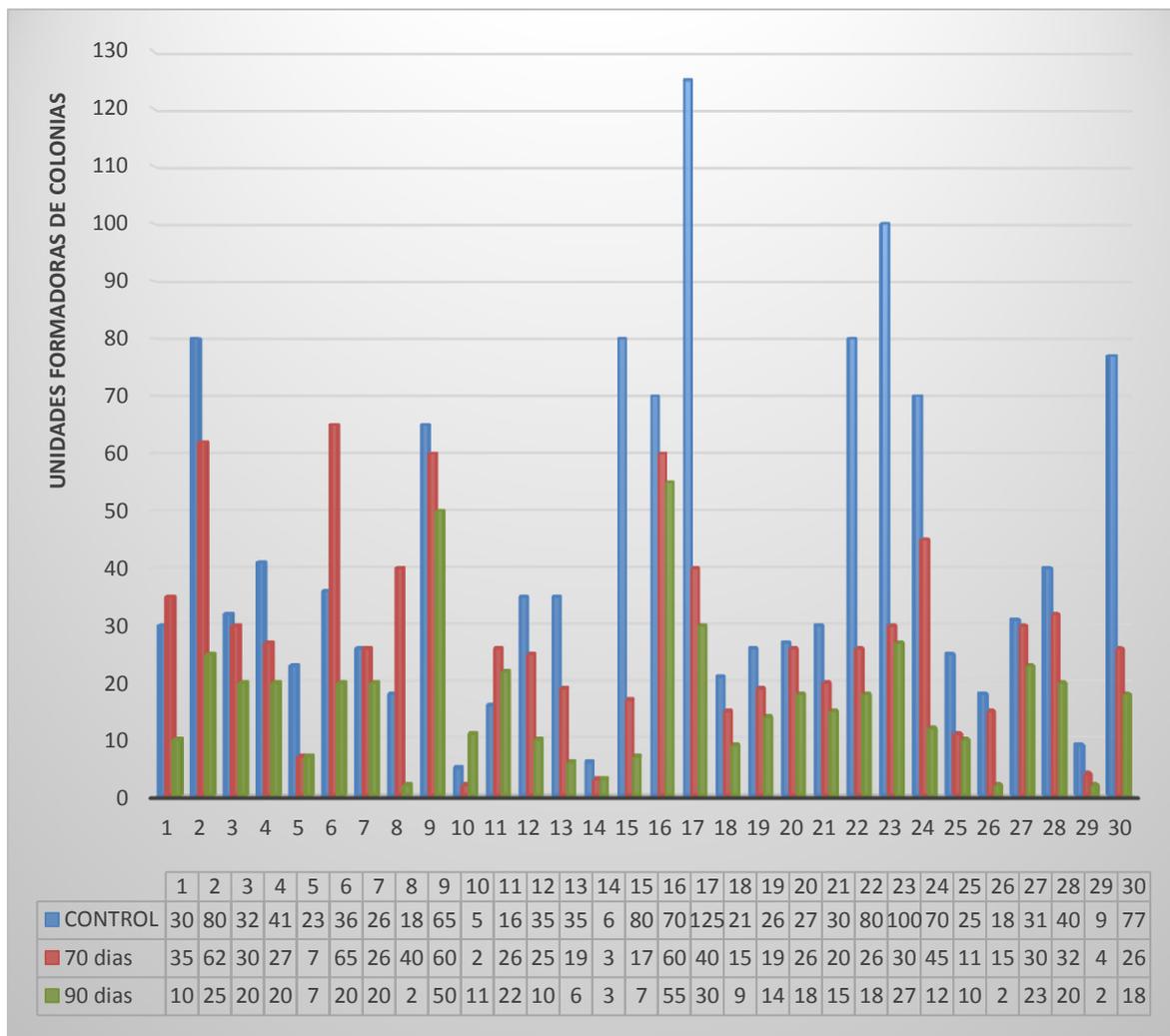
Grafica 1. Recuento de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* con envejecimiento de 70 y 90 días a partir de la fecha de primocultivo a temperatura de 37° C de cultivos aislados en Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).



El recuento de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* aislados en Bolivia muestra una disminución progresiva en función al tiempo en comparación con el recuento de las colonias del grupo control (grafica 2).

Comparando el recuento de colonias con un envejecimiento de 70 y 90 días después de la fecha de primocultivo tomando como control a los recuentos de colonias frescas de 30 y 60 días utilizando el estadístico ANOVA con una confiabilidad de $p < 0.05$ se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio y utilizando el test de Tukey se muestra una diferencia del grupo control con los grupos de 70 y 90 días de envejecimiento a temperatura ambiente.

Grafica 2. Recuento de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* con envejecimiento de 70 y 90 días a partir de la fecha de primocultivo a temperatura ambiente (16 y 20° C) de cultivos aislados en Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).



Influencia de la temperatura de exposición en los perfiles de susceptibilidad en cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas antituberculosas de primera línea en periodos de tiempo entre 30-60 días (grupo control) y 70 y 90 días de envejecimiento del primocultivo.

Resultados de los perfiles de susceptibilidad por el método de las proporciones Canetti-Rist de los grupos de 70 y 90 días de envejecimiento son comparados con el grupo control mostrando un cambio en el perfil de susceptibilidad en una de las muestras (cepa 3) del grupo con 90 días de envejecimiento (tabla 10).

En la tabla 10 se muestran el total de cepas resistentes y sensibles de cada droga en cada uno de los cultivos que se realizaron las pruebas por periodos de tiempo y exposición a temperatura de 37° C y el cambio que experimenta por periodos de 70 y 90 días a partir de la fecha de primocultivo.

Los resultados de los perfiles de susceptibilidad por el método de las proporciones Canetti-Rist en relación al tiempo de exposición de envejecimiento de los grupos de 70 y 90 días de envejecimiento en comparación con el grupo control no muestra ningún cambio manteniendo el mismo perfil por encima de los 60 días de antigüedad (tabla 11).

En la tabla 11 se muestran el total de cepas resistentes y sensibles de cada droga en cada uno de los cultivos que se realizaron las pruebas por periodos de tiempo y exposición a temperatura ambiente y el cambio que experimenta por periodos de 70 y 90 días a partir de la fecha de primocultivo.

TABLA 10

Perfiles de susceptibilidad con diferentes tiempos de envejecimiento a temperatura de 37° C en cultivos aislados en Bolivia del primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).

CEPAS	CONTROL				70 DIAS				90 DIAS			
	RIF	INH	SM	EM	RIF	INH	SM	EM	RIF	INH	SM	EM
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R=0	R= 1	R= 1	R=0	R=0	R= 1	R= 1	R=0	R=0	R= 1	R=2	R=0
	S=28	S=27	S=27	S=28	S=28	S=27	S=27	S=28	S=28	S=27	S=26	S=28

resultados por el método de las proporciones Canetti-Rist con el punto de corte > al 1% de crecimiento en los medios con drogas incluidas:

R= resistente, S= sensible

TABLA 11

Perfiles de susceptibilidad con diferentes tiempos de envejecimiento a temperatura ambiente (entre 16 y 20° C) en cultivos aislados en Bolivia del primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).

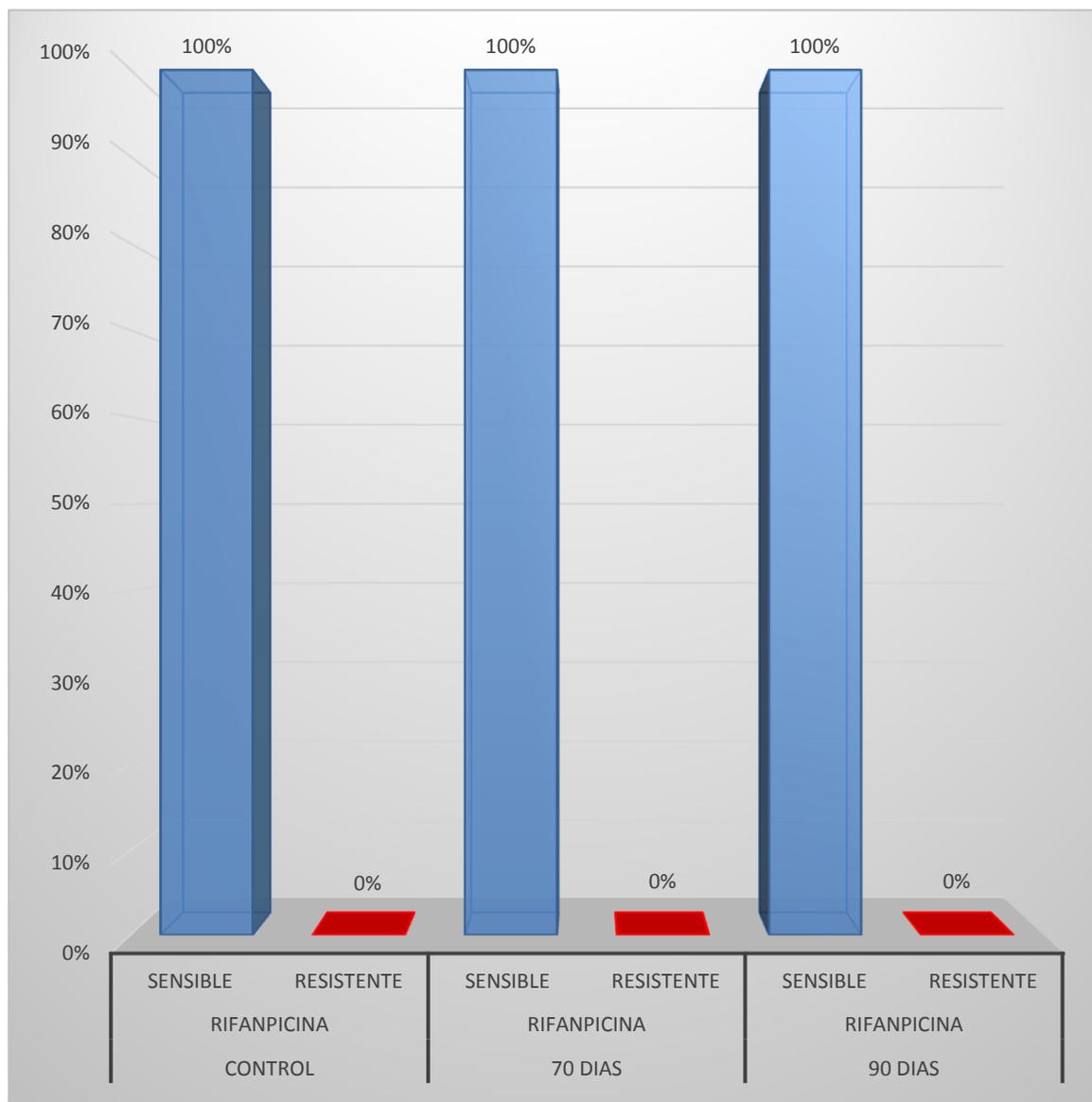
CEPAS	CONTROL				70 DIAS				90 DIAS			
	RIF	INH	SM	EM	RIF	INH	SM	EM	RIF	INH	SM	EM
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
16	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S
25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	R=3	R=1	R=1	R=0	R=3	R=1	R=1	R=0	R=3	R=1	R=1	R=0
	S=27	S=29	S=29	S=30	S=27	S=29	S=29	S=30	S=27	S=29	S=29	S=30

