

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA



TESIS DE GRADO

VALIDACION DE LA GENOTIPIFICACIÓN COMO PRUEBA PARA EL
DIAGNÓSTICO Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA E
ISONIACIDA EN CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* CIRCULANTES
EN BOLIVIA.

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO
DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

ASESORA: MSc. Aneth María Vásquez Michel
CO-ASESORA: Dra. Mirtha Camacho
POSTULANTE: Julia Isabel Molina Orihuela

La Paz – Bolivia

2011

Dedicado a

La ley de Jehová es perfecta, hace volver el alma.
El recordatorio de Jehová es fidedigno, hace sabio al inexperto.

Salmo 19:7

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero a Dios, debido a que, Él siguió dándome fuerzas para seguir cada día y poder concluir el presente trabajo con éxito.

A mi familia, que me apoyó todo este tiempo.

A mi asesora de Tesis McS. Aneth María Vásquez Michel, porque, no solo me proporcionó guía y los medios para realizar esta tesis, sino también me manifestó su amistad, además de, paciencia.

A mis compañeras de laboratorio que con su chispa de alegría hacían que cada día de trabajo en el laboratorio sea un día agradable.

VALIDACION DE LA GENOTIPIFICACIÓN COMO PRUEBA PARA EL DIAGNÓSTICO Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONIACIDA EN CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* CIRCULANTES EN BOLIVIA.

RESUMEN

El resurgimiento de la tuberculosis con características epidemiológicas y la aparición de cepas multidrogo-resistentes, hace imperativo el diseño de estrategias de diagnóstico y estudios de susceptibilidad a drogas que permita obtener resultados inmediatos. Sin duda, el conocimiento de las bases moleculares de los mecanismos de resistencia a antibióticos provee información de gran valor para el manejo del paciente. El análisis genético de los microorganismos podría acortar el periodo de reporte de la resistencia a drogas, particularmente a drogas de primera línea, con la finalidad de adoptar un esquema terapéutico acertado, oportuno y así, lograr la cura del paciente, lo que se traduce en una disminución en la transmisión del patógeno y de la propagación de cepas multidrogo-resistentes. Adicionalmente la caracterización molecular del mecanismo de resistencia brinda información sobre el potencial de virulencia de una cepa particular.

En este estudio se procedió a extraer el material genético a partir de colonias resuspendidas en agua, mediante ebullición y por combinación de métodos físicos y químicos, con posterior visualización del mismo mediante electroforesis, luego, se amplificaron genes específicos del ADN extraído mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) multiplex, de igual manera los amplicones se visualizaron por electroforesis, para su posterior hibridación y análisis de los resultados obtenidos.

Se tipificaron, 138 cepas de *M. tuberculosis*, los resultados se compararon, con los perfiles de susceptibilidad obtenidos por el método de las proporciones (canetti Rist) obtenidos en INLASA. La concordancia fue: fenotipo MDR 52/genotipo MDR 36 (71%); Monoresistentes a Rifampicina fenotipo 14/genotipo 10 (71%), monoresistentes a Isoniacida fenotipo 31/genotipo 19 (61%), y cepas sensibles fenotipo 40/genotipo 38 (95%).

La sensibilidad del método para detectar cepas MDR es de 72% especificidad de 94% y valores predictivos positivo y negativo de 88 y 79% respectivamente. Para cepas resistentes a Rifampicina la sensibilidad es de 80% especificidad de 94% y valores predictivos positivo y negativo de 93 y 84% respectivamente. Para cepas resistentes a Isoniacida la sensibilidad es de 69% especificidad de 89% y valores predictivos positivo y negativo de 91 y 67% respectivamente.

La genotipificación permite analizar de forma específica las mutaciones que con mayor frecuencia desencadenan en resistencia a Isoniacida y Rifampicina, el cual comparado con el método convencional fenotípico (DST), presenta una sensibilidad y especificidad elevada para la detección del complejo *M. tuberculosis* y los genes que confieren resistencia a Isoniacida y Rifampicina.

Se demostró, que este método es suficientemente sensible y específico, así mismo los valores predictivos muestran datos que nos prueban que el método es válido, confiable y aplicable para ser incorporado como prueba de rutina en apoyo al diagnóstico y determinación de susceptibilidad a antituberculosos emitido por el Laboratorio de Referencia Nacional de Tuberculosis (INLASA).

Palabras Clave: Rifampicina, genotipo, fenotipo, mutación, susceptibilidad, hibridación, resistencia, sensibilidad, especificidad.

VALIDACION DE LA GENOTIPIFICACIÓN COMO PRUEBA PARA EL DIAGNÓSTICO Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONIACIDA EN CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* CIRCULANTES EN BOLIVIA.

SUMMARY

The resurgence of tuberculosis with epidemiological characteristics and the multidrug-resistant strains emergence make imperative designing strategies for diagnosis and drug susceptibility studies to obtain immediate results. Undoubtedly, knowledge of the molecular mechanisms of antibiotic resistance provides valuable information for patient management. Genetic analysis of microorganisms could shorten the reporting period of drug resistance, particularly to first-line drugs, in order to adopt a therapeutic accurate, timely, and thus achieve a patient cure, resulting in a decrease in pathogen transmission and spread of multidrug-resistant strains. Further molecular characterization of the resistance mechanism provides information on the potential virulence of a particular strain.

In this study we proceeded to extract genetic material from colonies resuspended in water by boiling and combination of physical and chemical methods, with subsequent visualization of the electrophoresis, then specific genes were amplified by Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) of DNA extracted, likewise the amplicons were visualized by electrophoresis for subsequent hybridization and analysis of results.

Were typed, 138 isolates of *M. tuberculosis*, the results were compared with susceptibility profiles obtained with the proportion method (Canetti Rist) obtained by INLASA. The agreement was: MDR phenotype 52/genotype 36 (71%); rifampicin-mono-resistant phenotype 14/genotype 10 (71%); to isoniazid-mono-resistant phenotype 31/genotype 19 (61%), and susceptible strains phenotype 40/genotype 38 (95 %).

The sensitivity to detect MDR strains was 72%, specificity 94%, negative and positive predictive values of 88% and 79% respectively. Sensitivity for Rifampicin-resistant strains was 80%, specificity 94%, negative and positive predictive values of 93% and 84% respectively. For isoniazid resistant strains, the sensitivity was 69%, specificity 89%, negative and positive predictive values of 91 and 67% respectively.

Genotyping led us specifically to analyze mutations that most often trigger in resistance to isoniazid and rifampin, which compared with the conventional phenotypic testing (DST), has a high sensitivity and specificity for detection of the *M. tuberculosis*, and genes that confer resistance to isoniazid and rifampicin, showing that this method is sufficiently sensitive and specific, and predictive values show the same data

We demonstrated that, the method is valid, reliable and applicable to be incorporated as a routine method to support the diagnostic and determination of susceptibility to antituberculosis drugs applied by the National Reference Tuberculosis Laboratory (INLASA).

Keywords: Rifampicin, genotype, phenotype, mutation, susceptibility, hybridization, resistance, sensitivity, specificity.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	1
3	OBJETIVOS	2
3.1	Objetivos generales	2
3.2	Objetivos específicos	2
4	DISEÑO TEORICO	2
4.1	Generalidades	2
4.2	Antecedentes	3
4.2.1	Reseña Histórica	3
4.2.1.1	Historia de la Tuberculosis en Bolivia	5
4.3	Situación Epidemiológica	6
4.4	EVOLUCIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO <i>Micobacterium tuberculosis</i>	7
4.4.1	Esquema básico de la evolución de las Micobacterias	7
4.4.2	Genética Molecular del Complejo <i>Micobacterium tuberculosis</i>	9
4.4.2.1	Co-evolución de <i>M. tuberculosis</i> con sus hospederos	10
4.4.3	<i>Micobacterium tuberculosis</i> a través del tiempo y del espacio	10
4.5	Aspectos Fenotipicos	11
4.5.1	Bacilo tuberculoso	11
4.5.2	Morfología microscópica	13
4.5.3	Estructura de la pared celular	14
4.5.4	Requerimientos nutricionales y ambientales para su crecimiento	15
4.5.4.1	Tiempo de generación	16
4.5.5	Marcadores metabólicos y bioquímicos	17
4.5.6	Resistencia física y química	18
4.6	GENOMA DE <i>Micobacterium tuberculosis</i>	18
4.6.1	Organización genómica	18
4.6.2	Genoma funcional	20
4.6.3	Expresión de los genes en <i>M. tuberculosis</i>	20
4.6.4	Proteómica de <i>M. tuberculosis</i>	21
4.7	Drogas Antituberculosas e interacción	22
4.7.1	Resumen e historia del esquema de tratamiento	22
4.7.2	Estructura, Mecanismos de acción, de los principales antituberculosos	22
4.7.2.1	Isoniacida (INH)	23
4.7.2.2	Rifampicina (RIF)	26
4.7.2.3	Pirazinamida (PZA)	27
4.7.2.4	Etambutol (EMB)	29
4.7.2.5	Estreptomina (SM)	30
4.8	Tuberculosis Drogo-Resistente	32

VALIDACIÓN DE LA GENOTIPIFICACIÓN COMO PRUEBA PARA EL DIAGNÓSTICO Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONIACIDA EN CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* CIRCULANTES EN BOLIVIA

4.9	Métodos de Detección de resistencia a los antituberculosos	33
4.9.1	Métodos fenotípicos convencionales	33
4.9.2	Métodos genotípicos	34
4.10	Método de genotipificación basado en sondas de hibridación	34
5	HIPÓTESIS	36
6	DISEÑO METODOLÓGICO	36
6.1	Fundamento del diseño	36
6.2	Población y muestra para el estudio	37
6.3	Tamaño muestral	37
6.4	Definición de cepas	37
6.5	Definición de controles	37
6.6	Toma de datos	37
6.7	Procesamiento de las muestras	38
6.7.1	Genotipificación mediante el kit GenoType MTBDR _{plus} hain lifescience	38
6.7.2	Aislamiento de ADN proveniente de bacterias en cultivo	38
6.7.3	Amplificación de ADN por PCR múltiplex	39
6.7.4	Análisis de Resultados	40
7	RESULTADOS	41
8	DISCUSIÓN	50
9	CONCLUSIÓN	60
10	BIBLIOGRAFÍA	61

1 INTRODUCCIÓN

La tuberculosis ha reemergido como un problema de salud pública de gran magnitud, debido al surgimiento de lo que ha sido denominado por algunos autores “la nueva tuberculosis”, alertando la emergencia y propagación de cepas de Micobacterias resistentes a múltiples antibióticos, particularmente a drogas antituberculosas de primera línea⁽¹¹⁾.

Las cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a Isoniacida y Rifampicina, con o sin resistencia a otras drogas, han sido denominadas cepas multidrogo-resistentes o MDR-TB. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 50 millones de personas a nivel mundial podrían estar afectadas con MDR-TB y que aproximadamente el 3.1% de los 8.8 millones de nuevos casos en el 2002 fueron causados por MDR-TB. Los regímenes terapéuticos de pacientes infectados con cepas MDR-TB son menos efectivos, más prolongados, de difícil cumplimiento y más costosos⁽²¹⁾.

El resurgimiento de la tuberculosis con características epidemiológicas y la aparición de cepas multi-resistentes, hace imperativo el diseño de estrategias de diagnóstico y estudios de susceptibilidad a drogas que permitan obtener resultados inmediatos. Sin duda, el conocimiento de bases moleculares de los mecanismos de resistencia a antibióticos provee información de gran valor para el manejo del paciente en varios aspectos. El análisis genético de los microorganismos podría acortar el periodo de reporte de la resistencia a drogas, particularmente a drogas de primera línea, con la finalidad de adoptar un esquema terapéutico acertado y oportuno logrando la cura del paciente, lo que se traduce en una disminución en la transmisión del patógeno y de la propagación de cepas multidrogo-resistentes. Adicionalmente la caracterización molecular del mecanismo de resistencia puede brindar información sobre el potencial de virulencia de una cepa particular y por último este tipo de análisis representa la base para el diseño de nuevas drogas y vacunas.

Actualmente se encuentran disponibles ensayos de genotipificación, los cuales combinan la detección del complejo MTB con el pronóstico de la resistencia a Rifampicina e Isoniacida y desde que el ensayo fue introducido en varios países como prueba rutinaria la OMS recomienda que antes de ser usado como ensayo rutinario para el tratamiento y control de la TB, debería ser validado el rendimiento del ensayo en relación a la localización y circulación de la bacteria⁽¹⁰⁾.

La presente tesis, es el resultado de la validación de la genotipificación, debido a que el Programa Nacional de Tuberculosis (PNT) tiene la intención de incorporar esta prueba como apoyo al diagnóstico emitido por la Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis.

Por lo tanto este estudio propone la siguiente pregunta de investigación.

2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la Genotipificación como prueba para el diagnóstico y determinación de resistencia a Rifampicina e Isoniacida en cepas de *Micobacterium tuberculosis* circulantes en Bolivia?

3 OBJETIVOS

3.1 **Objetivos generales**

Validar la Genotipificación como prueba para el diagnóstico y determinación de resistencia a Rifampicina e Isoniacida en cepas de *Micobacterium tuberculosis* circulantes en Bolivia.

3.2 **Objetivos específicos**

- Optimizar la extracción de material genético de las cepas admitidas, mediante métodos físicos, químicos y combinados.
- Determinar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para la detección y confirmación del complejo *Micobacterium tuberculosis*.
- Determinar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para la detección de resistencia a Rifampicina.
- Determinar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para la detección de resistencia a Isoniacida.
- Determinar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para la detección de Multidrogo-resistencia.
- Conocer a través de estadística descriptiva, el comportamiento de otras variables en estudio.

4 DISEÑO TEÓRICO

4.1 **Generalidades**

La tuberculosis es una enfermedad importante en los países en desarrollo ⁽¹⁾. La mayor preocupación es la aparición de cepas multidrogo-resistentes (MDR-TB)⁽²⁾ la cual se caracteriza por la resistencia a Rifampicina e Isoniacida. La MDR-TB dificulta el tratamiento y está asociada con el aumento de fracaso terapéutico y recaídas.

En pacientes sin antecedentes de tratamiento por TB pulmonar, o tratados inapropiadamente, se produce la drogo resistencia asociada a mutaciones por parte de las bacterias. Las mutaciones localizadas en la región hotspot en la posición 81 del gen *rpoB* son en su mayoría causa de resistencia a Rifampicina⁽³⁾, mientras que la resistencia a Isoniacida esta conferida por mutaciones localizadas en varios loci del genoma (*katG*, *inhA* y *kasA*)^(4, 5).

Variando según la zona geográfica, 50-100% de las cepas resistentes a Isoniacida tienen mutaciones en el codón 315 del gen *katG* o en la región promotora del gen *inhA*^(5, 6), en cuanto al gen *KasA* no se han reportado mutaciones frecuentes.