Resultados por el método de las proporciones Canetti-Rist con el punto de corte > al 1% de crecimiento en los medios con drogas incluidas:

R= resistente S= sensible

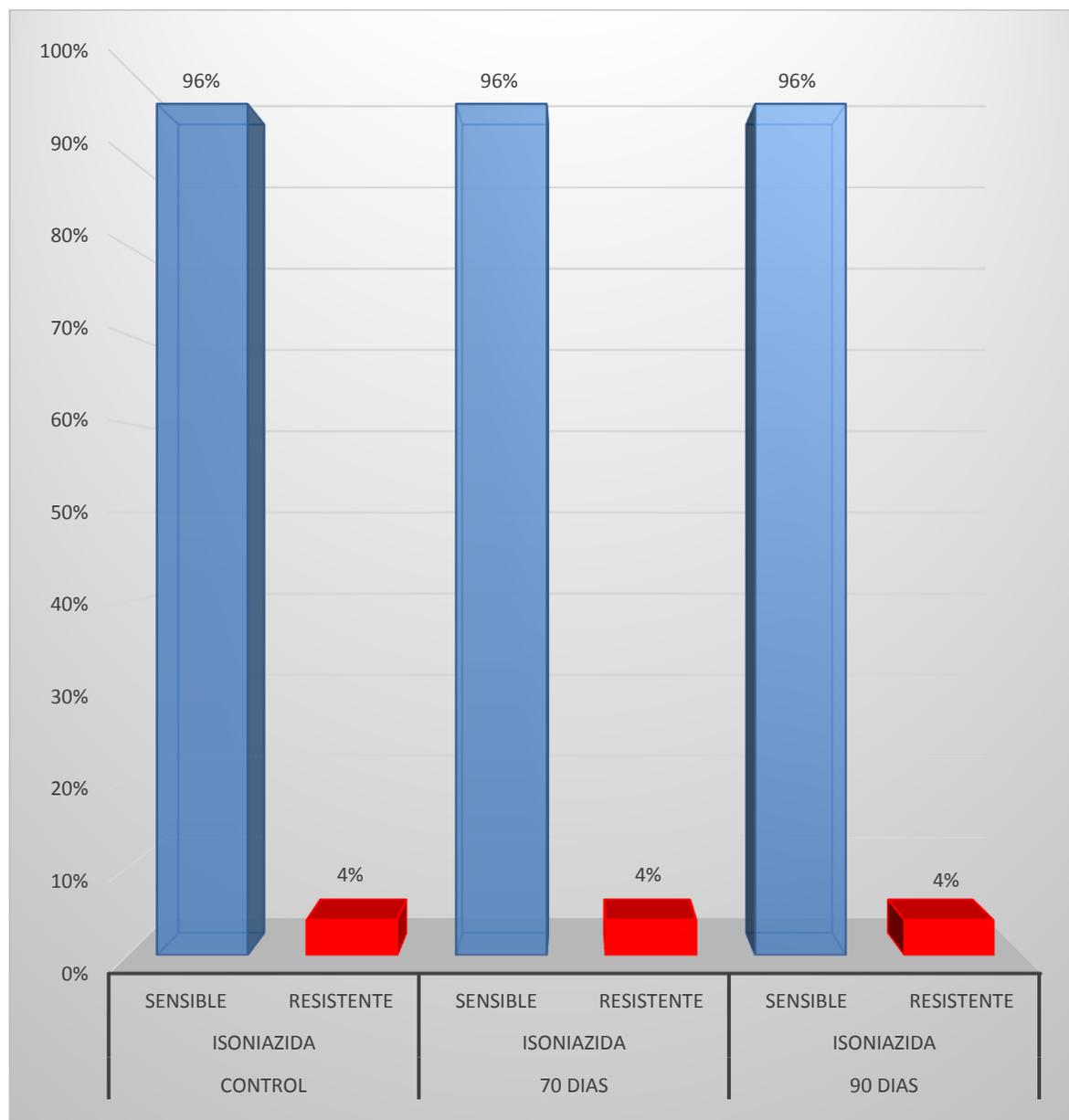
El efecto que tiene el envejecimiento en diferentes tiempos a una temperatura de 37° C comparando los perfiles de los grupos con 70 y 90 días con el grupo control, el porcentaje de resistencia a Rifampicina del 0% (ningún cultivo presento cambios en su perfil de resistencia) junto con el porcentaje de sensibles del 100% (representa la sensibilidad de los 28 cultivos analizados) los resultados se mantienen sin mostrar modificaciones (gráfica a 3).

Gráfica 3. Verificación de perfiles de susceptibilidad a Rifampicina en relación al tiempo y temperatura de 37° C en cultivos aislados en Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).



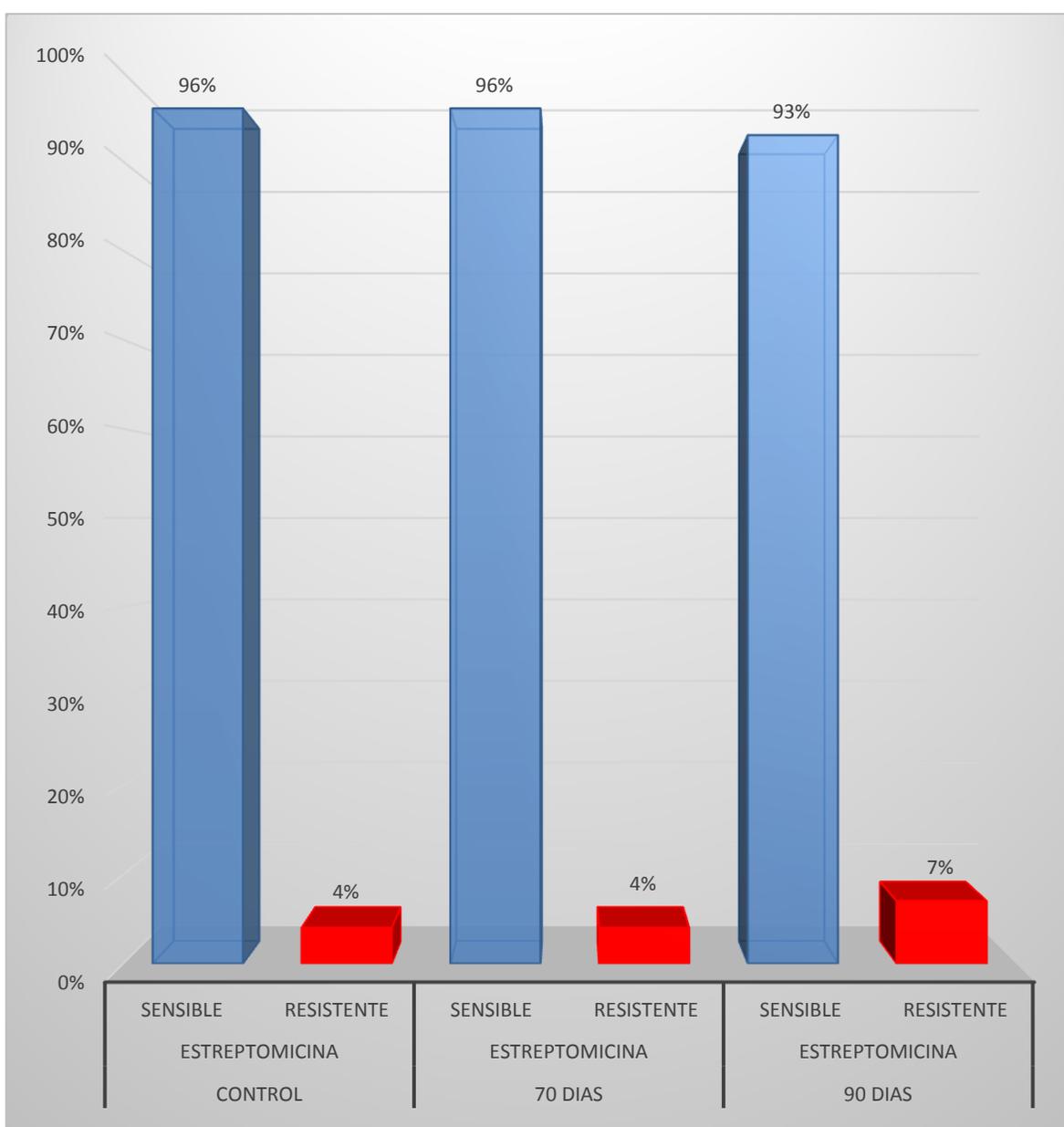
El efecto que tiene el envejecimiento en diferentes tiempos a una temperatura de 37° C muestra un porcentaje de resistencia a Isoniazida del 4% (1 de los cultivos presenta resistencia) en todos los casos y los perfiles de sensibilidad de 96% (27 cultivos del total son sensibles) sin mostrar modificación en los resultados en base al tiempo y temperatura. Los resultados mostrados son una comparación del envejecimiento a 37° C con 70 y 90 días con el grupo control (30 y 60 días) (gráfica 4).

Gráfica 4. Verificación de perfiles de susceptibilidad a Isoniazida en relación al tiempo y temperatura en cultivos aislados en Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).



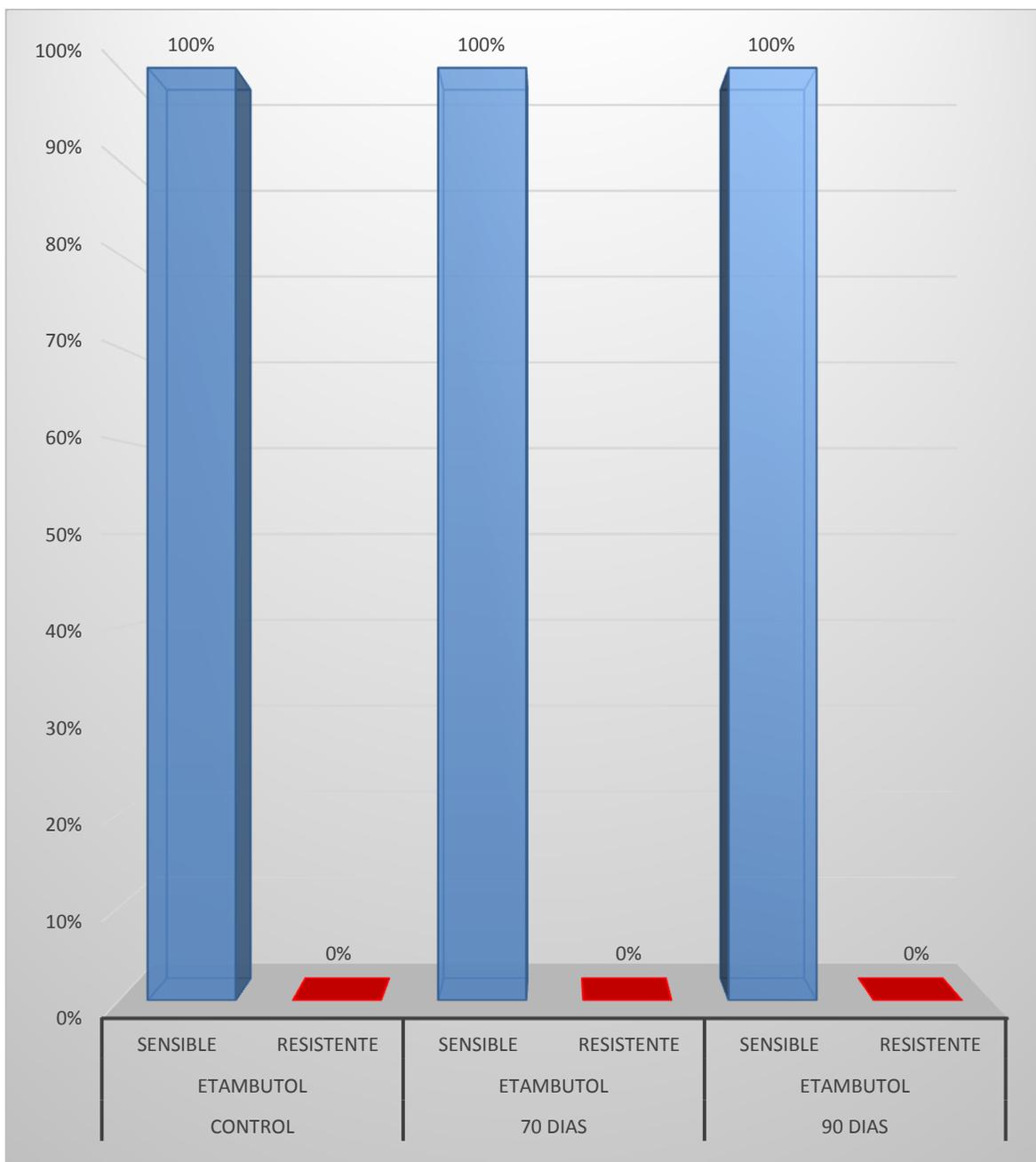
El efecto que tiene el envejecimiento en diferentes tiempos a una temperatura de 37° C muestra un porcentaje de resistencia a Estreptomicina del 4% (1 muestra) en el grupo control de 30 a 60 días como establece la norma y mantienen ese porcentaje hasta los 70 días de envejecimiento, a los 90 días de antigüedad de primocultivo el porcentaje de resistencia aumenta a 7% (2 muestras) observando una alteración en el perfil de resistencia a estreptomicina. El 97% (27 cultivos) disminuye a 93% (26 cultivos) (gráfica 5) (INLASA).

Gráfica 5. Verificación de perfiles de susceptibilidad a Estreptomicina en relación al tiempo y temperatura de 37° C en cultivos aislados en Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016.



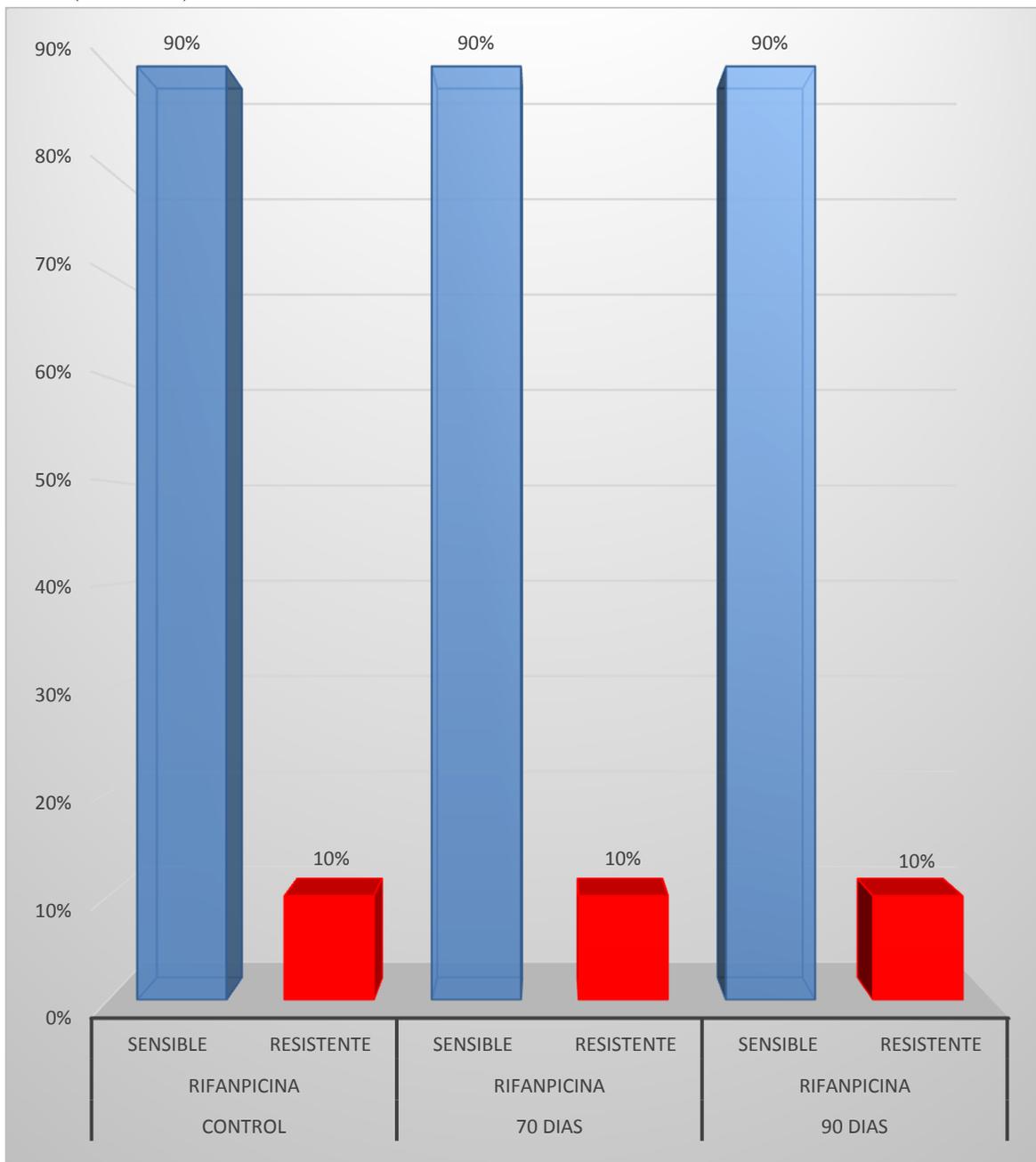
El efecto que tiene el envejecimiento en diferentes tiempos a una temperatura de 37° C muestra un porcentaje de resistencia a Etambutol del 0% en todos los casos y los perfiles de sensibilidad de 100% (los 28 cultivos muestran sensibilidad) sin mostrar modificación en los resultados en base al tiempo y temperatura (gráfica 6).