El proceso del test de sensibilidad a las drogas (DTS) para obtener el fenotipo consume mucho tiempo ya que se requiere cultivar a la bacteria, dicho cultivo demora más de dos meses, y a pesar de no tener los resultados del DTS, el paciente es tratado con las drogas anti-TB

estándar de primera línea, debido a ello y para el control de la drogo-resistencia el modelo MDR-TB debería estar disponible como guía terapéutica de los pacientes. El diagnóstico rápido de MDR-TB permitirá el comienzo temprano del tratamiento con fármacos de segunda línea para los pacientes con cepas MDR-TB y así disminuir el riesgo de fracaso terapéutico, recaída, proliferación de la drogo resistencia(DR), diseminación de las cepas MDR-TB y el incremento de la tasa de mortalidad⁽¹¹⁾.

Actualmente se encuentra disponible el ensayo GenoType MTBDR_{plus} (Hain Lifescience, Nehren, Germany) el cual combina la detección del complejo MTB con el pronóstico de la resistencia a Rifampicina e Isoniacida. En la prueba se realiza un PCR multiplex seguido por hibridación de los amplicones obtenidos a una membrana. El ensayo combina la detección del complejo de MTB con la detección de mutaciones en la región hotspot en el par 81 del gen *rpoβ*, codón 315 del gen *katG* y en la región promotora del gen *inhA*. Se ha encontrado alta sensibilidad y especificidad para cepas resistentes a Rifampicina e Isoniacida y cuando se aplica directamente en muestras de esputo con baciloscopia positiva ⁽⁶⁻⁸⁾. Recientemente se analizaron todos los datos de los estudios realizados con este ensayo y la cifra de sensibilidad y especificidad dio 99% (con un intervalo de confianza de 95%, 96%-100%) y 99% (95% de intervalo de confianza, 98-100%) respectivamente para Rifampicina resistente y de 96% (93-98%) y 100% (99-100%), respectivamente para Isoniacida resistente ⁽⁹⁾.

En junio del 2008 la organización mundial de la salud (OMS) aprobó el uso de ensayo de molecular con sondas en línea para la detección de MDR-TB ⁽¹⁰⁾, y desde que el ensayo fue introducido en varios países como prueba rutinaria ⁽⁶⁻⁸⁾ la OMS recomienda que antes de ser usado como ensayo rutinario para el tratamiento y control de la TB, el rendimiento del ensayo debería ser validada en relación a la localización y circulación de la bacteria *M. tuberculosis* ⁽¹⁰⁾. Debido a que el Programa Nacional de tuberculosis (PNT) de Bolivia tiene la intención de incorporar esta prueba en apoyo del programa de manejo de DR-TB (PMDT), evaluamos la sensibilidad y especificidad del test usando cepas de *M. tuberculosis* geográficamente representativas con perfil de resistencia fenotípico conocido.

4.2 Antecedentes

La tuberculosis en la actualidad continua siendo una patología de alta incidencia en nuestro país, ocupa actualmente el segundo lugar de incidencia notificada de tuberculosis en América Latina después de Haití, razón por la que Bolivia es uno de los países priorizados por la Organización Panamericana de la Salud⁽²¹⁾.

La meta definida por la Organización Mundial de la salud en base a indicadores del milenio determina la detección del 75 % y curación del 80 % para lograr eficiencia en el control de esta patología mediante la estrategia DOTS, se involucra a los componentes clínico, de enfermería, laboratorio y estadística, además de otros que contribuyen a fortalecer las acciones de control⁽¹⁰⁾.

4.2.1 Reseña Histórica

La tuberculosis es una infección bacteriana crónica causada por *Micobacterium tuberculosis* que histológicamente se caracteriza por la formación de granulomas. Habitualmente, la enfermedad se localiza en los pulmones, pero puede afectar prácticamente a cualquier órgano del cuerpo humano ⁽¹²⁾.

Se presume que la historia de la tuberculosis comenzó hace más de 150 millones de años ⁽¹³⁾. En pocas enfermedades es posible documentar su estrecha relación con la Historia de la propia humanidad como en la que nos ocupa. Existen evidencias paleológicas de tuberculosis vertebral en restos neolíticos precolombinos, así como en momias egipcias que datan aproximadamente del año 2400 a.E.C. (Figura 1)

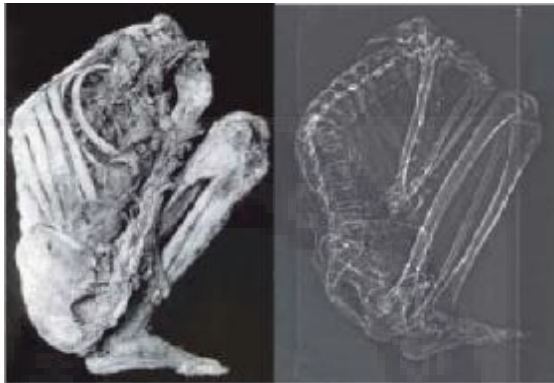


Figura 1: izquierda: momia 003, Museo arqueológico de la Casa del Marqués de San Jorge, Bogotá, Colombia. Derecha: tomografía computarizada mostrando lesiones en las vértebras 10 y 11 del cuerpo(reproducido con permiso de Sotomayor 2004).

Quizá la primera "cita bibliográfica" que podemos hallar en relación a ella se encuentra documentada en Egipto, India, y China hace como 5000, 3300, y 2300 años atrás, respectivamente ⁽¹³⁾. En Europa se convirtió en un problema grave en el momento en que el hacinamiento en los medios urbanos asociado con la Revolución Industrial generó circunstancias epidemiológicas que favorecieron su propagación. En los siglos XVII y XVIII la TB fue responsable de una cuarta parte de todas las muertes en adultos que se produjeron en el continente europeo (la palabra tuberculosis ha sido uno de los grandes "tabúes" en la historia de la cultura occidental).

El médico inglés Benjamín Martenl, en su obra *A New Theory of The Consumption* fue el primero en averiguar que la causa de la tuberculosis podría ser una "diminuta criatura viviente", que, una vez en el organismo, podría generar los signos y síntomas de la enfermedad. Fue Robert Koch, en 1882, al utilizar una nueva técnica de tinción, el primero que por fin pudo ver al "enemigo oculto". En el año 1895 Wilhelm Konrad von Rontgen descubre la radiación que lleva su nombre, con lo que la evolución de la enfermedad podía ser observada. Con el conocimiento del agente causante y el mecanismo de transmisión proliferó la aparición de los famosos sanatorios, (Figura 2) con los que se buscaba, por un lado, aislar a los enfermos de la población general interrumpiendo la cadena de transmisión de la enfermedad, y por otro, ayudar al proceso de curación con la buena alimentación y el reposo ⁽¹⁴⁾.



Figura 2: Sanatorio Pineta del Carso, Trieste, Italia.

Pero no fue hasta 1944, en plena II Guerra Mundial, con la demostración de la eficacia de la estreptomomicina, cuando comienza la era moderna de la tuberculosis, en la que el curso de la enfermedad podía ser cambiado. En el año 1952 tiene lugar el desarrollo de un agente mucho más eficaz: la Isoniacida. Ello hace que la tuberculosis se convierta en una enfermedad curable en la mayoría de los casos. La Rifampicina, en la década de los 60, hizo que los regímenes terapéuticos se acortaran de una forma significativa. Se produjo un descenso progresivo de casos hasta mediados de los 80, en los que la irrupción del sida, la inmigración desde países en los que la enfermedad es muy prevalente, la formación de bolsas de pobreza y situaciones de hacinamiento, el impacto en los adictos a drogas por vía parenteral, junto con la escasez de recursos sanitarios, han hecho de la TB un problema creciente, con la adquisición y propagación epidémica de nuevos casos ⁽¹⁵⁾.

Todo ello ha llevado a una adherencia deficiente de los enfermos a los tratamientos, con la aparición y diseminación de cepas resistentes a los medicamentos. Parece que el futuro pasa por el desarrollo de nuevos fármacos, pero sobre todo, y principalmente, por aumentar fondos para programas de diagnóstico, tratamiento, seguimiento, y por tanto de control ⁽¹⁶⁾.

4.2.1.1 Historia de la Tuberculosis en Bolivia

La primera vez que en Bolivia se diagnosticó la tuberculosis, mediante la demostración irrefutable de la presencia del bacilo de Koch en un paciente, fue realizada por el Dr. Néstor Morales Villazón, al encontrar principalmente, en los esputos de los pacientes afectados por este mal el típico bacilo tuberculoso. Las investigaciones que fueron realizadas sobre la microbiología en nuestro país, fueron presentadas por el Dr. Morales, en el XV congreso de higiene y demografía, reunido en Washington del 23 al 28 de septiembre de 1912 ⁽¹⁸⁾.

Entre las aportaciones presentadas por Dr. Morales Villazón, estaban la afirmación de que la tuberculosis no existió en Bolivia hasta 1880, cuando fue introducida posteriormente por inmigrantes procedentes de Chile y el Perú ⁽¹⁷⁾. También presentó su experimento en el que inoculó cobayos con cultivos procedentes de laboratorios extranjeros, los cuales no producían síntomas en los animales, debido según decía, a que los bacilos no se habían aclimatado a las condiciones de la altura sobre el nivel del mar en que se encontraba La Paz. En cambio los cobayos inoculados con esputos de personas nativas afectadas por la tuberculosis sucumbían en un tiempo relativamente corto ⁽¹⁷⁾.

Pero no fue sino hasta la guerra del chaco (1932-1935) que se le dio importancia a la tuberculosis como una de las primeras causas de enfermedad y muerte en los soldados combatientes. La aparición de bubones en el cuello y las ingles de los combatientes, llamaron la atención de los médicos y para determinar el origen de estos bubones el Dr. Félix Veintemillas, director del Instituto Bacteriológico Nacional, junto con su equipo de colaboradores practicaron 60 inoculaciones en cobayos, con material del cuello y las ingles. Donde se encontró que, el 50% de los animales inoculados presentaron la tuberculosis y en las lesiones producidas se encontraron los bacilos de Koch. Hubo sin embargo otro cierto número de cobayos que murieron por otras causas. En 1963 se crea en Bolivia el laboratorio de epidemiología de la tuberculosis debido a la iniciativa del Dr. Gerardo Kahn, con la cooperación de la UNICEF, que proporciona material y equipos, con lo cual se dota a los servicios de salud de un centro de diagnóstico de laboratorio mediante el empleo de las pruebas de baciloscopia y cultivos ⁽¹⁹⁾.

Actualmente existe la Dirección Nacional de Laboratorios de Tuberculosis, dirigida por la Dra. Mirtha Camacho, que ha alcanzado reconocimiento internacional, a tal punto, que en el

congreso de 1993 Bolivia fue designada como sede de la presidencia de la Comisión Latinoamericana de Tuberculosis ⁽¹⁹⁾.

Del 21-26 de noviembre de 1994, se efectuó el primer seminario taller sobre la situación de la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de la Tuberculosis, organizado por la doctora Mirtha Camacho, Jefe de los laboratorios INLASA, donde demuestra las enormes deficiencias que se han encontrado, en el inventario de los recursos humanos, equipos existentes y condiciones para efectuar un diagnóstico satisfactorio de laboratorio. De todas maneras el simposio sirvió para establecer medidas que deben ser adoptadas, para encarar con la mayor seriedad el problema del control epidemiológico en el país. En la actualidad, el diagnóstico microbiológico en Bolivia, ha introducido métodos más prácticos, específicos y viables, empezando con la tinción de Ziehl Neelsen, cultivos (Lowenstein Jensen, y Stonebrink), reacciones enzimáticas, inmunológicas, hasta métodos moleculares ⁽²⁰⁾.

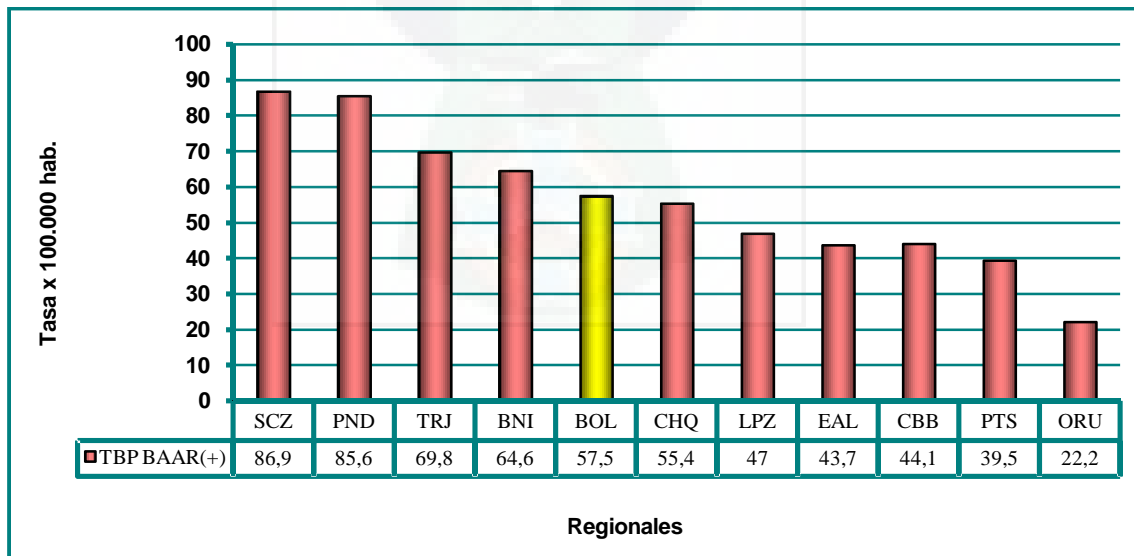
4.3 Situación Epidemiológica

Según datos de la gestión 2004, la notificación de la incidencia de tuberculosis clasifica a Bolivia entre los países con alta carga de tuberculosis con una incidencia de 100 o más por 100.000 habitantes, compartiendo esta situación con países del continente africano.

En la región de las Américas, Bolivia continua siendo un país de atención prioritaria para la OPS, por la carga de tuberculosis que presenta, constituyéndose en el grupo que aporta un 80% a la carga notificada, compartiendo esta situación con Haití, República Dominicana, Perú, Brasil entre otros.

La mayor carga de la enfermedad según notificación es el sexo masculino 59.8%, a razón de 1.5 hombres por cada mujer. El grupo etario que presenta el mayor número de casos está entre 15 a 34 años que evidencia que aún existe alta transmisión del bacilo en la comunidad. (Figura 3).

Figura 3: INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS PULMONAR BAAR (+) POR REGIONALES, BOLIVIA 2007



Fuente PNCT, PRCT

La gravedad del problema se evidencia por la tasa de incidencia, que en los Departamentos de Santa Cruz, Pando, Tarija y Beni se encuentran por encima de la media nacional, porque llevan la mayor carga de la enfermedad, debido a que son receptores de flujos migratorios. En tanto que los departamentos de Chuquisaca, La Paz, Cochabamba, Potosí, Oruro y el Municipio de El Alto aún no han alcanzado resultados de eficiencia en detección de casos, debiendo verificarse las causas de esta notificación ⁽²¹⁾.

TUBERCULOSIS MULTIDROGORRESISTENTE (TB-MDR)

Es la resistencia conjunta a Isoniacida y Rifampicina, es tan grave que se considera resistencia múltiple a fármacos, ya que son los más eficaces en el tratamiento de esta enfermedad.

Las resistencias en tuberculosis son el fiel reflejo de una mala práctica en el tratamiento, no es el caso de la resistencia primaria que es la transmisión de cepas resistentes existentes en la comunidad. Según la OMS, en el año 2000 existían 50 millones de personas que ya estaban infectadas por bacilos tuberculosos MDR.

En Bolivia, la mayor incidencia se presenta en el departamento de Santa Cruz (0.93) seguido de Tarija (0.42). (Tabla 1)

Tabla1: Distribución de casos TB - MDR Departamento – Bolivia 2006



Departamento	N° casos MDR	Tasa de Incidencia/100.000 hab.
Santa Cruz	23	0.93
La Paz	5	0.27
Cochabamba	3	0.17
Tarija	2	0.42
Oruro	1	0.22
Total	34	0.49 0.35*

(Fuente: Laboratorio de Referencia de Tuberculosis - *Tasa de prevalencia nacional.)

4.4 EVOLUCIÓN MOLECULAR DEL COMPLEJO *Micobacterium tuberculosis*

4.4.1 Esquema básico de la evolución de las Micobacterias

Las relaciones evolutivas entre los organismos del género *Micobacterium* se han investigado sobre la base del análisis de las similitudes derivadas («compartir rasgos derivados», sinapomorfías) y las características ausentes del grupo de organismos de los que se separó. Posiblemente, el ancestro del género *Micobacterium* era un organismo de vida libre y hoy especies de *Micobacterias* de vida libre (y también algunas especies saprofitas) representan las ramas conservadas de *Micobacterias*. Los organismos más distantes son probablemente los que viven en asociación con diversos organismos multicelulares. Se ha sugerido que las *Micobacterias* crearon una asociación duradera con los animales marinos (probablemente placodermos) que están en la raíz de esta rama filogenética. Por lo tanto, *Micobacterium marinum* resultaría de la rama conservadora, mientras que otras

Micobacterias asociadas a vertebrados se basarían en la rama anagenética. Grmek especula que la asociación de una especie de Micobacterias con vertebrados marinos pueden haber ocurrido durante el Devónico superior (300 millones de años)⁽²²⁾. La Figura 4 muestra la posición filogenética del complejo *Micobacterium tuberculosis* con especies del género *Micobacterium* basado en un árbol del gen que codifica para el 16S ácido ribonucleico ribosómico (ARNr).

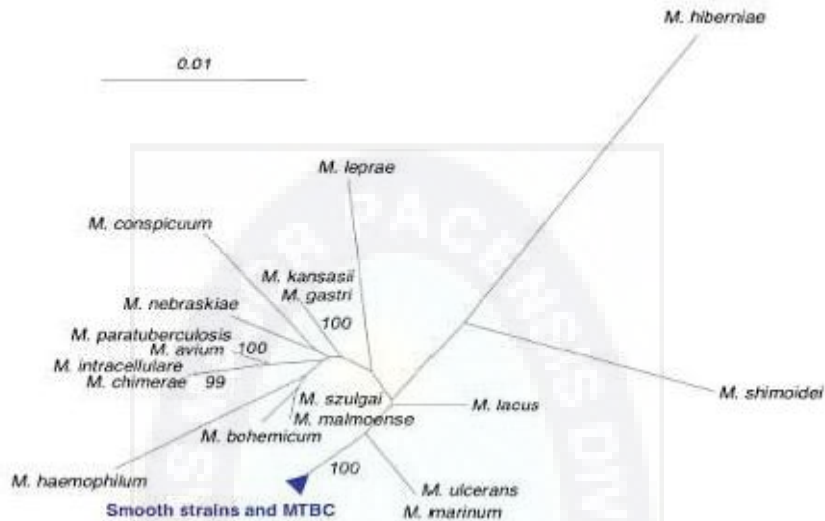


Figura 4: Posición filogenética del bacilo tuberculoso dentro del género *Micobacterium* (reproducido con permiso de Gutiérrez et al. 2005)

En el pasado, la sistemática Micobacteriológica solía confiar en caracteres fenotípicos, más recientemente, sin embargo, las técnicas genéticas han impulsado la realización de estudios taxonómicos⁽²³⁾. Las primeras características naturales para distinguir entre especies de Micobacterias fueron la tasa de crecimiento y la pigmentación. Entre las de crecimiento rápido (<7 días) están las libres, del medio ambiente, especies saprofitas, mientras que las especies patógenas suelen ser lentos e intracelular obligado. El producto lento-rápido división, que casi siempre se basa en la posesión de uno o dos operones rRNA (rrn operón)⁽²⁴⁾, ha demostrado ser filogenéticamente coherente⁽²⁵⁾.

En los años 50, la hipótesis de co-evolución, o la evolución paralela, entre huéspedes y Micobacterias no parecía más probable que la hipótesis alternativa de «introducciones múltiples, ocasionales (furtiva)» de saprofitos en hospederos diferentes. La creencia tradicional epidemiológica de la tuberculosis (TB) es que la antropozoonosis debida a *M.tuberculosis* puede encontrar su origen en un agente zoonótico, es decir, *Micobacteriumbovis*⁽²⁶⁾. Este punto de vista sigue siendo sostenido por algunos autores⁽²⁷⁾. Sin embargo, la genética ha traído algunas nuevas pistas al debate⁽²⁸⁾. Por ejemplo, la secuenciación del genoma de *Micobacteriumleprae*, por su carácter defectuoso, confirmó la hipótesis previa de que *M.leprae* es un patógeno menor que *M. tuberculosis*⁽²⁹⁾.

En el caso del complejo de *M.tuberculosis*, la genómica comparativa ha demostrado también que el genoma de *M. bovis* es más pequeño que el genoma de *M. tuberculosis*, abriendo el camino a un nuevo escenario para la evolución del bacilo de la tuberculosis⁽²⁸⁾. La reducción genómica de *M.bovis* (pérdida de genes) de hecho sugiere que podría ser un patógeno menor de *M. tuberculosis* o, en otras palabras, que la enfermedad de la TB humana precedió la enfermedad bovina^(26,28). La Figura 5 muestra que el antepasado común de los miembros del complejo *M. tuberculosis* está cerca de tres de sus ramas: "*Micobacteriumcanettii*",

Micobacterium africanum y ancestro Este-Africa-India (EAI). Sin embargo, según Smith et al. "Hasta que se demuestre que las cepas de *M. africanum* subtipo puede mantenerse en las células inmunocompetentes, el anfitrión-asociación del ancestro común más reciente del complejo *M. tuberculosis* sigue sin resolver" (30).

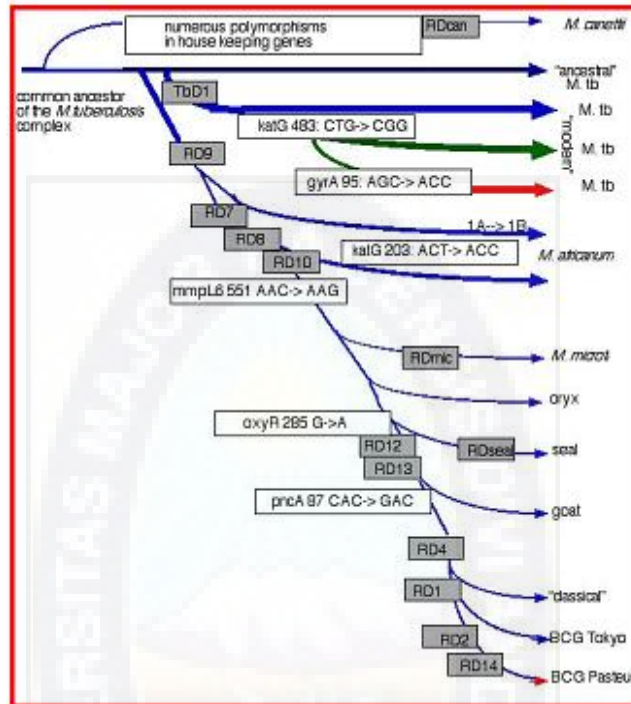


Figura 5: Esquema del camino del proceso evolutivo de *M. tuberculosis* en el que se ilustra la pérdida sucesiva de ADN en cierto linaje (reproducido con permiso de Brosch et al, 2002)

4.4.2 Genética Molecular del Complejo *Micobacterium tuberculosis*

Hasta hace poco, la cuestión de la variación genética de cada individuo dentro del complejo *M. tuberculosis* adquiría poca atención y la mayoría de la investigación sobre la tuberculosis se centró en el organismo en lugar de la población. El advenimiento de métodos moleculares, y su uso generalizado en los estudios de población, presentó dos nuevos desarrollos conceptuales y el desarrollo de nueva tecnología. La inferencia de filogenias a partir de datos moleculares se remonta a principios de los 90 con el desarrollo de software como PHYLIP y PAUP (31-33). En particular, el estudio de la filogenia del complejo *M. tuberculosis* fue seguido del desarrollo de un número creciente de métodos sofisticados de genotipificación. El camino fue abierto por *M. tuberculosis* en estudios de polimorfismo por longitud del fragmento de restricción basada en secuencia de inserción IS6110 (RFLP IS6110) (34). Sin embargo, el uso de IS6110 RFLP en el descubrimiento de la genética evolutiva tenía un valor limitado por varias razones:

- Ø Alta tasa de variación de este marcador evolutivo (35).
- Ø Complejidad de fuerzas que impulsan la adaptación y el riesgo de la convergencia genética (36).
- Ø Naturaleza de los datos experimentales, los cuales requieren de un software sofisticado para el análisis.
- Ø Dificultad para construir grandes conjuntos de datos (37).

El descubrimiento en 1993 de la naturaleza polimórfica de la repetición directa de locus, y el posterior desarrollo del método de spoligotyping basado en la variabilidad locus DR, introdujo los conceptos más modernos y herramientas para la genotipificación del complejo *M. tuberculosis*^(38,39). En la actualidad, un total de 62 clados del complejo *M. tuberculosis* o linajes se detallan en la cuarta base de datos internacional spoligotyping (SpolDB4), que describe 1.939 tipos compartidos que representan un total de 39.295 cepas de *M. tuberculosis* de 122países⁽⁴⁰⁾. Algunos de los principales clados del complejo *M. tuberculosis* y sus espiligotipos.

4.4.2.1 Co-evolución de *M. tuberculosis* con sus hospederos

La alta diversidad genética de *M. canettii* encontrada en el cuerno de África, lleva a creer que probablemente sea la fuente del complejo *M. tuberculosis* en lugar de otra rama de la misma⁽⁴¹⁾. Además los resultados confirman que a pesar de la aparente homogeneidad del genoma de *M. canettii* es resultado de transferencia génica horizontal anterior a la expansión clonal. La similitud con *M. prototuberculosis* sugiere que el bacilo de la tuberculosis fue contemporáneo de los primeros homínidos en África oriental, y puede por lo tanto que haya ido evolucionando con su hospedero humano mucho más de lo que se pensaba⁽⁴²⁾.

Los modelos de simulación reportado en 1988 sugirieron que se requiere una población con un tamaño de 180 a 440 personas para que se produzca una epidemia. En tales condiciones, la convivencia hospedero-patógeno se mantiene en las poblaciones⁽⁴³⁾. El concepto de estabilidad endémica, sugiere que una enfermedad infecciosa puede alcanzar un estado epidemiológico en el que la enfermedad clínica es escasa, a pesar de los altos niveles de infección en la población⁽⁴⁴⁾. Es evidente que este concepto puede aplicarse a la tuberculosis, ya que es más probable que haya sido una enfermedad de transmisión vertical, antes de ser responsable de grandes brotes.

La cuestión de cómo muchas comunidades aisladas de entre 180 a 440 personas pueden haber experimentado, de forma secuencial o simultánea, la introducción de uno o más genotipos del complejo *M. tuberculosis* (cada uno con su propia virulencia específica), o en otras palabras, cómo la TB fue "sembrada" es de suma importancia, para proporcionar las condiciones iniciales de un sistema de epidemia dinámica, y entender cómo estos genotipos se propagan en condiciones de baja demografía. Hoy en día, podemos observar una epidemia mundial filogeográficamente, como resultado de milenios de evolución, y ver que algunos clones se han extinguido, mientras que otros tienen un mayor riesgo de aparición⁽⁴⁵⁾. La tasa de evolución de la tuberculosis es probable que haya sido, sucesivamente, lenta (migración de humanos y ganado), a continuación, moderada (cinco siglos posterior a la migración de Colón), con importantes cambios antropológicos que pueden haber creado las condiciones para la ruptura del vínculo entre crecimiento demográfico y la migración, y, por último, rápido (desde la introducción del transporte aéreo), es decir, dentro de las cinco décadas hubo mayor movimiento de cepas y la gente, de forma concomitante a los brotes nuevos en una demografía activa y con países de pocos recursos donde la gran mayoría de los casos está presente.

Por consiguiente la epidemia mundial de tuberculosis es el resultado de una combinación de la lenta, media y rápida evolución en diferentes brotes de la historia.

4.4.3 *Micobacterium tuberculosis* a través del tiempo y del espacio

El concepto de la filogeografía como la historia de los procesos que controlan la distribución geográfica de los genes y linajes mediante la construcción de genealogías de poblaciones y genes fue introducido por Avise ⁽⁴⁶⁾. El término fue establecido para describir geográficamente señales estructurales dentro de especies. Este concepto podría aplicarse a los estudios sobre la propagación mundial de *M.tuberculosis* a través del tiempo. Si el ancestro de *M.tuberculosis* se adaptó poco a poco a los seres humanos pudo haberlo hecho a través de clonalidad de extremos, una estructura filogeográfica profundamente arraigada y peculiar que refleja tanto la historia demográfica y la historia de la propagación de la TB.

La existencia de variaciones geográficas y epidemiológicas es significativa en la genética del complejo *M.tuberculosis* como ya se reconoció en 1982 ⁽⁴⁷⁾. Entre estos estaban los de Asia, de la especie bovina y las variantes clásicas, además de las variantes *africanum* I y II.

La transferencia genética lateral en la historia de una especie es importante para entender mejor su especificidad. En cuanto a los miembros del (CMTB), con la excepción de *M.canettii* no hay pruebas de transferencia genética lateral o de la recombinación de genes de organización ⁽⁶¹⁾. De hecho, la evidencia reciente argumenta en favor de la existencia de transferencia genética lateral en el precursor del complejo *M.tuberculosis*, y en favor de que las Micobacterias ambientales son la fuente de algunos componentes genéticos en el complejo de *M.tuberculosis*. Estos resultados refuerzan la idea de que el ancestro del complejo *M.tuberculosis* fue una Micobacteria de medio ambiente ⁽⁴⁸⁾. Otra fuente de ADN exógeno pueden ser plásmidos que se han demostrado en especies modernas de Micobacterias, en ocasiones para llevar genes de virulencia ⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾.