Gráfica 6. Verificación de perfiles de susceptibilidad a Etambutol en relación al tiempo y temperatura de 37° C en cultivos aislados en Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).



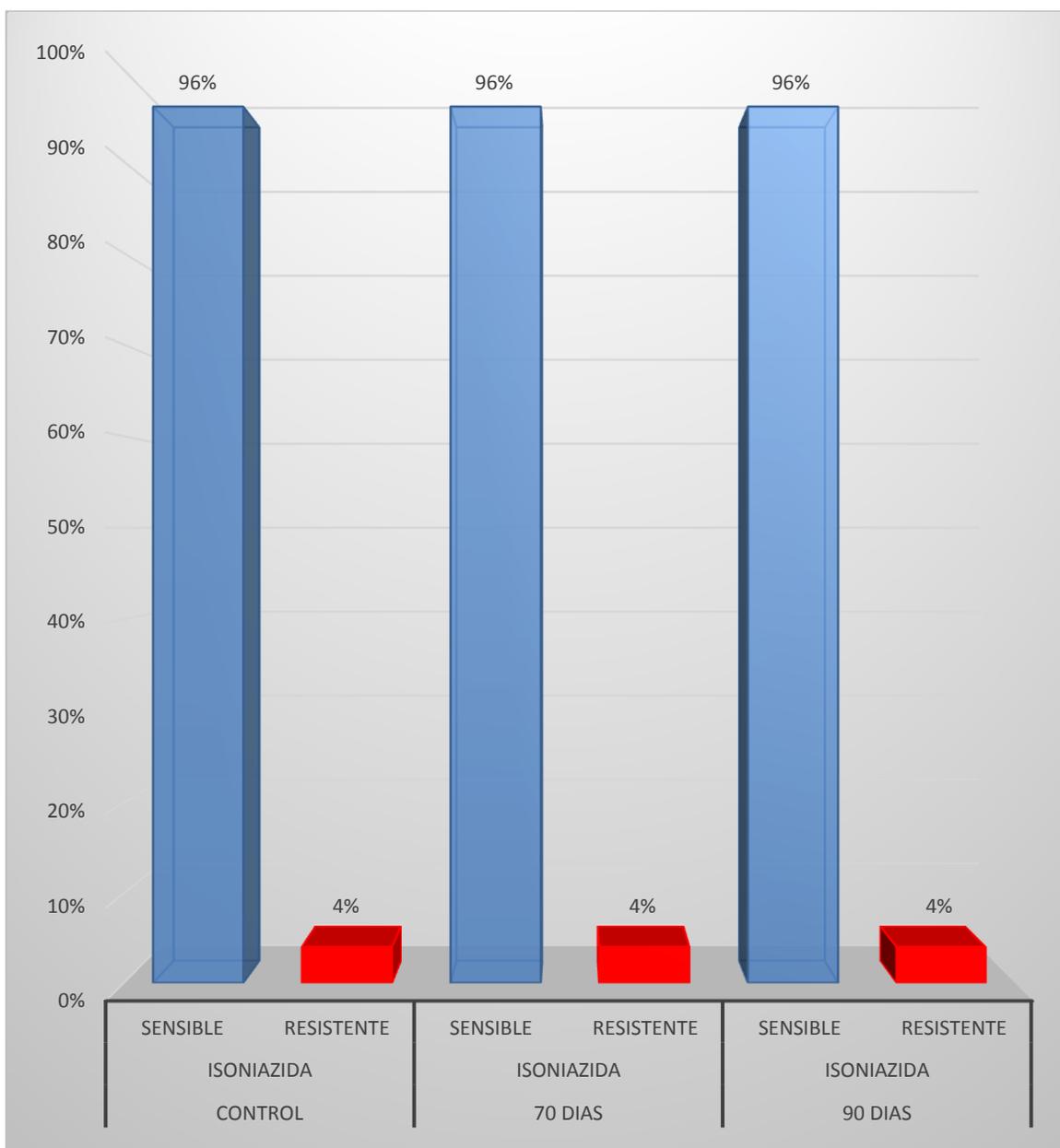
El efecto que tiene el envejecimiento en diferentes tiempos a una temperatura ambiente entre 16 y 20° C muestra un porcentaje de resistencia a Rifampicina del 10% (3 cultivos) en todos los casos y los perfiles de sensibilidad de 90% (27 cultivos) sin mostrar modificación en comparación con los resultados en base al tiempo y temperatura con los perfiles control (gráfica 7).

Gráfica 7. Verificación de perfiles de susceptibilidad a Rifampicina en relación al tiempo y temperatura ambiente en cultivos aislados en Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).



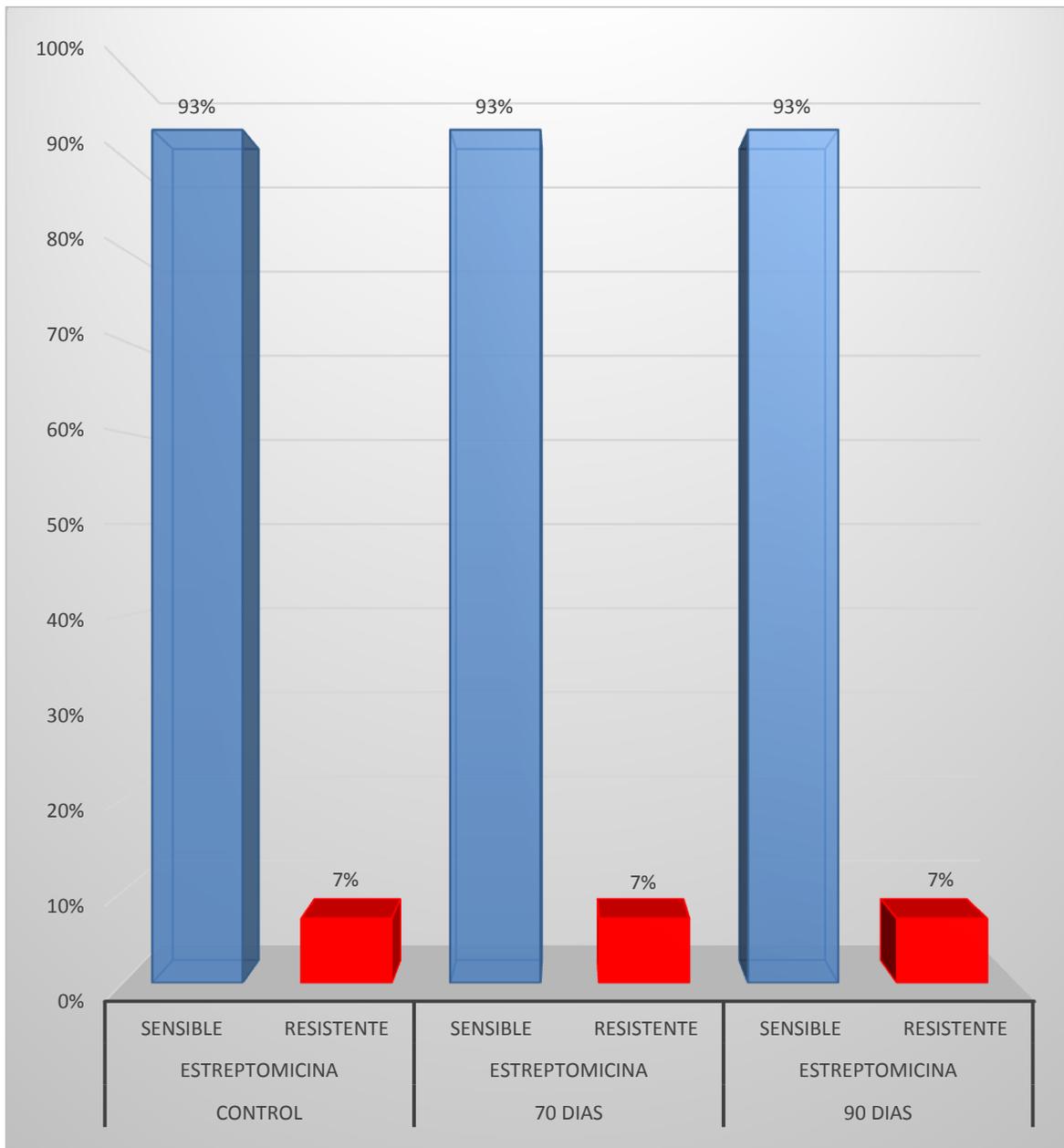
El efecto que tiene el envejecimiento en diferentes tiempos a temperatura ambiente (entre 16 y 20° C) muestra un porcentaje de resistencia a Isoniazida del 4% (1 cultivo) en todos los casos y los perfiles de sensibilidad de 96% (29 cultivos) sin mostrar modificación en los resultados en base al tiempo y temperatura en comparación con los perfiles control (gráfica 8).

Gráfica 8. Verificación de perfiles de susceptibilidad a Isoniazida en relación al tiempo y temperatura ambiente en cultivos aislados en Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).



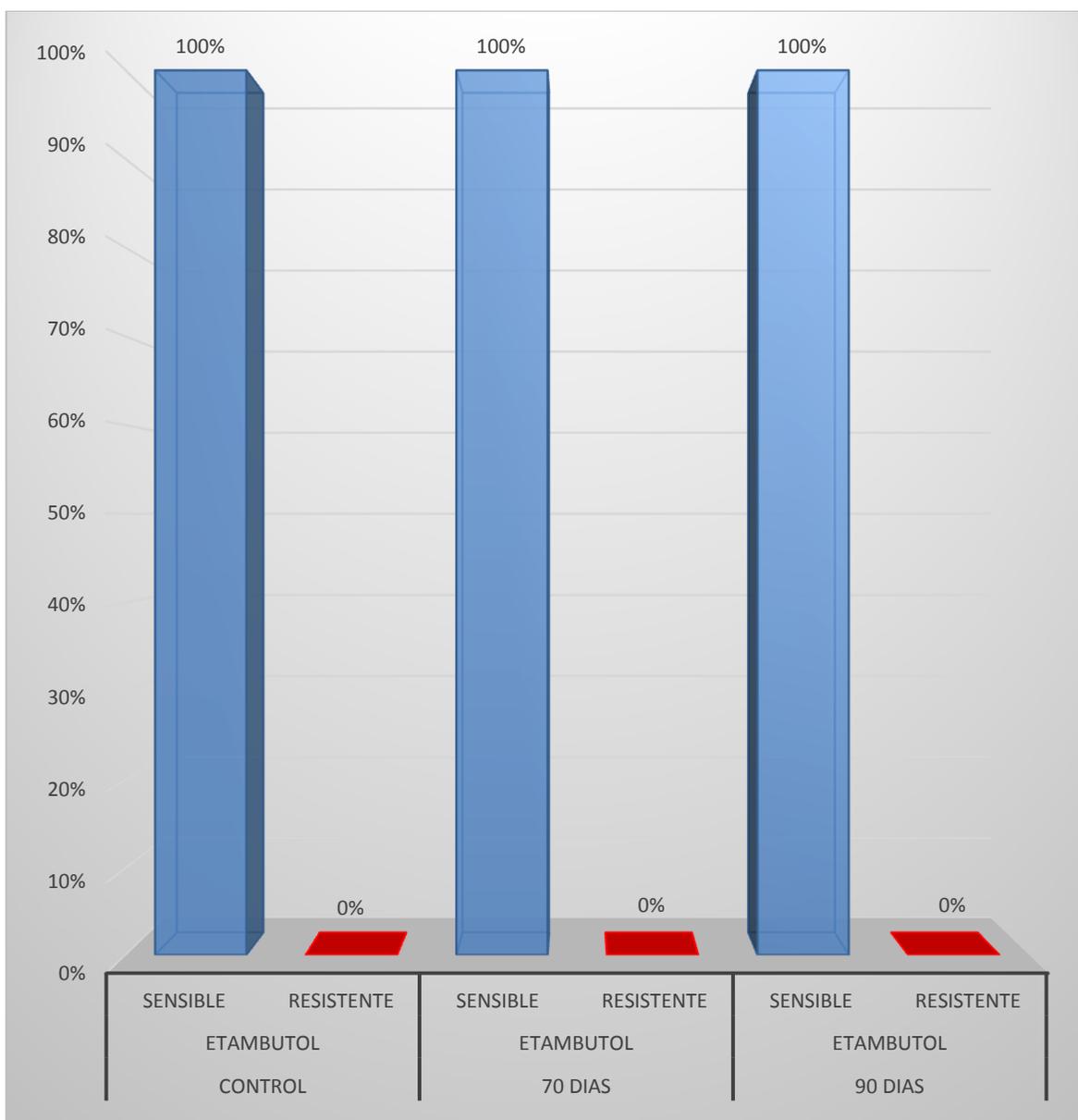
El efecto que tiene el envejecimiento en diferentes tiempos a una temperatura ambiente (entre 16 y 20° C) muestra un porcentaje de resistencia a estreptomicina del 7% (2 cultivos) en todos los casos y los perfiles de sensibilidad de 93% (28 cultivos) sin mostrar modificación en los resultados en base al tiempo y temperatura.

Gráfica 9. Verificación de perfiles de susceptibilidad a Estreptomicina en relación al tiempo y temperatura ambiente en cultivos aislados en Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).



El efecto que tiene el envejecimiento en diferentes tiempos a una temperatura ambiente (entre 16 y 20° C) muestra un porcentaje de resistencia a Etambutol del 0% (ningún cultivo mostro cambios) en todos los casos y los perfiles de sensibilidad de 100% (30 cultivos sensibles) sin mostrar modificaciones en comparación con los perfiles control en base a al tiempo y temperatura (gráfica 10).

Gráfica 10. Verificación de perfiles de susceptibilidad a Etambutol en relación al tiempo y temperatura ambiente en cultivos aislados en Bolivia en el primer trimestre de la gestión 2016 (INLASA).



7. DISCUSION

Hoy en día es indiscutible evitar hablar de nuevas técnicas como lo son los que usa la biología molecular para el diagnóstico de diferentes patologías, sin embargo, dejar a un lado las técnicas y métodos tradicionales no es una opción para nuestro país, la bacteriología tradicional con sus métodos nos ofrece el cultivo y aislamiento, otorgándonos una variedad de ventajas sobre todo en el aislamiento del bacilo de Koch que es fundamental sobre todo para implementar nuevas técnicas, otra de sus ventajas es la de realizar pruebas de susceptibilidad para drogas antituberculosas de primera y segunda línea brindando una amplia gama del perfil de resistencia de tratamiento de la tuberculosis.

Para nuestro país es casi imposible dejar a un lado el método de las proporciones Canetti-Rist para el estudio de susceptibilidad a drogas antituberculosas, pese a su gran desventaja en cuanto al tiempo de obtención de resultados de más de 60 días aun es de gran utilidad para el uso e implementación de nuevas técnicas, al constituirse como método de referencia es el Gold Standard mundial para validar nuevos métodos de diagnóstico (Vasquez, A. Camacho, M. Molina, J. 2011).

El método de las proporciones Canetti-Rist para el estudio de los perfiles de susceptibilidad es una técnica aun utilizada en Bolivia y aplicada en el Laboratorio de Referencia Nacional de Tuberculosis dependiente del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud, este método requiere de cultivos frescos y eugónicos para su ejecución lo que significa que un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* debe exceder de un periodo de incubación mayor a 60 días y es por ello que su verificación en cuanto a la aplicación de este método en cultivos que no sean frescos es necesario. Para este trabajo se emplearon 64 cultivos frescos de *Mycobacterium tuberculosis* pertenecientes al primer trimestre de la gestión 2016, estos cultivos son provenientes de los laboratorios que conforman la Red Nacional dedicados al cultivo de Micobacterias (Tabla 1).

La resistencia a las drogas antituberculosas por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* se atribuye generalmente a mutaciones genéticas en ciertos puntos clave, bombas de eflujo y otros genes que son los responsables de la resistencia, así como también los sitios de acción que se ven modificados en su estructura, pero no en su función otorgando a las células mutadas viabilidad y proliferación (Zhang, Y, Telenti, A. 2000), otros factores como la temperatura también pueden influir en el desarrollo del bacilo que disminuyen su viabilidad en forma parcial e inclusive en su totalidad (Takayama, K. y cols. 1978).

La detección oportuna de la sensibilidad a drogas antituberculosas es de mucha importancia para el esquema de tratamiento eficaz de la tuberculosis. Determinar el correcto perfil de susceptibilidad de MTB ayuda de gran forma a establecer los esquemas de tratamiento, el presente trabajo mostro los efectos del tiempo y temperatura en cultivos de MTB por fuera

del periodo establecido por norma. El envío de las cepas al LRN como ya se mencionó pertenecían al registro de la gestión 2016 teniendo un retraso de 17 días del envío de cultivos después del límite de ejecución del método de las proporciones Canetti-Rist (Canetti, G. Rist, N. Grosset, J. 1963). Los cultivos que son enviados al LRN sufren cambios de temperatura hasta la llegada y procesamiento de las muestras que varían en función a la temperatura ambiente en que se encuentran, incluso estas son sometidas a una incubación constante afectando la funcionalidad de la bacteria, provocando una deshidratación y pérdida del medio de cultivo dejando a la bacteria en un ambiente sin sustrato la cual podría afectar su viabilidad.

Efectos del tiempo y temperatura de exposición en la viabilidad y crecimiento sobre los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*

Para ayudar a la lectura del método de las proporciones era preciso saber sobre el efecto del tiempo y temperatura de exposición sobre la viabilidad y crecimiento de las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* en los medios de cultivos aislados en Bolivia.

Otras investigaciones ya demostraron que *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (cepa ATCC) tiende a disminuir su crecimiento en función del tiempo y temperatura (Takayama, K. et-al. 1978), para poder dilucidar esta problemática era necesarios contar con una colección de cepas para obtener una población representativa de las cepas que circundan en nuestro país.