4.5 Aspectos Fenotipicos

4.5.1 Bacilo tuberculoso

Las bacterias del género *Micobacterium* no tienen motilidad ni esporulan. Se agrupan en el rango de los actinomicetos que, excepcionalmente, tienen un alto contenido de guanina-citosina (61-71%) en su ADN genómico, y un alto contenido de lípidos en su pared, probablemente el más alto entre todas las bacterias. La abundante cantidad de ácidos micólicos distingue a las Micobacterias de otras con cierta semejanza fenotípica. Estos lípidos pueden actuar como reservas de energía y también están involucrados en la estructura y función de las membranas y orgánulos membranosos dentro de la célula. Los lípidos constituyen más de la mitad del peso seco de las Micobacterias. Sin embargo, la composición lipídica del bacilo tuberculoso puede variar durante el ciclo de vida en cultivo, en función de la disponibilidad de nutrientes. La capa cerosa confiere las características idiosincrásicas del género: solidez de ácido, hidrofobicidad extrema, resistencia a las lesiones, entre ellas la de muchos antibióticos, y las propiedades inmunológicas distintivas; es probable que también contribuya a la lenta tasa de crecimiento de algunas especies, limitando la absorción de nutrientes ⁽⁵¹⁾. (Figura6)



Figura6: Tinción Ziehl-Neelsen de crecimiento en cultivo de *Micobacterium tuberculosis* con aumento 1000x.

Las especies dentro del género *Micobacterium* muestran gran diversidad en muchos aspectos, la mayoría de ellos viven y se reproducen libremente en los ecosistemas naturales y rara vez causan enfermedades. Solo unos pocos se convierten en patógenos de los vertebrados superiores y habitan en el medio intracelular de los fagocitos mononucleares. Las bacterias del complejo *M.tuberculosis* son capaces de reproducirse *in vitro*, a diferencia de *M. leprae* y *M. lepraemurium*, que requieren el medio intracelular para su supervivencia y propagación.

M.tuberculosis y las variantes regionales o subtipos (Tabla 2) *M. africanum* y *M. canettii* son los principales patógenos humanos, *M. bovis* y *M. microti* son los agentes causales de tuberculosis en animales, y pueden ser transmitidas a humanos. Algunas cepas aisladas en particular de cabras y focas han sido nombradas como *Micobacteriumcaprae* y *pinnipedi*, aunque a veces son identificadas como subespecies o variantes de *M. bovis*. Se podría esperar que los grandes cambios evolutivos involucrados en la adaptación a distintos huéspedes hubiera supuesto una diferenciación microbiológica significativa. Sin embargo, la diferenciación fenotípica es consistente con claridad entre especies absolutas pero las diferencias entre variantes comprendidas dentro de las especies absolutas no son muy definidas. La estrecha relación entre los miembros del complejo está respaldado por una alta similitud del ADN genómico. Al mismo tiempo, algunos marcadores moleculares permiten la diferenciación de especies dentro del complejo.

Tabla 2:

Linaje de los agentes de la tuberculosis

Reino:	Bacteria
Familia:	Actinobacteria
Clase:	Actinobacteria
Subclase:	Actinobacteridae
Orden:	Actinomycetales
Suborden:	Corinebacterineae
Familia:	Mycobacteriaceae
Género:	<i>Micobacterium</i>
Especies:	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> "M. canettii" <i>M. caprae</i> <i>M. pinnipedii</i>

(FUENTE: Palomino – Leão – Ritacco, et al. Tuberculosis 2007. 1ª Edición)

En general, la sistemática y clínica micobacteriológica acepta nuevos taxones a un ritmo lento. Por ello, el estatus taxonómico de algunos nuevos miembros del complejo continua incierto. Al mismo tiempo, el rango y la asignación de las especies han sido cuestionados en otros casos^(51,52). El valor de los rasgos fenotípicos y genotípicos en la definición de una especie en el complejo debe ser examinado de nuevo para satisfacer las nuevas definiciones.

4.5.2 Morfología microscópica

La apariencia microscópica no permite la diferenciación de agentes patogénicos de la tuberculosis, principalmente *M. tuberculosis*, de otras bacterias aunque algunas características pueden ser indicativas. En frotis teñidos con carbol fuccina o con auramina y examinados bajo un microscopio de luz, los bacilos de la tuberculosis típicamente aparecen como bastones rectos o ligeramente curvados. De acuerdo a las condiciones de crecimiento y a la edad del cultivo los bacilos pueden variar en tamaño y forma desde cocobacilos cortos hasta bastones alargados. Una forma típicamente curvada ha sido descrita para *Micobacterium microtti* ⁽⁵³⁾. Las dimensiones de los bacilos se han reportado entre 1 a 10 μm de largo (usualmente 3 a 5 μm), de 0.2 a 0.6 μm de ancho. Por consiguiente, la longitud del microorganismo es comparable al diámetro del núcleo de un linfocito. A diferencia de algunas *Micobacterias* de crecimiento rápido y de otros actinomicetales, *M. tuberculosis* raramente es pleomórfico no se alarga hasta formar filamentos, y no se ramifica en cadena cuando se observa en muestras clínicas o de cultivo. En la infección experimental en macrófagos, los bacilos intracelulares fueron descritos como significativamente alargados al ser comparados con los bacilos que crecieron en caldo, y de manera recalable, se observó que despliegan estructuras similares a brotes ⁽⁵⁰⁾.

Cuando son numerosos y se multiplican de manera activa, los bacilos son fuertemente ácidos y muestran una evidente y distintiva tendencia a formar agrupaciones hidrofóbicas. Los bacilos libres pueden también ser vistos aunque de manera particular en el borde de los extendidos. En tejido del hospedero que no ha sido lisado los bacilos son más numerosos dentro de las células fagocíticas.

Una vez que la enfermedad ha sido controlada, los bacilos teñidos se vuelven dispersos, a menudo coloreados de manera tenue o leve, debido a la pérdida parcial de los componentes internos. Claro, el teñido irregular también puede deberse a defectos en la técnica o de los procedimientos y también de los tintes.

El examen bajo microscopio de luz no puede resolver las estructuras internas de los bacilos de la tuberculosis con la excepción de algunas vacuolas lipídicas intracelulares que aparecen como esférulas no teñidas a intervalos regulares dentro de los bacilos ⁽⁵⁴⁾ y depósitos de material lipofílico que pueden cumplir una función de almacenamiento ⁽⁵⁵⁾. A pesar de los considerables esfuerzos que se han realizado, no se ha podido lograr una resolución de la ultraestructura de los bacilos. Esto probablemente se deba a problemas técnicos originados por la bioseguridad, por el tamaño diminuto de los bacilos, y por las grandes cantidades de lípidos complejos existentes en su pared celular. Con la microscopía electrónica, algunos gránulos internos intensos pueden ser identificados. Se cree que los mismos están constituidos por polifosfatos y pueden ser una fuente de energía en la célula además de ser el sitio de las reacciones de oxidación y reducción. En algunas secciones de la célula se ha visto que la membrana plasmática prolifera hasta formar cuerpos internos tanto laminados como vesiculares los cuales pueden cumplir actividades metabólicas. Los ribosomas, los filamentos y las bandas radiales de ADN, han sido postulados como remanentes de la división celular y los mismos también pueden ser descritos ^(54,56).

Recientemente la iniciación de la formación del septum antes de la división celular fue claramente evidenciada etiquetando los anillos de la mitad de la célula con la proteína verde fluorescente ⁽⁵¹⁾. También, se han conseguido imágenes impresionantes de la superficie de *Micobacterium bovis* BCG las cuales fueron obtenidas por microscopía de fuerza atómica ⁽⁵⁷⁾.

4.5.3 Estructura de la pared celular

Como el rasgo anatómico más distintivo de los bacilos, la envoltura de las Micobacterias la cual ha sido ampliamente representada por modelos esquemáticos está compuesta por membrana plasmática, pared celular y la capa externa similar a capsula.

La membrana citoplasmática de las Micobacterias no parece ser peculiar excepto por la presencia de algunos lipopolisacáridos que de alguna manera son compartidos por todos los actinomicetales⁽⁵⁸⁾. Esta interface vital proporciona protección osmótica, regula el tráfico de solutos específicos entre el citoplasma y el entorno, y asume de manera subordinada las tareas internas de la célula. La membrana contiene proteínas con diferentes funciones por ejemplo algunas actúan como sensores que miden la concentración de moléculas en el ambiente, proteínas que translocan señales a la maquinaria genética y metabólica en el citoplasma. Enzimas involucradas en los procesos metabólicos y en la generación de energía y acarreadores que son mediadores selectivos del pasaje de nutrientes y de iones, las enzimas intervienen en la síntesis de la pared celular y de la membrana en la formación del septum durante la división celular en el ensamblaje y en la secreción de proteínas extra citoplasmáticas y en la replicación del ADN sin embargo todavía se conoce muy poco de manera específica acerca de la membrana de *M. tuberculosis*.

La membrana está rodeada como en casi todas las bacterias por una pared celular que protege el contenido de la célula, proporciona apoyo mecánico y es responsable de la forma característica de la bacteria. La pared celular de las Micobacterias sin embargo, es única entre las procariotas, ya que está constituida por una capa interna de peptidoglicano la cual parece ser responsable de la propiedad que da lugar a la forma y de la integridad estructural de la bacteria, la estructura de este estrato difiere levemente de la estructura de una bacteria común ya que están presentes algunos residuos químicos particulares y un número alto e inusual de entrecruzamientos. De hecho, el grado de péptidoglicano entrecruzado en la pared celular de *Micobacterium tuberculosis* es de 70 a 80 % mientras que en *Escherichiacoli* es del 20 a 30 %.

Covalentemente unido al péptidoglicano está un polisacárido ramificado el arabinogalactano, cuyas terminaciones externas están esterificadas con ácidos grasos de alto peso molecular llamados ácidos micólicos. Estos componentes son peculiares ya que el arabinogalactano tiene componentes inusuales y uniones además que los ácidos micólicos son cadenas alargadas y ramificadas que contienen de 60-90 átomos de carbono. Los arreglos de estos ácidos son específicos según la especie una propiedad que permite la identificación de muchas especies de micobacteria, mediante cromatografía de gas/líquido, cromatografía líquida de alta resolución, o cromatografía en capa fina, los ácidos micólicos específicos para *Micobacterium tuberculosis* son los alfa, ceto y metoximicolatos que contienen de 76-82 átomos de carbono de 84-86 átomos de carbono y de 83-90 átomos de carbono respectivamente.

La capa externa de la pared celular presenta un arreglo de lípidos libres tales como tiocerol dimicoserosatos (PDIM), glucolípidos fenólicos (PGL), glucolípidos que contienen a la trealosa y sulfolípidos (SL), el inusual *Micobacterium canetti* con su morfología de colonia lisa tiene un glucolípidos fenólico único⁽⁵⁹⁾. *Micobacterium bovis* y *Micobacterium bovis* BCG producen cantidades determinables de un glucolípidos fenólico designado como micosido B, sin embargo la mayoría de las cepas de *Micobacterium tuberculosis* no tienen a este componente.

Atravesando toda la envoltura celular algunos glucolípidos tales como fosfatidil-mioinositol manosidos, lipomanano (LM) y lipoarabinomanano (LAM) están anclados a la

membrana plasmática y se extienden por todo el exterior de la pared celular. Los lipoarabinomananos son específicos según la especie. La pared de las Micobacterias también contiene proteínas interespaciadas, algunas se encuentran en proceso de ser exportadas, otras pueden ser residentes de la pared celular. Varias de estas proteínas son responsables de la construcción de la pared celular durante la vida del bacilo existen ciertas proteínas llamadas porinas las cuales forman canales hidrofílicos que permiten el pasaje pasivo de solutos acuosos a través de la capa ácido micolico, las porinas de las Micobacterias parecen ser diferentes de las porinas de las bacterias gram negativas⁽⁵⁵⁾.

Mientras crece en líquido estático o dentro de las células humanas *Micobacterium tuberculosis* parece acumular una pseudo cápsula no unida. Aparentemente cuando el medio es perturbado la cápsula se separa dejando la superficie lipofílica expuesta, de hecho los componentes de la cápsula han sido bastante bien reconocidos en filtrados de cultivos pero su estructura y su localización recientemente fueron resueltos. La cápsula contiene proteínas polisacáridos y cantidades menores de lípidos internos, los cuales aparentemente están en constante recambio. Los constituyentes de la cápsula pueden ser mudados *in vivo* dentro de las células del hospedero que están infectadas, se ha propuesto que la cápsula puede ser protectora y bioactiva. Además un número de sustancias asociadas a la envoltura han sido descritas, la mayoría lípidos y glupolípidos⁽⁵⁸⁾.

Los bacilos de la tuberculosis comparten la mayoría de sus características ultraestructurales con otros miembros del género, incluyendo las Micobacterias no patogénas. Su capacidad distintiva para sobrevivir en hospederos mamíferos, su patogenicidad y sus propiedades inmunogénicas parecen derivar, al menos en parte, de la naturaleza de algunas de las moléculas de la pared bacteriana^(60,61).

La envoltura celular de los bacilos de la tuberculosis parece ser una estructura dinámica que puede ser remodelada a medida que el microorganismo está creciendo o persistiendo en diferentes ambientes⁽⁶²⁾. De hecho en condiciones de crecimiento que interfieren con la síntesis de la pared celular *M. tuberculosis* puede ser inducido a producir esferoplastos que no tienen dicha pared los cuales aparentemente no son patogénicos a menos que se reviertan las condiciones y vuelvan a ser bacterias normales⁽⁶³⁾. En condiciones deficientes de oxígeno pudo observarse la reducción del espesor de la pared celular⁽⁶⁴⁾. Además parece incrementarse la expresión de genes que posiblemente codifiquen a las porinas en ciertas condiciones ambientales, tales como un medio de cultivo moderadamente acidificado como también dentro de las vacuolas de los macrófagos⁽⁶⁵⁾.

4.5.4 Requerimientos nutricionales y ambientales para su crecimiento

El bacilo tuberculoso es prototrófico, es decir, puede construir todos sus componentes a partir de fuentes básicas de carbono y de nitrógeno y heterotrófico, es decir que puede utilizar componentes orgánicos previamente sintetizados como una fuente de carbono y de energía. La estructura macromolecular del microorganismo y las capacidades fisiológicas y metabólicas resultan en una alta adaptación a un ambiente específico, en cambio la calidad nutricional del ambiente determina el estilo de vida y las limitaciones del bacilo, ya sea en un hábitat natural o en un medio de cultivo, como también lo hacen varias condiciones físicas tales como la disponibilidad del oxígeno, la temperatura, el pH y la salinidad.

Micobacterium tuberculosis es mesófilo y neutrófilo, por esto se restringe a condiciones ofrecidas por los animales de sangre caliente; cerca de 37°C y un pH neutro, pero, a medida que

el ambiente cambia el bacilo es capaz de desplegar diferentes rutas fisiológicas a fin de sobrevivir incluso a las condiciones más severas. Se ha mostrado que durante el curso de la infección en los ratones, el metabolismo de *M. tuberculosis* puede cambiar desde un modo aeróbico que metaboliza carbohidratos, hasta un metabolismo que es más microaerófilico y que utiliza lípidos ⁽⁶⁶⁾, esto es apoyado en tiempos recientes por la completa secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*, en el cual se identificaron un elevado e inusual número de genes que posiblemente estén involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos, este fenómeno puede estar relacionado con la capacidad del patógeno para crecer o persistir en los tejidos del hospedero donde los ácidos grasos pueden ser la mayor fuente de carbono ⁽⁶⁷⁾.

En condiciones *in vitro* los miembros del complejo de *M. tuberculosis* no son exigentes, a menos que sean dañados por algunos agentes anoxicos; De hecho el medio empleado por Koch para cultivarlos era simplemente suero coagulado estéril. Los bacilos tuberculosos pueden también crecer en soluciones salinas utilizando glicerol como fuente de Carbono, iones de amonio y asparagina como fuentes de nitrógeno y micronutrientes, son capaces de metabolizar el glicerol y volverlo piruvato mientras que *M. bovis* no, de hecho el análisis de la secuencia del genoma confirmó que todos los genes requeridos para la formación del piruvato no son funcionales en *M. bovis* ⁽⁶⁸⁾.

Otros elementos como el magnesio y el hierro son esenciales para la vida, una deficiencia en estos elementos frecuentemente reduce la virulencia de los patógenos bacterianos incluyendo a los bacilos de la tuberculosis. Para incorporar el hierro a la célula se requieren sistemas especiales, las Micobacterias utilizan sideroforos llamados exoquelinas que son péptidos hidrofílicos secretados en el ambiente para la recolección de hierro, y las micobactinas que son componentes hidrofóbicos ubicados dentro de la pared celular que introducen hierro hacia el citoplasma. La incorporación de micobactina a un medio de cultivo puede promover el crecimiento de aislados de *M. tuberculosis* que están dañados.

Los bacilos de la tuberculosis requieren de un átomo de oxígeno como último aceptor de electrones en la respiración aeróbica, por esto el bacilo crece mejor en tejidos con una tensión parcial de oxígeno elevada como en los pulmones particularmente en los lóbulos superiores que son bastante bien aireados, por otra parte en el laboratorio, una atmosfera de 5-10% de CO₂ favorece el crecimiento del cultivo al menos durante las primeras etapas de la incubación.

4.5.4.1 Tiempo de generación

Micobacterium tuberculosis se divide a ritmo muy lento cada 12-24 horas, la baja tasa de crecimiento puede ser determinada parcialmente por la impermeabilidad de la pared celular que limita la captación de nutrientes, sin embargo Harshey y Ramakrishnan identificaron que la síntesis de ARN es el mayor factor asociado al largo tiempo de generación de los bacilos de la tuberculosis. Ellos demostraron que tanto la proporción del ARN/ADN y la proporción de la elongación de la cadena de ARN es 10 veces menor de *M. tuberculosis* al ser comparado con *E. coli* ⁽⁶⁹⁾. Otra característica especial es la existencia de un solo operon que dirige la síntesis del ARN y en el cambio de fase estacionaria a fase activa este incrementa tan solo 2 veces su valor, consecuentemente la síntesis de proteínas se puede retrasar ⁽⁷⁰⁾.

La baja tasa de multiplicación explica la evolución típicamente subaguda a crónica de la enfermedad y el largo periodo de tiempo para mantener visibles el crecimiento en condiciones *in vitro*.

4.5.5 Marcadores metabólicos y bioquímicos

En laboratorio fueron desarrolladas pruebas clave para detectar ciertos intermediarios metabólicos y la actividad de algunas enzimas que son esenciales para la vida y la patogenicidad, tales como la acumulación de niacina, la actividad de la nitrato reductasa y la ureasa, que además permiten la diferenciación de las especies dentro del CMTB.

La niacina está involucrada en reacciones de óxido-reducción del metabolismo energético y los procesos de reparación del ADN. Aunque todas las micobacterias producen niacina, *M. tuberculosis* produce y acumula cantidades substanciales de niacina como resultado de una ruta bastante activa de degradación de la nicotinamida adenina dinucleótido y la incapacidad de procesar la resultante niacina⁽⁸⁷⁾. En condiciones *in vitro* *M. tuberculosis*, *canettii*, y algunos aislados de *M. africanum* excretan niacina soluble en agua hacia el medio de cultivo, la dirección del cual es extremadamente útil para la identificación definitiva.

La principal enzima de *M. tuberculosis* que puede hidrolizar al peróxido de hidrogeno es una catalasa peroxidasa termolábil, la cual tiene ambas actividades de catalasa y peroxidasa. La termolabilidad de esta enzima es un marcador del complejo de *M. tuberculosis* que también tiene una alcil-hidroxiperoxidasa alternativa, la cual se ha postulado que compensa la falta de la actividad como catalasa. Paradójicamente, la catalasa no solamente es autoprotectiva sino que también puede ser autodestructiva, ya que activa a la prodroga isoniacida que tiene actividad antituberculosis. Las mutaciones en los genes que codifican a ambas enzimas (*katG* y *ahpC*) están involucradas en la resistencia a la isoniacida y, por consiguiente, han sido objeto de una activa y amplia investigación. De manera comprensible la resistencia a la isoniacida puede estar asociada a una actividad irregular de la catalasa. Entre los marcadores bioquímicos comúnmente investigados para la identificación de las Micobacterias en el laboratorio microbiológico clínico, este es el único marcador que puede ser afectado por la resistencia a las drogas en algún grado de magnitud.

Aun cuando *M. tuberculosis* prefiere al amonio y a la asparagina puede usar nitrato o nitrito de manera deficiente como únicas fuentes de nitrógeno y como aceptor final de electrones en ausencia de oxígeno. La nitrato reductasa está unida a la membrana celular de *M. tuberculosis* y es permanentemente activa *in vitro*, bajo condiciones de hipoxia, o exposición a óxido nítrico, su actividad es reforzada por la inducción de la proteína Nark2⁽⁷²⁾, la que transporta nitrato y es capaz de determinar el estado redox de la célula y ajustar su actividad de acuerdo a este. La actividad reductasa parece estar codificada por el operón constitutivo Narghji el cual está presente en *M. tuberculosis* y *M. bovis*; sin embargo esta última no reduce el nitrato. Se ha demostrado que un polimorfismo en un nucleótido en la posición 215 dentro del promotor de este gen determina diferentes niveles de la enzima⁽⁶⁹⁾.

La ureasa es codificada por los genes *ureABC*⁽⁷³⁾ y también puede ser importante para la adquisición de nitrógeno, ya que su actividad incrementa cuando las fuentes de nitrógeno son limitadas⁽⁷⁴⁾; además, la consecuente alcalinización del microambiente por los iones de amonio puede inhibir la maduración de los fagolisosomas y puede contribuir a la maduración defectuosa de las moléculas que comprenden el complejo mayor de histocompatibilidad clase II de los monocitos del hospedero⁽⁷⁵⁾.

4.5.6 Resistencia física y química

Los bacilos de la tuberculosis tienen la capacidad de soportar condiciones desfavorables para evitar su destrucción dentro los macrófagos y limitar el acceso de los antibióticos y antisépticos hidrofílicos, como ya se mencionó anteriormente, estos se multiplican dentro de estrechos rangos de temperatura pH y a una tensión de oxígeno elevada, sin embargo, los bacilos sobreviven en microambientes ácidos o alcalinos, como resultado de su interacción con los mecanismos de defensa del hospedero. En el laboratorio esta propiedad es explotada para aislar selectivamente micobacterias con el uso de diluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio.

Para que la bacteria soporte bajos niveles de pH en un ambiente limitado de nutrientes se requiere altos niveles de magnesio. La viabilidad de las bacterias puede ser preservado entre 2 a 4°C y hasta -70°C, por otra parte, los bacilos son bastante sensibles al calor y a la radiación, tanto de la luz solar como la UV, los mismos pierden su viabilidad en una semana de exposición directa a radiación UV.

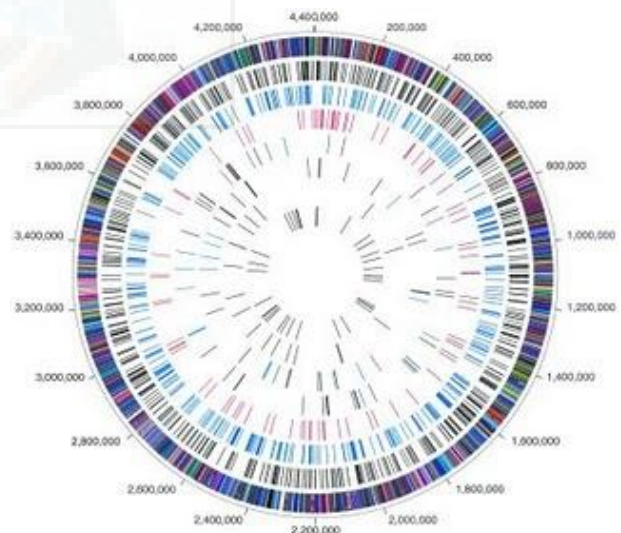
M. tuberculosis tolera la tensión de oxígeno reducida, en esta condición no se dividen pero todavía se mantienen viables, aunque, incrementan la susceptibilidad a drogas como el metronidazol efectiva contra bacterias anaerobias, ya que el espesor de la pared celular del microorganismo se reduce notoriamente, como demostraron Cuninjan y Espretbori por microscopia electrónica, lo cual puede ser una estrategia para soportar el vaciamiento de oxígeno; bajo estas condiciones una proteína altamente expresada y ubicua de 16 kd pudo ser identificada. Esta proteína de choque al calor puede desempeñar una función en la estabilización de las estructuras celulares para la supervivencia a largo plazo en el estado vegetativo. La ajustada estructura de la pared celular de los bacilos de la tuberculosis es indudablemente el escudo que preserva la posición y función de la maquinaria metabólica y de replicación, incluso cuando está inactiva; al mismo tiempo una secuencia de mecanismos fisiológicos, los cuales todavía están pobremente entendidos están listos para cambiar su maquinaria hacia un estado inactivo cuando sea que fuera necesario; esta parece ser la principal respuesta adaptativa de los bacilos a casi todas las condiciones subóptimas o incluso las condiciones severas tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*.

4.6 GENOMA DE *Micobacterium tuberculosis*

4.6.1 Organización genómica

Las características únicas de la biología del bacilo de la tuberculosis, tal como su crecimiento lento, la naturaleza de su pared compleja, ciertos genes relacionados con su virulencia y persistencia, y la aparente estabilidad de su genoma, fueron elucidados gracias a la secuenciación del genoma de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv⁽⁷⁶⁾.

M. tuberculosis H37Rv⁽⁷⁶⁾ posee una secuencia de 4.411.529 pares de bases, con alto contenido de guanina y citosina (65,5%). Sólo unas pocas regiones mostraron un sesgo en este contenido de G + C. Un grupo



notable de los genes con un alto contenido de G + C (> 80%) parecen ser exclusivas de micobacterias y pertenecen a la familia del PE o proteínas del PPE. A su vez, los pocos genes con bajo contenido de G+C (<50%) son los que codifican para las proteínas transmembrana o sintasas policétido.

Se encontraron cincuenta genes codificantes para ARN funcional. Sólo había un operón ribosomal ARN (*rrn*). Este operón se encontró que se ubica en 1,5 Mpb desde el origen de la replicación (locus *oriC*). La posesión de un solo operón *rrn* en una posición relativamente distante de *oriC* ha sido propuesta como un factor que contribuye al fenotipo lento crecimiento del bacilo tuberculoso ⁽⁷⁷⁾.

La característica más estudiada de *M. tuberculosis* es la presencia y distribución de secuencias de inserción (IS). De particular interés es 6110, una secuencia de la familia IS3 que ha sido ampliamente utilizada para caracterización de cepas y la epidemiología molecular, debido a su variación en el sitio de inserción y el número de copias ⁽³⁴⁾. Dieciséis ejemplares 6110 se identificaron en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, algunos sitios de inserción IS6110 se han agrupado en sitios llamados puntos calientes de inserción. En la misma cepa se encontró seis ejemplares de la más estable IS1081, una secuencia de inserción casi idéntica en la mayoría de las cepas cuando se analiza por fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) ^(78,79).

El genoma de *M. tuberculosis* posee siete sitios *att* potenciales para la inserción del profago PhiRv1, lo que explica la variabilidad de su posición entre las cepas ⁽⁷⁶⁾. Un segundo profago, PhiRv2 ha demostrado ser mucho más estable, con menos variabilidad entre las cepas ⁽⁷⁶⁾.

El análisis del uso de codones mostraron una preferencia por los codones ricos en G + C. También se constató que el número de genes que surgieron por duplicación es similar al número visto en *E. coli* o *B. subtilis*, pero el grado de conservación de los genes duplicados es mayor en *M.tuberculosis*. La falta de divergencia de genes duplicados es consistente con la hipótesis de una lentaevolución reciente. ^(77,81).

Es evidente que *M.tuberculosis* tiene el potencial de cambiar de una vía metabólica a otra, como de respiración aeróbica (fosforilación oxidativa) a la respiración anaerobia (reducción de nitratos). Esta flexibilidad es útil para la supervivencia en el entorno cambiante en el huésped humano que van desde la alta tensión de oxígeno en el alveolo pulmonar para microaerofilia a condiciones anaeróbicas en el granuloma tuberculoso. Otra de las características del genoma de *M. tuberculosis* es la presencia de genes para la síntesis y la degradación de casi todas las clases de lípidos, como los complejos ácidos micólicos a partir de ácidos grasos simples. En total, hay 250 distintos genes que codifican las enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos, en comparación con sólo 50 en el genoma de *E.coli* ⁽⁷⁶⁾.

Entre las familias de genes y proteínas más importantes que se encuentra en *M. tuberculosis* están los PE y las familias del PPE multigénica, que representan casi el 10% de la capacidad del genoma. Estas proteínas se cree que juegan un papel importante en la supervivencia y multiplicación de las micobacterias en diferentes ambientes ⁽⁸¹⁾. Hay alrededor de 100 miembros de la familia PE, que se divide en tres sub-familias, la más importante de ellas es la de secuencias polimórficas ricas en GC (PGRS) clase que contiene 61 miembros. Las proteínas de esta clase contienen múltiples repeticiones en tándem del motivo Gly-Gly-Ala, por lo tanto, su concentración de glicina es superior al 50%. Las proteínas PE_PGRS se han

encontrado de manera exclusiva en el complejo *M. tuberculosis*⁽⁸¹⁾, y se sabe que inhiben la presentación de antígenos a través del complejo de histocompatibilidad (MHC) clase I⁽⁷⁶⁾.

Curiosamente, el análisis del sistema metabólico del ácido desoxirribonucleico (ADN) de *M. tuberculosis* indica un sistema de reparación del ADN muy eficiente, es decir, maquinaria de replicación de la fidelidad excepcional. El genoma de *M. tuberculosis* carece de los genes de reparación del sistema basado en *MutS*. Sin embargo, esta ausencia es superada por la presencia de cerca de 45 genes relacionados con los mecanismos de reparación del ADN⁽⁸²⁾, incluyendo tres copias del gen *mutT*. Este gen codifica la enzima responsable de la eliminación de guaninas oxidadas cuya incorporación durante la replicación causaría un desajuste en el apareamiento de las bases^(76,82).