En las gráficas 1 y 2 se puede observar una disminución progresiva del recuento de colonias lo cual demuestra que existe una alteración en el metabolismo de la bacteria que afecta a su desarrollo, la temperatura afecta sobre todo a la viabilidad de bacterias como *Aeromonas aerogenes*, *Escherichia coli* mostraron una disminución en su viabilidad cerca de la fase logarítmica durante un enfriamiento rápido denominado “choque térmico” de 37° C a 10° C que mueren rápido o gradualmente, en *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra se demostró que después de 7 días de a temperatura ambiente 16 a 20° C pierde de forma gradual su capacidad de desarrollarse, después de un periodo de 32 días y reincubando a 37° C las se ve poco o casi ningún tipo de desarrollo.

La disminución de la viabilidad de los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* a temperatura ambiente de 16 a 20° C sugieren que algún proceso vital para la supervivencia de los bacilos se inhibe. La disminución de la viabilidad se debe a un proceso en la disminución en la síntesis de ácidos micolicos que ocurre con la disminución de la temperatura de 30 a 20° C (Takayama, K. et-al. 1978).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el efecto de la temperatura y tiempo concuerdan con los resultados obtenidos en el estudio que realizo Takayama, K. et-al. 1978, *Mycobacterium tuberculosis* reduce su viabilidad en función al tiempo y temperatura

de exposición, esta reducción podría deberse: 1) los cultivos enviados al LRN no son enviados con refrigerantes por lo que los cultivos son sometidos a variaciones de temperaturas durante el transporte de las muestras, 2) los cultivos no son enviados oportunamente al LRN.

El envejecimiento en procariontas es un deterioro de la función con la edad que se manifiesta como una disminución de la supervivencia y la reproducción. Investigaciones recientes han revelado subpoblaciones de células microbianas que envejecen y mueren rutinariamente, incluso en presencia de abundantes nutrientes (Stephens, C. 2005) pese a que los cultivos se mantuvieron en condiciones adecuadas de incubación de 37° C la disminución del recuento de colonias podrían atribuirse a que algunas rutas metabólicas vitales para las células son afectadas y dejan de funcionar progresivamente ocasionado por un envejecimiento natural provocando muerte e interrupción de funciones.

Durante la recolección de los cultivos se observó una diferencia en cuanto a las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* en cuanto a su consistencia y color, las colonias que presentaban un color amarillo oscuro generalmente procedentes de Santa Cruz (algunas colonias), Potosí, la paz y algunas de Cochabamba tendría a ser colonias más sólidas, y las que presentaban colonias blancas grisáceas colonias blandas, esta características física de las colonias podría influye en cuanto al procedimiento dificultando la homogenización de la suspensión de las colonias, con las colonias solidas fue difícil obtener una suspensión homogénea que se similar al de la escala McFarland, no ocurrió esto con las colonias blancas grisáceas.

Esta diferencia también puede provocar alteraciones en el desarrollo de las colonias (gráfica 1) al no separarse por completo y formar suspensiones homogéneas se arrastra colonias en las diluciones siguientes, lo que causo una concentración mayor a la esperada obteniendo recuento de colonias mayores a lo esperado.

En algunos cultivos se observó un desarrollo similar a biopelículas observados en otro tipo de bacterias que se expresan bajo ciertas condiciones, estas son polímeros extracelulares formados por distintas moléculas como restos de proteínas, ADN, polisacáridos, etc. En los nichos ecológicos bacterianos estos aparecen como respuesta a situación de estrés celular como ser la falta de sustrato, deshidratación, sequedad, exposición a metales pesados y en la parte clínica se pude formar por la exposición a los antibióticos como un mecanismo de defensa. Darzins, E. y Fahr, realizaron una investigación en la cual se demostró en un cultivo de medio líquido sin surfactante, *Mycobacterium tuberculosis* puede formar estructuras en forma de biopelículas organizadas en la interfaz aire-medio (Darzins, E. Fahr, G. 1956).

MTB podría sería capaz de formar este tipo de desarrollo (formación de biopelícula) en medio sólido y semisólido, como también formar un tipo de tolerancia a los medicamentos

antituberculosos para el tratamiento de Tuberculosis, *Mycobacterium smegmatis* puede formar biopelículas en superficies sólidas como superficies de Policloruro de vinilo (PVC) y medios líquidos en la interfase líquido-aire (Recht, J. Kolter, R. 2001), aunque las condiciones para formar biopelículas requieren de varios factores que logren estresar a la bacteria como escases de sustrato, exposición a antibióticos y otros.

En el presente trabajo se observó esta similitud de crecimiento de en forma de biopelícula la cual podría deberse al estrés provocado por el envejecimiento de los cultivos por disminución de nutrientes y pérdida de agua del medio de cultivo, de este modo la formación de biopelícula es un mecanismo de defensa que influye en la susceptibilidad a drogas antituberculosas para el tratamiento de MTB, sin embargo, para determinar si realmente esta capa observada es una biopelícula se debe realizar estudios complementarios que determinen si *Mycobacterium tuberculosis* dentro de su genoma cuenta con estos genes encargados de sintetizar estos polímeros.

Efectos del tiempo y temperatura de exposición en el perfil de susceptibilidad a drogas antituberculosas de *Mycobacterium tuberculosis*

El envejecimiento celular es un proceso que no está esclarecido del todo por lo que sus efectos en la célula microbiana podrían ser múltiples, la temperatura afecta principalmente al crecimiento microbiano provocando una disminución en la cinética de crecimiento, una senescencia en procariotas provoca una alteración en el metabolismo aumentando la probabilidad de muerte bacteriana.

La síntesis de proteínas es un proceso biológico complejo en la que los péptidos que conforman una proteína son enlazados en los ribosomas, varias drogas actúan en esta estructura, la estreptomina es una droga usada para el tratamiento de la tuberculosis que actúa a este nivel, el mecanismo del antibiótico afecta directamente al ARN ribosomal 30S logrando provocar cambios en su conformación induciendo el bloqueo del ARNm, la base genética de la resistencia a la estreptomina se debe principalmente a mutaciones en los genes *rrs* o *rpsL* que producen alteraciones en el sitio de unión a estreptomina (Gillespie, S.H. 2002).

Haciendo una comparación de los perfiles de susceptibilidad de los cultivos con envejecimiento con 90 días en base a su primocultivo con los perfiles control se observó un cambio de sensible a resistente en una de las cepas en el grupo de cultivos con temperatura de exposición de 37° C (gráfica 5) correspondiente a estreptomina. Así mismo los perfiles de susceptibilidad a rifampicina, isoniazida y etambutol no mostraron cambios manteniendo el mismo perfil, esto también ocurrió en los perfiles de susceptibilidad a temperatura ambiente, no mostraron cambios en los 70 y 90 días de envejecimiento después de la fecha de primocultivo.

Se ha demostrado que la resistencia a estreptomina es el resultado de un conjunto limitado de sustituciones de aminoácidos en la proteína ribosómica S12, un análisis en la estructura primaria de la proteína ribosómica S12 (*rpsL*) en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a la estreptomina ha revelado que las mutaciones que involucran un residuo de lisina en el codón 43 u 88, la mutación más frecuente es una transición de A a G en el codón 43 que da como resultado la sustitución de Arg por Lys están asociadas con la resistencia a la estreptomina.

Se identificó un segundo tipo de alteración genética en *Mycobacterium tuberculosis* resistente a estreptomina que tiene un gen *rpsL* de tipo salvaje. En estos aislamientos se observaron con frecuencia mutaciones puntuales en el ARNr 16S (*rrs*). El nivel de resistencia podría correlacionarse con el genotipo de resistencia, ya que las cepas resistentes a estreptomina sin mutación identificable (*rpsL* o *rrs*) mostraron invariablemente un fenotipo resistente de bajo nivel.

Aproximadamente 80% de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a estreptomina es asociado con alteraciones de *rrs* o *rpsL* y en aproximadamente 20% de las cepas resistentes a estreptomina que no presentan mutaciones sugiere que otros mecanismos de resistencia podrían estar involucrados.

Las causas que podrían provocar este cambio podría deberse a mutaciones y/o resistencia bioquímica por parte de la bacteria provocadas por un cambio en la integridad estructural de la bacteria inducidas por una combinación de la temperatura de exposición y el efecto del envejecimiento, las alteraciones en la membrana celular conducen a una disminución de la permeabilidad, una menor absorción de drogas y cambios en las rutas metabólicas, investigaciones en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* muestra un cambio estructural en la membrana bacteriana a nivel de los ácidos grasos cuando esta se expone a temperaturas de 40° C por periodos prolongados, los ácidos grasos hacen una transición en la capa lipídica cuando experimentan deshidratación para minimizar la solidificación de su membrana.

Se ha demostrado que los cambios que ocurren en la síntesis de la membrana celular del genero *Mycobacterium* provocan un fenotipo inusual otorgando resistencia a antibióticos como cloranfenicol, eritromicina y mayor sensibilidad a isoniazida.

Las resistencias a drogas antituberculosas en su mayoría están provocadas por mutaciones en el genoma bacteriano y su resistencia se atribuye generalmente a estas, de otra forma la resistencia bioquímica, alteraciones metabólicas y el stres también juegan un papel importante en la resistencia a antibióticos.