4.6.2 Genoma funcional

La genómica funcional se centra en la transcripción del gen, traducción, y las interacciones proteína-proteína. Los genes funcionan siempre y cuando se expresan su expresión está regulada a nivel transcripcional o post-transcripcional.

La genómica funcional utiliza la expresión del ARNm para ofrecer una imagen del transcriptoma en una condición específica, con el fin de identificar los genes co-regulados que realizan funciones metabólicas comunes y biosíntesis. Un conjunto de genes co-regulados que se conoce como un regulón.

El análisis de la transcripción y las correspondientes mutaciones han revelado el papel funcional del gen *Rv3676*, un miembro de la adenosina monofosfato cíclico (AMPC) receptor de la proteína de la familia de factores de transcripción. Este factor es necesario para la virulencia de *M. tuberculosis* en el modelo del ratón. El mapa funcional obtenido del transcriptoma reveló información sobre sistemas de regulación. La comparación del tipo silvestre de *M. tuberculosis* H37Rv con la cepa mutante *Rv3676 in vitro*, permitieron la identificación de algunos de los genes que son co-regulados, directa o indirectamente, por *Rv3676* en *M. tuberculosis*⁽⁸³⁾.

4.6.3 Expresión de los genes en *M. tuberculosis*

La capacidad de *M. tuberculosis* para sobrevivir dentro de las células del huésped requiere de una compleja regulación génica perfectamente controlada. Los genes que se utilizan en diferentes condiciones podrían ser fácilmente deducirse de los ARNm correspondiente. Gracias al desarrollo de tecnologías altamente específicas y sensibles, como microarreglos y la PCR en tiempo real cuantitativa (PCR-qRT), ahora es posible analizar la expresión global de ambos, el bacilo y el huésped infectado. En conjunto, todo esto podría ayudarnos a entender los mecanismos de adaptación de *M. tuberculosis*.

La secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis* ha revelado su maquinaria bien equipada, lo que explica su alto grado de adaptabilidad, con sus trece factores sigma (σ) putativos y 192 proteínas que parecen estar involucrados en el control de la expresión génica⁽⁷⁶⁾. Los factores σ Intercambiables regulan la función de la RNA polimerasa, iniciando la transcripción y confiriendo especificidad promotora para la holoenzima^(84,85).

La expresión de los productos del gen regulador en las diferentes etapas del ciclo vital de *M. tuberculosis* es determinante para la infección exitosa del patógeno y la persistencia en el huésped humano. En los últimos años, varios informes han relacionado la respuesta de varios

de estos reguladores transcripcionales a una variedad de estreses ambientales, como el choque térmico, la hipoxia, el hierro o el hambre de zinc, óxido nítrico, tensión superficial y el estrés oxidativo⁽⁸⁶⁻⁸⁹⁾. Sin embargo, las señales biológicas que estimulan la expresión de la mayoría de ellos son poco conocidas. Del mismo modo, las conexiones entre los diferentes circuitos de reglamentación de la compleja red que controla la expresión génica en *M. tuberculosis* no están completamente establecidas. Uno de estos sistemas, *dosRS*, es inducido en hipoxia. Este regulón es responsable del cambio transcripcional, ya que estimula la entrada al estado latente durante la limitación de oxígeno⁽⁹¹⁾. Un análisis reciente ha demostrado que la expresión de genes de *M. tuberculosis* como *whiB* se modifica en respuesta a los agentes antimicobacterianos y las condiciones ambientales de estrés⁽⁹⁰⁾.

Aunque la función de muchos de estos reguladores transcripcionales de las micobacterias y los sistemas de transducción de señal esta poco definida, estudios recientes han comenzado a proporcionar pruebas de la función biológica de estos circuitos en cada etapa del ciclo de vida de *M. tuberculosis* dentro del huésped humano. La expresión de *sigA*, *sigE* y *ysigG*^(86, 92, 93), de algunos sistemas de dos componentes⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾, así como la del regulador transcripcional *whiB3* se inducen cuando el bacilo esta en los macrófagos. El papel de estos reguladores de la transcripción en la patogénesis y la virulencia se hizo aún más evidente en los experimentos en modelos animales, donde se muestra la interrupción o supresión de estos genes para afectar la virulencia de *M. tuberculosis* en ratones^(86, 96).

4.6.4 Proteómica de *M. tuberculosis*

El estudio global de las proteínas que se traducen en un determinado estado fisiológico es uno de los objetivos más importantes y ambiciosos en la investigación de *M. tuberculosis*. El proteoma de un organismo implica no sólo un inventario de los productos de sus genes, sino también la tasa de transducción y los acontecimientos postranscripcionales que ocurren en el organismo⁽⁹⁷⁾.

Gracias a los recientes avances tecnológicos, ahora se puede obtener el perfil de proteínas subcelulares de *M. tuberculosis*. El análisis global de las proteínas en compartimientos aporta información sobre las interacciones huésped-patógeno, vías metabólicas y comunicación celular, además muchas de las proteínas segregadas por la bacteria están involucradas en la virulencia⁽⁹⁸⁾.

Hasta 2004, sólo unas 400 proteínas se habían identificado en el proteoma de *M. tuberculosis* por métodos convencionales. El número de proteínas identificadas aumentó a 1.044 proteínas, 67% más que los obtenidos por los métodos convencionales. Este estudio identificó las proteínas en diversos rangos de pI extremos, entre ellos las proteínas más ácidas (PE_PGRS, Rv3512) con un pI de 3.89 y la mayoría de las proteínas básicas (RPS2, una proteína ribosomal 30S) con un pI de 12,18. Las proteínas de alta masa molecular, como la policétido sintasa (PPSC) con 230.621 Da. Un total de 705 proteínas fueron identificadas en la membrana, 306 se localizaron en la pared celular, y 356 en la fracción citosol⁽⁹⁹⁾.

Existen varias técnicas para la identificación de proteínas pero, curiosamente, ninguna de estas técnicas permite la identificación de proteínas en las siguientes subclases: división celular, elementos IS, secuencias repetidas, los fagos, familias de las PE / PPE, las enzimas del citocromo P450, ciclasas y quelatasas.

4.7 Drogas Antituberculosas e interacción

4.7.1 Resumen e historia del esquema de tratamiento

La historia de la tuberculosis (TB) cambió radicalmente después de la introducción de agentes de lucha contra la *Micobacteria*. El tratamiento farmacológico es fundamental para controlar la tuberculosis, promover la curación de los pacientes y romper la cadena de transmisión, cuando el régimen de medicamentos antituberculosos es completo y se sigue correctamente.

El tratamiento antituberculoso con drogas se inició en 1944, cuando la estreptomicina (SM) y el ácido paraaminosalicílico (PAS) fueron descubiertos. En 1950, el primer ensayo se realizó comparando la eficacia de la SM y el PAS, tanto en monoterapia o combinado. El estudio demostró que la terapia combinada fue más efectiva y dio como resultado el tratamiento de múltiples fármacos antituberculosos, que consistía en un largo tratamiento con ambos fármacos. En 1952, un tercer fármaco, la isoniacida (INH), se añadió a la mezcla anterior, mejorando en gran medida la eficacia del tratamiento, pero que aún tenían que ser administrados durante 18-24 meses. En 1960, etambutol (EMB) sustituyó el PAS, y el curso del tratamiento se redujo a 18 meses. En los años 70, con la introducción de la rifampicina (RIF) en la combinación, el tratamiento se redujo a tan sólo nueve meses. Finalmente, en 1980, la pirazinamida (PZA) se introdujo en el tratamiento antituberculoso, reduciéndolo aún más a tan sólo seis meses⁽¹⁰⁰⁾.

La terapia farmacológica combinada se hizo efectiva por la co-existencia de diferentes poblaciones de bacilos en un paciente con tuberculosis⁽¹⁰¹⁾. Además, poco después de la introducción de los primeros fármacos contra la *Micobacteria* comenzaron a emerger bacilos resistentes, pero la terapia de combinación con nuevos fármacos más eficaces parecía ser suficiente para controlar la enfermedad.

Sin embargo, la tuberculosis inesperadamente resurgió en los años 80, y en los años siguientes se produjo un aumento importante en la incidencia de la poli-, múltiple, y amplia droga-resistencia.

4.7.2 Estructura, Mecanismos de acción, de los principales antituberculosos

El régimen de medicamento a seguir depende de factores tales como: localización de la enfermedad, severidad, resultado de la baciloscopia, co-infección con VIH, prevalencia de resistencia a los medicamentos, disponibilidad de medicamentos, costo del tratamiento y supervisión para el cumplimiento del tratamiento.

La OMS ha establecido cuatro categorías de diagnóstico de TB, asumiendo una perspectiva de salud pública donde la máxima prioridad de los programas nacionales contra la tuberculosis es identificar y curar a los pacientes con esputo de TB pulmonar con baciloscopia positiva, es decir, pacientes con tuberculosis infecciosa⁽¹⁰²⁾.

- Ø Categoría I (pacientes de alta prioridad) incluye a nuevos pacientes con baciloscopia positiva, los nuevos pacientes pulmonares con baciloscopia negativa de tuberculosis con afectación parenquimatosa extensa, los pacientes con VIH concomitante y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), o las formas graves de tuberculosis extrapulmonar.

- Ø Categoría II están los pacientes con una menor prioridad para el tratamiento, por el fracaso del tratamiento o por defecto.
- Ø Categoría III incluye nuevos pacientes de TB pulmonar con baciloscopia negativa que no sean de la categoría I y las formas menos graves de tuberculosis extrapulmonar.
- Ø Categoría IV pacientes con tuberculosis crónica con esputo positivo después de re-tratamiento y en los que se demuestre o se sospeche la MDR-TB. El régimen de tratamiento preferente es opcional para cada categoría, según lo recomendado por la OMS.

Cuando se desarrolla resistencia a los medicamentos, los pacientes deben ser tratados con una nueva combinación que contenga al menos tres fármacos que nunca recibieron antes o que no presenten resistencia cruzada con aquellos a los que se sospecha de resistencia. En estas condiciones, el tratamiento es más largo, más tóxico, más costoso y menos eficaz que los regímenes que contienen fármacos de primera línea, y debe ser observada directamente.

La quimiopprofilaxis de la tuberculosis está indicado para pacientes asintomáticos que dieron positivo a la prueba de la tuberculina (TST), pero que no presenten la enfermedad activa (infección de la TB latente), especialmente cuando están en riesgo de desarrollar la enfermedad (por ejemplo, pacientes VIH) ^(103, 104). Esto es para prevenir la aparición de la tuberculosis. La profilaxis es más frecuentemente realizada con la administración de INH, a dosis de 300 mg al día de seis a nueve meses (aunque existe el riesgo de desarrollar resistencia a INH).

Cuando se sospecha de resistencia a INH se puede administrar otro régimen con RIF, PZA o EMB, aunque hay mayor probabilidad de tener efectos adversos. En la profilaxis de la tuberculosis puede incluirse simultáneamente RIF e IHN, reduciendo el tratamiento a 3 meses.

Es importante asegurar la adherencia del paciente al tratamiento antituberculoso con el fin de lograr la eliminación completa de los bacilos, evitar la recaída, y también evitar la aparición de resistencia a los medicamentos. Por esta razón, el tratamiento antituberculoso tiene que ser supervisado. Tanto la adherencia del paciente y la supervisión son a menudo difíciles de manejar cuando el tratamiento antituberculoso tiene que ser administrado sobre una base diaria. Los tratamientos alternativos sobre la base de una administración intermitente de medicamentos (tres veces, dos veces y una sola vez por semana) facilitan la adherencia del paciente y la supervisión del tratamiento. El tratamiento intermitente es posible gracias a que los medicamentos antituberculosos tienen un marcado efecto post-antibiótico. Después de que el bacilo de la tuberculosis ha sido expuesto a las drogas, hay un período de latencia (hasta varios días) durante el cual su crecimiento se ve interrumpido incluso después de que la concentración de la droga ha caído a niveles sub-inhibidores. Por lo tanto, no hay necesidad de mantener una concentración constante de drogas inhibitorias para matar a los bacilos o impedir el crecimiento.

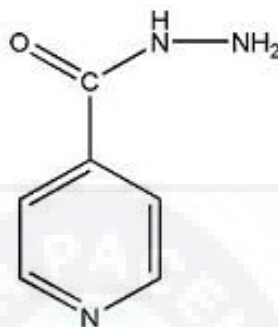
4.7.2.1 Isoniacida (INH)

Estructura y propiedades generales

La INH (hidrazida del ácido isonicotínico; $C_8H_7N_3O$ ^(Figura 7), PM: 137,1) es una pro-droga, la cual es activada por la catalasa-peroxidasa bacteriana. Una vez activada, inhibe la biosíntesis de los ácidos micólicos, que son componentes esenciales de la pared celular de las micobacterias. Esta droga es bactericida para los bacilos metabólicamente activos, y bacteriostático para los bacilos en fase estacionaria. INH es activo frente a *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. kansasii*. Las

cepas susceptibles de *M. tuberculosis* muestran concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) de 0,02 – 0,2 mg/L.

Figura 7: Estructura de Isoniacida



Farmacocinética

INH se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal (la absorción disminuye con los alimentos) o por inyecciones intramusculares. Las concentraciones máximas de 8.3 mg / L aparecen en la sangre entre 1-2 horas después de la ingestión de 300 mg de INH. Se difunde en todos los tejidos corporales, incluyendo el líquido cefalorraquídeo. La semivida plasmática oscila entre 1 a 6 horas. INH se metaboliza en el hígado y el intestino delgado: en primer lugar, INH es acetilada por una N-acetiltransferasa produciendo una acetilisoniacida (N-acetil-INH); este producto se hidroliza a ácido isonicotínico y monoacetilhidrazina, y el último compuesto es más acetilado a diacetilhidrazina. Ninguno de estos metabolitos derivados del INH tiene ninguna actividad antituberculosa. Dentro de la población, hay dos grupos de pacientes, dependiendo de si INH es acetilada lenta o rápidamente, una característica que está determinada genéticamente. Las concentraciones plasmáticas INH son más bajas en acetiladores rápidos que en acetiladores lentos, aunque esta diferencia no afecta a la eficacia del tratamiento. INH y sus metabolitos se excretan en la orina⁽¹⁰⁶⁾.

Toxicidad

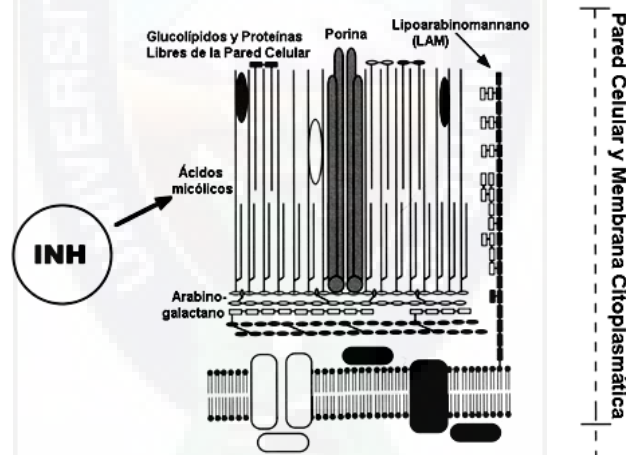
La INH a dosis recomendadas es bien tolerada, aunque en acetiladores lentos concentraciones altas de INH se pueden acumular y luego tienen un mayor riesgo de desarrollar efectos adversos. Entre el 10–20% de los pacientes pueden desarrollar aumentos transitorios de las enzimas hepáticas en el inicio del tratamiento, y a veces desarrollan daño hepático. En estos casos, la administración de INH debe suspenderse. La función hepática debe controlarse antes y durante el tratamiento, especialmente en aquellos pacientes con antecedentes de disfunción hepática o renal, en los que para evitar mayor daño las dosis de INH deben reducirse. Los efectos adversos a nivel neurológico o hematológico son menos frecuentes. Se recomienda una dosis diaria de 10 mg de clorhidrato de piridoxina para reducir la neurotoxicidad y tratar los efectos adversos causados por la INH⁽¹⁰⁰⁾.