Los procesos de mutación ocurren como consecuencia de errores durante el proceso de replicación del ADN (mutaciones espontáneas). Sin embargo, los datos experimentales más recientes han demostrado que las mutaciones también ocurren en bacterias que se dividen lentamente. Estas mutaciones, denominadas mutaciones adaptadas o adaptativas, que surgen solo en presencia de presión selectiva no letal que las favorece (Taddei, F. Radman, M. Maynard-Smith, J. Toupance, B. 1997), en nuestro caso estas mutaciones adaptativas pudieron haberse provocado por el envejecimiento y mayor tiempo de exposición a 37°C ocasionando que el medio de cultivo pierda humedad. El proceso de mutación adaptativa puede ser una de las principales fuentes de mutantes resistentes a antibióticos en condiciones naturales. (Taddei, F. Radman, M. Maynard-Smith, J. Toupance, B. 1997).

Los principales factores en este proceso son la respuesta al estrés (como parte de la respuesta SOS finamente regulada), las polimerasas de ADN V (*umuCD*) propensas a error y IV (*dinB*), que aumentan transitoriamente la tasa de mutación (Piddock, L.J. Wise, R. 1987). Se ha demostrado que algunos antibióticos (quinolonas, por ejemplo) pueden inducir la respuesta mutagénica SOS y aumentar la tasa de aparición de resistencia en *Escherichia coli* y se vio que puede expresar un fenotipo hipermutable frente a estreptomycin (Ren, L. Rahman, M.S. Humayun, M.Z. 1999).

Rifampicina es una droga antituberculosa que actúa a nivel del ARN-polimerasa inhibiendo su actividad y su resistencia se debe a cambios estructurales en esta enzima debido a mutaciones (Campbell, E.A. Korzheva, N. Mustaev, A. et al. 2001), isonizida presenta una resistencia compleja que se atribuye a mutaciones en varios genes que incluyen *katG*, *ahpC*, *inhA*, *kasA* y *ndh* (Shoeb, H.A Bowman, B.U. Jr Ottolenghi, A.C. Merola, A.J. 1985) etambutol y estreptomycin también adquiere resistencia mediante mutaciones.

El método de las proporciones Canetti-Rist compara el crecimiento de colonias de *Mycobacterium tuberculosis* del cultivo control (medio de cultivo sin drogas incluidas) con el crecimiento en los cultivos con drogas incluidas determinando la proporción de mutantes, la viabilidad es fundamental para que el método de las proporciones tenga validez por lo que al no encontrar cambio en el perfil de susceptibilidad en los cultivos que envejecieron a temperatura ambiente de sensible a resistente puede ser debido a 1) la viabilidad de las bacterias se ve afectado por lo que su desarrollo disminuye evitando realizar una lectura correcta; 2) el envejecimiento llega a tal punto que las bacterias mutantes también mueren conforme pasa el tiempo, lo que provocaría posibles perfiles falsos sensibles.

Del mismo modo el envejecimiento a temperatura de 37° C causaría estos dos efectos y a su vez provocaría un estrés por la pérdida de humedad del medio lo que posiblemente ocasionaría un tercer efecto 3) de acuerdo a la tasa de mutación a cada droga esta se ve obligada a crear una resistencia adaptativa sobre todo en estreptomycin.

En nuestra investigación se verifico que el perfil de susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* si varia en relación a la antigüedad del aislamiento primario y a una exposición de temperatura dada siendo diferentes a medida que el tiempo avanza, el tiempo en relación tienen un efecto importante no solo en la viabilidad si no así mismo en los perfiles de susceptibilidad.

8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo al realizar un análisis sobre los resultados podemos determinar que el perfil de susceptibilidad varía en función a tiempo y temperatura lo que hace que el método de las proporciones Canetti-Rist tenga un tiempo limita de ejecución y confiabilidad.

Mediante el recuento de colonias se pudo determinar la viabilidad de los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* en periodos de tiempo entre 30-60 días y a los 70 y 90 días de envejecimiento del primocultivo en diferentes temperaturas y como este influye en su desarrollo, concluyendo en la diferencia que existe entre estas variables que existe una diferencia estadísticamente significativa conforme el tiempo avanza.

Se determinó que la influencia de la temperatura afecta a los perfiles de susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* que se ejecuta por el método de las proporciones Canetti-Rist a drogas antituberculosas de primera línea en el periodo de 90 días de envejecimiento del primocultivo.

Mediante el análisis de los resultados se verifico que el método de las proporciones Canetti-Rist tienen un límite de tiempo para su ejecución despejando dudas de los resultados con un tiempo de incubación de los primocultivos mayor a 60 días concluyendo que el método debe ser aplicado en primocultivos que no excedan los 70 días debido al cambio del perfil de resistencia a los 90 días.

BIBLIOGRAFIA

Arias, F., Bonilla, C., (2016). Informe de visita de evaluación y asistencia técnica del componente de manejo clínico programático de la drogorresistencia. *Organización mundial de la salud*.

Almeida, P. Palomino, J. (2011). Molecular basis mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *J Antimicrob Chemother*, 66, 1417–1430

Aminov, R.I. Mackie, R.I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 27, 147–161.

Ainsa, J.A. et al. (1997). Aminoglycoside 2=*N*-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterisation of the aac (2=)-*Ic* gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the aac (2=)-*Id* gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol*, 24,431– 441.

Ackermann, M. C, Stephen. Jenal. U. (2003). Senescence in a Bacterium with Asymmetric Division. *SCIENCE* 300.

Borukhov, S. Nudler, E. (2008). RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Trends Microbiol*; 16: 126–134.

Brennan, P.J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*: Department of Microbiology, Microbiology Building, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523, USA 83, 91–97

Bush, K. Jacoby, G. Medeiros, A. (1995). A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1211–1233.

Canetti, G. Fox, W. Khomenko, A. Mahler, H. T. et al. (1969). Advances in Techniques of Testing Mycobacterial Drug Sensitivity, and the Use of Sensitivity Tests in Tuberculosis Control Programmes. *Bull. Wld Hlth Org*, 41, 21-43.

Crofton, J. Mitchison, D.A. (1948). Streptomycin resistance in pulmonary tuberculosis. *Br Med J*, 2, 1009–15.

Campbell, E.A. Korzheva, N. Mustaev, A. et al. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104, 901–912.

Centro Para el Control y Prevención de Enfermedades, TUBERCULOSIS
www.cdc.gov/tb/esp/

Canetti, G. Rist, N. Grosset, J. (1963). Mesure de la sensibilité du bacile tuberculeux aux drogues antibacilares pour la methode des proportions. *Rev. Tuberc.*

Dover, L. Alderwick, L. Brown, A. Futterer, K. Besra, G. (2007). Regulation of cell wall synthesis and growth. *Curr Mol Med*, 7, 247–76.

Danilchanka, O. Mailaender, C. Niederweis, M. (2008). Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2503–2511.

De Rossi E, Ainsa, J.A. Riccardi, G. (2006). Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol*, 30, 36–52.

Darzens, E. Fahr, G. (1956). Cord-forming property, lethality and pathogenicity of *Mycobacteria*. *Dis Chest*, 30, 642–648.

Floyd, J.L. Smith, K.P. Kumar, S.H. Floyd, J.T. & Varela, M.F. (2010). LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5406–5412.

Gaughran, R. (1947). The saturation of bacterial lipids as a function of temperature, *J Bacterid*, 55, 506.

Gillespie, S.H. (2007). Tuberculosis: evolution in millennia and minutes. *Biochem Soc Trans*, 35, 1317–20.

Gorrill, R.H. McNeil, E.M. (1960). The effect of cold diluent on the viable count of *Pseudomonas pyocyanea*. *J Gen Microbiol*, 22, 437.

Garcia, R.S. Martin, C. Thompson, C.J. Ainsa, J.A. (2009). Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth. *Antimicrob. Agents Chemother*, 53, 3675–3682.

Gillespie, S.H. (2007). Tuberculosis: evolution in millennia and minutes. *Biochem Soc Trans*; 35: 1317–20.

Jazwinski, S. (1990). An experimental system for the molecular analysis of the aging process: The budding yeast *Sacharomyces cerevisiae*. *J Gerontol*, 45, 68-74.

Jarlier, V. Nikaido, H. (1994). Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*, 123, 11–8.

Kochi, A. Vareldzis, B. Styblo, K. (1993). Multidrug-resistant tuberculosis and its control. *Res Microbiol*, 144, 104–10.

Krasovec, R. Jerman, I. (2003). Bacterial multicellularity as a possible source of antibiotic resistance. *Med. Hypotheses*, 60, 484–488.

Khodursky, A.B. Zechiedrich, E.L. Cozzarelli, N.R. (1995) Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 11 801–11805.

Kim, Y. Cha, C.J. Cerniglia, C.E. (2002). Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 239–244.

Leski, T.A. Tomasz, A. (2005). Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: Evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A, *J. Bacteriol.* 187, 1815–1824.

Lisitsyn, N. A. Sverdlov, E. D. Moiseyeva, E. P. Danilevskaya, O. N. Nikiforov, V. G. (1984). Mutation to rifampin resistance at the beginning of the RNA polymerase b subunit gene in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*; 196: 173–174.

Lederer, E. Adam, A. Ciorbaru, R. Petit, J.F. Wietzerbin-Falszpan, J. (1975). Cell-walls of mycobacteria and related organisms: chemistry and immunostimulant properties. *Mol Cell Biochem*, 7, 87–104.

Vasquez, A. Camacho, M. Molina, J. (2011) Validación y genotipificación como prueba para el diagnóstico de resistencia a rifampicina e isoniazida en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* circulantes en Bolivia.

Miller, L.P. Crawford, J.T. Shinnick, T.M. (1994). The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 38, 805–811.

Musser, J.M. (1995). Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev*, 8, 496–14.

Middlebrook, G. (1954). Isoniazid resistance and catalase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc*, 69, 471–472.

Mikusova, K. Mikus, M. Besra, G.S. Hancock, I. Brennan, P. J. (1996). Biosynthesis of the linkage region of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem*, 271, 7820–8.

Middlebrook, G. Cohn, ML. (1953). Some observations on the pathogenicity of isoniazid-resistant variants of tubercle bacilli. *Science*, 118, 297–9.

Maravic. G, Vlahoviek, S. Cubrilo, K.L. Tkaczuk, J.M. Bujnicki, Modeling and experimental analyses reveal a two-domain structure and amino acids important for the activity of aminoglycoside resistance methyltransferase Sgm, *Biochim. Biophys. Acta* (in press).

Murray, P. Rosenthal, K. Pfäuer, M. (2007). *Microbiología médica*. Elsevier, 5, 297.

Martinez, L. (2008). Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos. *EnfInfecc Microbiol Clin*, 26, 481–4.

Nakamura, S. Nakamura, M. Kojima, T. Yoshida, H. (1989). *gyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother*, 33, 254–255.

Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux, *Science*, 264, 382–388.

Ochsner, U. Sun, X. Jarvis, T. Critchley, I. Janjic, N. (2007). Aminoacyl-tRNA synthetases: essential and still promising targets for new anti-infective agents. *Expert Opin Investig Drugs*, 16, 573–93.

Okusu, H. Ma, D. Nikaido, H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants, *J. Bacteriol*, 178, 306–308.

Organización mundial de la salud TUBERCULOSIS MUNDIAL
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/

Patrick, J. Brennan and Dean, C. Crick (2007). The Cell-Wall Core of *Mycobacterium tuberculosis* in the Context of Drug Discovery. *Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523 USA* 7, 475-488.

- Parsons, L.M. Driscoll, J.R. Taber, H.W. Salfinger, M. (1997). Drug resistance in tuberculosis. *Infect Dis Clin North Am*, 11, 905–928.
- Piddock, L.J. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol*, 19, 384–402.
- Piddock, L.J. Wise, R. (1987). Induction of the SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinolone antimicrobial agents, *FEMS Microbiol. Lett*, 41, 289–294.
- Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *P. aeruginosa* and related organisms, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*, 3, 225–264.
- Ratledge, C. Stanford, J. (1982). The Biology of Mycobacteria. *Academic press London vol 1*.
- Ramaswamy, S. Musser, J.M. (1998). Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update, *Tuber. Lung Dis*, 79, 3–29.
- Ren, L. Rahman, M.S. Humayun, M.Z. (1999). *Escherichia coli* cells exposed to streptomycin display a mutator phenotype, *J. Bacteriol*, 181, 1043–1044.
- Recht, J. Kolter, R. (2001). Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 183, 5718–5724.
- Stephens, C. (2005). Senescence: Even Bacteria Get Old. *CellPress* 15, R308-R310.
- Senka, D. Jagoda, S. Blazenska, K. (2008). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol. Biotechnol*. 46, 1, 11–21.
- Strehler, B. (1982). Concepts and theories. *Lectures on gerontology*. 1-7.
- Sheldrake, A. (1974). The ageing, growth, and death of cells. *Nature*, 250, 381-5.
- Sutcliffe, J. Muller, J. Utt, E. (1999). Antibiotic resistance mechanisms of bacterial pathogens. *Manual of industrial microbiology and biotechnology. USA*. 759- 775.
- Strohl, W. (1997). Biotechnology of antibiotics, Marcel Dekker Inc. Nueva York, USA.
- Safi, H. Sayers, B. Hazbon, M.H. et al. (2008). Transfer of embB codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2027–34.

Spratt, B.G. (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations, *Science*, 264, 388–393.

Shoeb, H.A. Bowman, B.U. Jr, Ottolenghi, A.C. Merola, A.J. (1985). Peroxidase-mediated oxidation of isoniazid. *Antimicrob Agents Chemother*, 27, 399-403.

Sherman, D.R. Sabo, P.J. Hickey, M.J. Arain, T.M. Mahairas, G.G. Yuan, Y. et al. (1995). Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6625-9.

Sherman, D.R. Mdluli, K. Hickey, M.J. Arain, T.M. Morris, S.L. Barry, C.E. III, Stover, CK. (1996). Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 272, 1641-3.

Silva, M.S. Senna, S.G. Ribeiro, M.O. et al. (2003) Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 41, 4471–4.

Silva, P.E. Bigi, F. Santangelo, M.P. et al. (2001). Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 800–4.

Schleifer, K.H. Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev*, 1972, 36:407–77.

Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *Am. J. Med*, 119, 3–10.

Taddei, F. Radman, M. Maynard-Smith, J. Toupance, B. Gouyon, P.H. Godelle, B. (1997). Role of mutator alleles in adaptive evolution, *Nature*, 387, 700–702.

The World Health Organization (1997). Report on the Tuberculosis Epidemic. Geneva, Switzerland. World Health Organization Global TB Programme.

Takayama, K. Armstrong, E.L. Kunugi, K.A. et al. (1979). Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 16, 240–2.

Telenti, A. Philipp, W.J. Sreevatsan, S. et al. (1997). The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med*, 3, 567–70.

Takayama, K. Armstrong, E. L. Davidson L. A. Kunugi, K. A. Kilburn J. O. (1978). Effect of Low Temperature on Growth, Viability, and Synthesis of Mycotic Acids of *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Ra, *American review of respiratory disease*, 118.

Vetting, M.W. Magnet, S. Nieves, E. Roderick, S. Blanchard, J. Blanchard, (2004). A bacterial acetyltransferase capable of regioselective *N*-acetylation of antibiotics and histones, *Chem. Biol*, 11, 565–573.

Van Veen, H.W. Konings, W.N. (1997). Drug efflux proteins in multidrug resistant bacteria, *Biol. Chem.* 378, 769–777.

Wolinsky, E. Reginster, A. Steenken, W. Jr. (1948). Drug-resistant tubercle bacilli in patients under treatment with streptomycin. *Am Rev Tuberc*, 58, 335–43.

Webb, E.C. (1984). Enzyme nomenclature. Academic Press Inc, 1, 366-374.

Wright, G.D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification, *Adv. Drug Deliv. Rev*, 57, 1451–1470.

Willmott, C.J. Maxwell, A. (1993). A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase–DNA complex, *Antimicrob. Agents Chemother*, 37, 126–127.

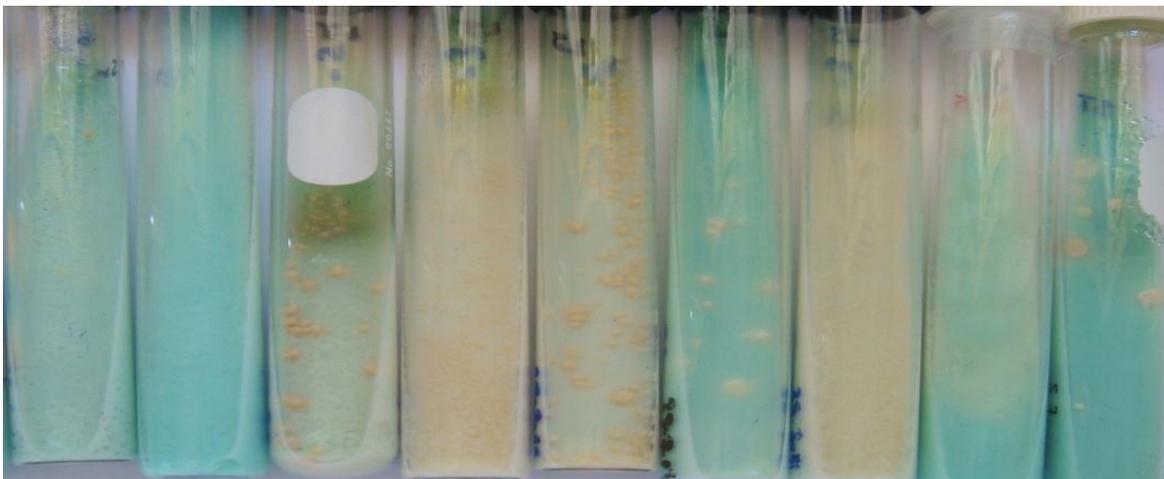
Woodford, N. Ellington, M.J. (2007). The emergence of antibiotic resistance by mutation, *Clin. Microbiol. Infect*, 13, 5–18.

Zhang, Y. Heym, B. Allen, B. Young, D. Cole, S. (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, 358, 591–593.

Zhang, Y. Telenti, A. (2000). Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* In: Hatfull GF, Jacobs WR, eds. *Molecular Genetics Mycobacteria*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 235–56.

ANEXOS

Fotografía 1. Cultivos provenientes de los diferentes laboratorios regionales de RNLT



De izquierda a derecha se muestra el desarrollo de colonias y características del medio de cultivo, cultivos disgonicos, eugonicos y medios de cultivo secos. (INLASA 2016).

Fotografía 2. Batería de medios de cultivo de Lowenstein-Jensen



Medios de cultivo con y sin drogas incluida para la ejecución del método de las proporciones Canetti-rist.