Mecanismo de resistencia de *M. tuberculosis*

La Isoniacida es una pro-droga que necesita ser activada en las especies micobacterianas susceptibles a la Isoniacida. Basados en los experimentos *in vitro*, se ha

propuesto que la activación de la Isoniacida produce varias especies altamente reactivas que son capaces de oxidar o acilar a los grupos funcionales de las proteínas. Poco después de que la Isoniacida fue introducida, se observó que los aislamientos clínicos resistentes a la Isoniacida frecuentemente perdían su actividad catalasa y peroxidasa. Se probó la asociación de esta enzima con la activación de la Isoniacida, cuando el gen micobacteriano primario de la catalasa-peroxidasa (*katG*) fue clonado y secuenciado. Ese estudio y otros revelaron que las mutaciones en este gen se encuentran en el 42-58% de los aislamientos clínicos resistentes a la Isoniacida. Así, hasta ahora se ha descrito un gran número de diferentes mutaciones; sin embargo, a menudo se encuentra la mutación Ser315Thr, presentándose en aproximadamente el 40% de todas las cepas resistentes a la Isoniacida. La mutación Ser315Thr produce una enzima sin la capacidad de activar a la Isoniacida, pero retiene aproximadamente el 50% de su actividad como catalasa-peroxidasa. Así, la catalasa-peroxidasa alterada proporciona una resistencia de alto nivel a la Isoniacida, mientras que retiene un nivel de protección oxidativa el cual es suficiente para permitir al organismo mantener una actividad detoxificante contra los radicales antibacterianos del hospedero. Se han descrito aislamientos que albergan otras mutaciones menos frecuentes en el gen *katG*, los cuales exhiben niveles variables de resistencia a la Isoniacida y de su actividad catalasa-peroxidasa.

FIGURA 8. Sitios de acción previamente demostrados y propuestos para la Isoniacida (INH) en las células de *M. tuberculosis*. La INH inhibe la síntesis de los ácidos micólicos.



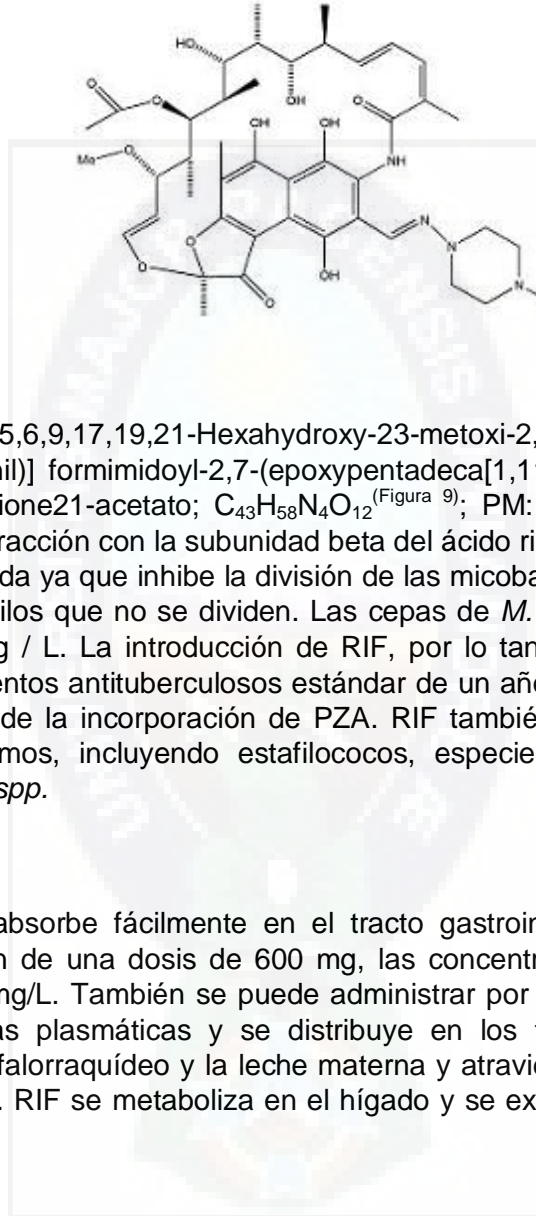
Esta figura es adaptada en parte de Parsons et al.

La Isoniacida bloquea la síntesis de los ácidos micólicos de la pared celular, los mayores componentes de la envoltura de *M. tuberculosis*. Actualmente, se están investigando de manera activa a dos blancos intracelulares para las drogas: la *reductasa de la proteína portadora del ácido graso enoil-acilo* (InhA), y un complejo de una *proteína portadora del acilo* (AcpM) además de una \square -*cetoacil-ACP sintasa* (KasA). Estas enzimas están involucradas en la síntesis de los ácidos micólicos (Figura 8), y se han encontrado mutaciones en las regiones promotoras, o de manera menos común en los genes que codifican a estas proteínas (*inhA*, *acpM*, y *kasA*), en los aislamientos clínicos que exhiben un bajo nivel de resistencia a la Isoniacida ⁽¹⁰⁹⁾.

4.7.2.2 Rifampicina (RIF)

Estructura y propiedades generales

Figura 9: Estructura de Rifampicina



La Rifampicina (5,6,9,17,19,21-Hexahydroxy-23-metoxi-2,4,12,16,18,20,22-heptamethyl-8-[N-(4-metil-1-piperacil)] formimidoyl-2,7-(epoxypentadeca[1,11,13]trienimino)-naphtho [2,1-b furanos]-1, 11 (2H) - dione21-acetato; $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ (Figura 9); PM: 822,9) inhibe la transcripción génica, mediante la interacción con la subunidad beta del ácido ribonucleico (ARN) de la enzima polimerasa. Es bactericida ya que inhibe la división de las micobacterias, y en cierta forma tiene actividad contra los bacilos que no se dividen. Las cepas de *M. tuberculosis* son normalmente susceptibles a 0.1-2 mg / L. La introducción de RIF, por lo tanto, permite la reducción de la duración de los tratamientos antituberculosos estándar de un año y nueve meses, fue reducida a seis meses después de la incorporación de PZA. RIF también es activo contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo estafilococos, especies de *Neisseria*, *Haemophilus influenzae* y *Legionella spp.*

Farmacocinética

Esta droga se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal, dentro de 2-4 horas después de la ingestión de una dosis de 600 mg, las concentraciones plasmáticas máximas pueden alcanzar 7-10 mg/L. También se puede administrar por vía intravenosa. En la sangre, RIF se une a proteínas plasmáticas y se distribuye en los tejidos y líquidos del cuerpo, incluyendo el líquido cefalorraquídeo y la leche materna y atraviesa la placenta. La vida media de RIF es de 2-5 horas. RIF se metaboliza en el hígado y se excreta en la bilis, las heces y la orina⁽¹⁰⁶⁾.

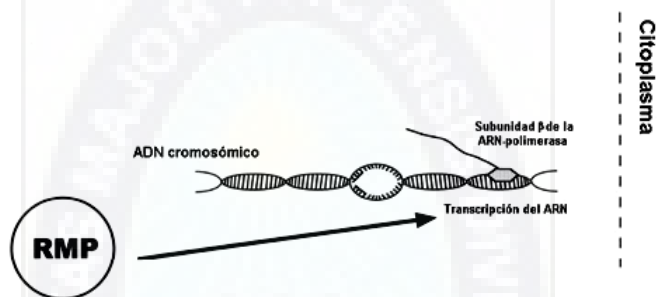
Toxicidad

RIF es bien tolerado, aunque los efectos adversos pueden surgir durante el tratamiento intermitente o al reiniciar un tratamiento interrumpido. Los efectos adversos incluyen diversas alteraciones en el tracto gastrointestinal, piel, riñón y sistema nervioso. También puede producir trombocitopenia. RIF provocará una coloración rojo-anaranjado de los fluidos corporales como orina, lágrimas, saliva, sudor, esputo y heces. Puesto que se metaboliza en el hígado, las funciones hepáticas deben ser controladas antes de comenzar y durante el tratamiento. Un aumento moderado en la fosfatasa alcalina puede ser observado⁽¹⁰⁰⁾.

Mecanismo de resistencia de *M. tuberculosis*

La Rifampicina se encarga de inhibir la transcripción micobacteriana localizando como blanco a la ARN-polimerasa dependiente del ADN (Figura 10). El desarrollo de la resistencia a la Rifampicina se debe a las mutaciones en una región central bien definida de 81 pares de bases (pb) (27 codones) del gen que codifica a la subunidad β de la ARN-polimerasa (*rpoB*). Más de 96% de las cepas resistentes a la Rifampicina contienen una mutación en esta región de 81 pb del gen *rpoB*, facilitando así en forma rápida un acercamiento convencional para detectar la resistencia a la Rifampicina y/o la MDR.

FIGURA 10: Sitios de acción previamente demostrados y propuestos para la Rifampicina (RMP) en las células de *M. tuberculosis*. La RMP inhibe la transcripción uniéndose a la subunidad β de la ARN-polimerasa.



Esta figura es adaptada en parte de Parsons et al.

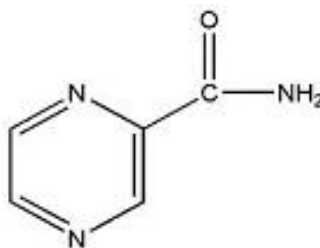
Las mutaciones más comunes (65-86%) alteran al codón 526 o al codón 531, y producen un alto nivel de resistencia a la Rifampicina (concentración inhibitoria mínima [MIC] >32 μ g/ml). Sin embargo, no todas las mutaciones dentro de la región de 81 pb exhiben el mismo nivel de resistencia. Por ejemplo, las alteraciones en los codones 511, 516, 518, y 522 producen organismos que tienen una resistencia de bajo nivel a la Rifampicina y a otra rifamicina derivada (rifapentina), pero los mismos se mantienen susceptibles a otras dos rifamicinas (rifabutina y rifalazina)⁽¹⁰⁹⁾.

4.7.2.3 Pirazinamida (PZA)

Estructura y propiedades generales

La Pirazinamida (amida de ácido pirazinoico, $C_5H_5N_3O$ ^(Figura11); MW: 123.1) PZA es una droga bactericida activa sólo contra *M. tuberculosis*, al no tener actividad in vitro contra otras micobacterias o cualquier otro microorganismo. Las cepas sensibles tienen un CIM de 20 mg/L a pH 5,6. Es activo frente a la persistencia y estado de latencia de los bacilos, incluso contra aquellos que residen dentro de la célula, siendo casi inactiva a pH neutro. La introducción de PZA en los regímenes de tratamiento para la tuberculosis ha permitido la reducción de la duración de tales regímenes a seis meses. PZA es una pro-droga que requiere una conversión a ácido pirazinoico para ser eficaz, esto se hace por micobacterias pirazinamidasa.

Figura 11: Estructura de Pirazinamida



Farmacocinética

PZA se administra oralmente y se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal. Las concentraciones séricas alcanzan un nivel máximo de alrededor de 66 mg/L dos horas después de la administración de una dosis de 3g. Se distribuye en todos los tejidos y fluidos del cuerpo, incluyendo el líquido cefalorraquídeo y la leche materna. La vida media de PZA es de aproximadamente 9-10 horas. PZA se hidroliza en el hígado, se convierte en ácido pirazinoico, el cual es más hidroxilado y finalmente excretado en la orina⁽¹⁰⁶⁾.

Toxicidad

PZA es hepatotóxico de forma dosis-dependiente. Después de una dosis diaria de 3g de PZA, el 15% de los pacientes pueden desarrollar alteraciones del hígado, como aumentos transitorios de las enzimas hepáticas, hepatomegalia, esplenomegalia e ictericia. La hepatitis se ha reportado en menos del 3% de los casos. También puede producir hiperuricemia, lo que lleva a los ataques de gota. Por lo tanto, está contraindicado en pacientes con daño hepático, y es aconsejable hacer pruebas de función hepática antes y periódicamente durante el tratamiento. No se debe administrar a los pacientes con antecedentes de gota o hiperuricemia.

Mecanismo de resistencia de *M. tuberculosis*

La PZA es una droga anti-tuberculosis no convencional y paradójica que tiene una alta actividad esterilizante *in vivo*, pero ninguna actividad contra los bacilos de la tuberculosis bajo las condiciones de cultivo normales cerca a un pH neutral. La PZA sólo es activa contra *M. tuberculosis* a pH ácido (por ejemplo, 5.5). Incluso a un pH ácido, la actividad de la PZA es bastante pobre, con MICs en el rango de 6.25-50 µg/ml. La actividad de la PZA se refuerza bajo oxígeno o bajo condiciones anaerobias y por agentes que comprometen el estado de energía de la membrana, tal como los ácidos débiles, y los inhibidores de energía como la DCCD (diciclohexil-carbo-di-imida), la azida y la rotenona.

La PZA es una pro-droga que requiere la conversión a su forma activa, el ácido pirazinoico (POA), por la enzima pirazinamidasa/nicotinamidasa codificada por el gen *pncA* de *M. tuberculosis* (Figura 12). El POA producido intracelularmente alcanza la superficie celular a través de la difusión pasiva y por una emanación defectuosa. El pH ácido extracelular que facilita la formación del POA protonado y no cargado, que entonces penetra a través de la membrana, causa la acumulación de dicho POA y rompe el potencial de membrana en *M. tuberculosis*. El POA protonado atrae a los protones dentro de la célula y eventualmente podría causar la acidificación del citoplasma y des-energizar a la membrana, colapsando la fuerza motriz protónica que afecta al transporte de membrana.

FIGURA 12: Sitios de acción previamente demostrados y propuestos para la pirazinamida (PZA) en las células de *M. tuberculosis*. La PZA inhibe la síntesis de los precursores de cadena corta para los ácidos grasos.



Esta figura es adaptada en parte de Parsons et al.

Las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la PZA pierden la actividad de pirazinamidasa/nicotinamidasa. Se ha clonado el gen *pncA* de *M. tuberculosis* y se mostró que la actividad defectuosa de pirazinamidasa debidas a las mutaciones en el gen *pncA*, es la mayor causa de resistencia a la PZA⁽¹⁰⁹⁾.

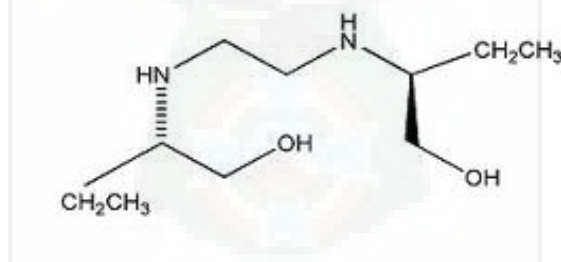
4.7.2.4 Etambutol (EMB)

Estructura y propiedades generales

Etambutol (N,N'-etilenbis (2-aminobutan-1-ol) dihidrocloruro; $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$ ^(Figura 13), PM:277.2). Este medicamento se usa para tratar la tuberculosis y otras infecciones oportunistas causadas por micobacterias no tuberculosas como *M. kansasii*. El CIM de las cepas sensibles de *M. tuberculosis* está en el rango de 0,5-8 mg / L.

EMB sólo es activo contra Micobacterias en división, siendo bacteriostático. Dado que EMB afecta la biosíntesis de la pared celular, se ha sugerido que contribuye a aumentar la susceptibilidad de *M. tuberculosis* a otras drogas.

Figura 13: Estructura de Etambutol



Farmacocinética

EMB se administra oralmente, ya que se absorbe bien en el tracto gastrointestinal, aunque una parte se excreta en las heces. Después de su absorción, se distribuye en la mayoría de los tejidos, se difunde en el líquido cefalorraquídeo, leche materna, y también atraviesa la placenta. Después de una dosis de 25 mg/kg de peso corporal se alcanza una concentración máxima de 5 mg/L en suero después de 4 horas. La vida media es de 3-4 horas. Sólo una fracción de EMB se metaboliza en el hígado, el fármaco inalterado y sus metabolitos se excretan en la orina⁽¹⁰⁶⁾.

Toxicidad

EMB produce neuritis retrobulbar con una reducción de la agudeza visual, constricción del campo visual, escotoma central o periférico, y la ceguera de color verde-rojo⁽¹⁰⁰⁾. Esto puede afectar uno o ambos ojos. La gravedad de estos efectos depende de la dosis y duración del tratamiento. Por lo general, la visión normal se recupera a unas pocas semanas después de finalizar el tratamiento, aunque en algunos casos, esta recuperación no se produce hasta un mes después de terminado el tratamiento. En consecuencia, EMB está contraindicado en pacientes con neuritis óptica, y se debe utilizar con precaución en pacientes con trastornos visuales. Exámenes ópticos son recomendables antes y durante el tratamiento. EMB no se suele administrar a niños menores de seis años de edad debido a la dificultad en el control de la agudeza visual, a menos que se sospeche de resistencia a INH o RIF.

Otros efectos adversos incluyen una reducción de la excreción de ácido úrico (por lo tanto, la producción de gota), trastornos gastrointestinales y reacciones de hipersensibilidad de la piel.

Mecanismo de resistencia de *M. tuberculosis*

El EMB Inhibe la polimerización del arabinano de la pared celular de arabinogalactano y del lipoarabinomano, además que induce la acumulación de D-arabinofuranosil-P-decaprenol, un intermediario en la biosíntesis del arabinano. La arabinosil-transferasa, codificada por el gen *embB*, es una enzima involucrada en la síntesis del arabinogalactano, la cual ha sido propuesta como el blanco del EMB en *M. tuberculosis* y en *M. avium*.

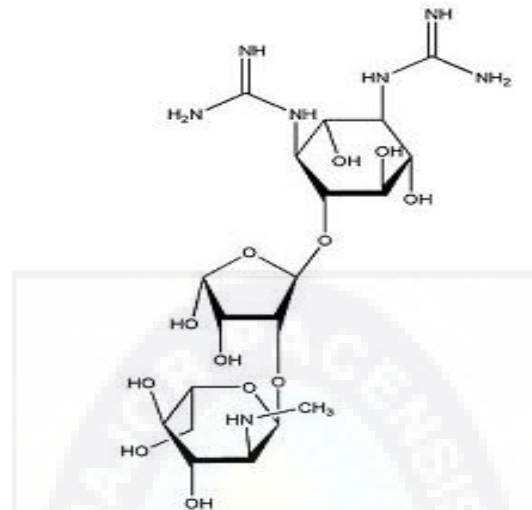
Las mutaciones en el operón de los genes *embCAB*, en particular en el gen *embB*, y de vez en cuando en el gen *embC*, son responsables de la resistencia al EMB. La mutación en el codón 306 del gen *embB* es muy frecuente en los aislamientos clínicos resistente al EMB, contando por el 68% de las cepas resistentes. Se encontró que las mutaciones que conducen a ciertos cambios de aminoácidos, de hecho causan resistencia al EMB, mientras que otras sustituciones de aminoácidos tienen poco efecto en la resistencia al EMB⁽¹¹⁰⁾.

4.7.2.5 Estreptomina (SM)

Estructura y propiedades generales

Estreptomina (O-2-desoxi-2-metilamino- α -L-glucopiranosil-(1-4)-N-N-diamisdino-D-estreptamino; $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ ^(Figura 14); PM: 581.6). SM, un antibiótico producido por algunas cepas de *Streptomyces griseus*, fue el primer fármaco descubierto con actividad antituberculosa. Se utiliza principalmente en el tratamiento de la tuberculosis (la mayoría de cepas de *M. tuberculosis* son susceptibles de 1-8 mg/L de estreptomina). También puede ser utilizado en el tratamiento de otras infecciones bacterianas como las producidas por la bacteria *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* y *Brucella spp.*

Figura 14: Estructura de Estreptomina



Farmacocinética

SM, como la mayoría de los aminoglucósidos, no se absorbe bien en el tracto gastrointestinal, por lo que debe ser administrada por inyección intramuscular. Debido a su toxicidad y la introducción de otros fármacos que pueden administrarse por vía oral para el tratamiento de la tuberculosis, el uso de SM se ha reducido al tratamiento de las infecciones causadas por cepas resistentes a los medicamentos. Dos horas después de una inyección de 1g de SM, los niveles del fármaco en la sangre puede llegar hasta 50 mg/L, donde un tercio de ella circula unido a proteínas plasmáticas. La vida media de SM es de aproximadamente 2,5 horas, la SM y otros aminoglucósidos se difunden en la mayoría de los fluidos extracelulares, quizá con la excepción del líquido cefalorraquídeo. Se difunden con facilidad en la perilinfa del oído interno, provocando efectos ototóxicos. Los aminoglucósidos también tienden a acumularse en tejidos específicos del cuerpo como los riñones. La estreptomina no parece ser metabolizada y se excreta sin cambios por la orina⁽¹⁰⁶⁾.

La ocurrencia de otras enfermedades puede afectar la farmacocinética de SM en cuanto a concentraciones tóxicas se refiere. Por ejemplo, pacientes renales tendrán concentraciones elevadas de SM así como pacientes con ascitis, cirrosis, fallas cardíacas, malnutrición o quemaduras, en estos pacientes las dosis deberán ser reducidas.

Toxicidad

Como la mayoría de los aminoglucósidos, SM tiene efectos ototóxicos, vestibulares que afecta la función auditiva (cóclea), que se manifiestan como mareos y vértigo. Es menos nefrotóxica que otros aminoglucósidos, aunque puede producir insuficiencia renal cuando se administra con otros agentes nefrotóxicos. Es recomendable la evaluación periódica de las funciones auditiva y renal. En caso de efectos adversos graves, SM se puede eliminar mediante hemodiálisis. Parestesia, síntomas neurológicos como neuropatías periféricas, neuritis óptica y escotoma, y reacciones de hipersensibilidad cutánea también se han observado después de las inyecciones de SM.

Mecanismo de resistencia de *M. tuberculosis*

La resistencia a la SM es causada por las mutaciones en la proteína S12 codificada por el gen *rpsL*, y el ARNr 16S codificado por el gen *rrs*. Las mutaciones en los genes *rpsL* y *rrs* son el mayor mecanismo de resistencia a la SM, que responde de manera respectiva a casi el 50% y 20% de las cepas resistentes a la SM. La mutación más común en el gen *rpsL* es una sustitución en el codón 43, de la lisina a arginina, lo que causa la resistencia de alto nivel a la SM. También es común la mutación en el codón 88. Las mutaciones en el gen *rrs* ocurren en los bucles del ARNr 16S y forman racimos en dos regiones alrededor de los nucleótidos 530 y 915. Las cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a la SM pero dependientes de dicha SM, parecen ser originadas por una inserción de 'C' en el bucle 530. Sin embargo, aproximadamente del 20-30% de las cepas de SM con un nivel bajo de resistencia no tienen mutaciones en estos genes *rpsL* o *rrs*, lo cual indica que existen otro u otros mecanismos de resistencia⁽¹¹⁰⁾.

4.8 Tuberculosis Drogo-Resistente

Recientemente la OMS expresó su preocupación por la ocurrencia de aislamientos cepas de *M. tuberculosis* extremadamente resistentes (XDR), al menos a isoniacida (INH), Rifampicina (RIF), a una de las fluoroquinolonas, y uno de los medicamentos inyectables contra la tuberculosis. Estas observaciones alarmantes desencadenan la cuestión de si las cepas resistentes son tan transmisibles como las susceptibles.

El Dr. Mitchison observó que gran parte de los aislados con resistencia a INH revelaban un menor grado de virulencia. Es importante como la resistencia interfiere en la transmisión de la tuberculosis, si, las cepas resistentes se pueden transmitir de manera eficiente o incluso mejor que las sensibles, las tasas globales de resistencia a los medicamentos contra tuberculosis se elevarían de manera sostenida. En una revisión realizada por Cohen *et al.* se describió el efecto de la resistencia a los medicamentos y concluyó que las estimaciones de la aptitud de las cepas de tuberculosis resistentes a medicamentos son bastante heterogéneas y que esta confusión hace que sea difícil de predecir la influencia de la resistencia sobre la tendencia de la epidemia de tuberculosis⁽¹⁰⁵⁾. De hecho características de la bacteria pueden influir en la interferencia resistencia-transmisibilidad, como perfil de susceptibilidad, combinación de mutaciones, y posiblemente mecanismos de reparación del ADN bacteriano. Por otra parte factores no bacterianos pueden influir como el estado inmunológico de los humanos expuestos y régimen de tratamiento^(figura 15). Debido a los factores antes mencionados no se realizaron muchos estudios y no hay conclusiones significativas acerca de la influencia del desarrollo de resistencia sobre la epidemia de tuberculosis en el mundo. Sin embargo, debido a la contribución de estudios de la huella dactilar genética, algunas piezas del rompecabezas se han desentrañado en la última década^(107, 108).

Figura 15: Resistencia a las drogas



Un estudio realizado en los países bajos, en 8332 pacientes de 1993-2002 con perfiles de susceptibilidad y transmisibilidad de los aislados, se estudiaron con la ayuda de la huella dactilar genética ⁽¹⁰⁷⁾. En total, 592 cepas fueron resistentes a INH, de las cuales 323 tenían una mutación en el aminoácido 315 ($\Delta 315$) del gen de la catalasa-peroxidasa (*katG*). El resto de las cepas mostraban otros mecanismos de resistentes a INH; en general las cepas resistentes a INH fueron menos transmisibles (es decir, menos frecuentes en grupos de huellas dactilares de ADN) que la variantes susceptibles. Sin embargo, las cepas con la $\Delta 315$ a menudo eran tan transmisibles como las susceptibles. Además las cepas con $\Delta 315$ tenían un mayor nivel de resistencia a INH y asociación con resistencia a múltiples fármacos ^(107, 108). Esto sugiere que el tipo de mutación genética es un factor importante en el recinto de la bacteria. Por lo tanto, las cepas en particular pueden ser la causa de transmisión de MDR-TB con alta o baja incidencia, a pesar de que las cepas resistentes a INH en general son menos aptas que las susceptibles.

4.9 Métodos de Detección de resistencia a los antituberculosos

La detección temprana de drogo-resistencia en tuberculosis permite empezar con el tratamiento apropiado, lo cual tiene un impacto en el mejor control de la enfermedad.

4.9.1 Métodos fenotípicos convencionales

Tradicionalmente, el cultivo en el medio Lowenstein-Jensen se ha usado para las pruebas de sensibilidad a las drogas (1) el método de concentración absoluta, (2) el método de proporción de resistencia, y (3) el método de proporción. Con los métodos convencionales, se requiere una duración de 6 a 8 semanas antes de que se conozcan los resultados de sensibilidad.

Los métodos radiométricos (por ejemplo, BACTEC-460; de *Becton-Dickinson*; Franklin Lakes, NJ) han sido desarrollados para la prueba rápida de susceptibilidad a las drogas de *M. tuberculosis*, mediante los cuales los resultados están disponibles en 10 días⁽¹¹¹⁾. El sistema

indicador del crecimiento de micobacterias en tubo (de *Becton-Dickinson*) es un método rápido y no radioactivo para la detección y la prueba de susceptibilidad de *M. tuberculosis*⁽¹¹²⁾.

Ensayo de la nitrato reductasa. Es una técnica muy simple basada en la capacidad de *M. tuberculosis* para reducir el nitrato a nitrito. El cual es detectado por la adición de un reactivo al medio de cultivo. *M. tuberculosis* es cultivado en presencia de un antibiótico y en 10 días se mide la capacidad de las bacterias para reducir el nitrato. Las cepas susceptibles pierden la habilidad de reducir el nitrato.

4.9.2 Métodos genotípicos

Los métodos genotípicos para la determinación de resistencia involucran dos pasos básicos: la amplificación de la sección conocida donde se producen alteraciones en cepas resistentes de *M. tuberculosis* mediante PCR y la correlación con la drogo-resistencia^(113, 114).

La reacción en cadena de la ligasa facilita la detección de un mal apareamiento de incluso un nucleótido. El *ensayo de la luciferasa* es un sistema de ensayo con un gen reportero para la determinación rápida de resistencia a las drogas, el cual puede identificar a la mayoría de las cepas en 48 horas. Como se considera que la resistencia a la rifampicina es un marcador sustituto para la MDR-TB, técnicas tales como una *prueba rápida basada en bacteriófagos* (FASTPlaqueTB-RIF; de *Laboratorios Biotec*; Ipswich, R.U.) que se usa para identificar la susceptibilidad a la Rifampicina en cepas clínicas de *M. tuberculosis* después de su crecimiento en un sistema de cultivo líquido semi-automatizado (BACTEC-460; de *Becton-Dickinson*), también ha mostrado el potencial para diagnosticar MDR-TB⁽¹¹²⁾.

Ensayos moleculares, tales como los análisis heterodúplex, la secuenciación de ADN, la PCR en tiempo real, señales moleculares y ensayos con sondas en línea, han sido usados para seleccionar a las mutaciones que son responsables del desarrollo de resistencia a las drogas anti-TB. La PCR múltiple, seguido por una hibridación en un chip de oligonucleótidos, o un ordenamiento de oligonucleótidos de ADN de baja densidad (macrochip), también ha sido utilizada para detectar al ADN del complejo de *M. tuberculosis* y para identificar a las mutaciones asociadas con la resistencia a la isoniacida y a la Rifampicina⁽¹¹²⁾.

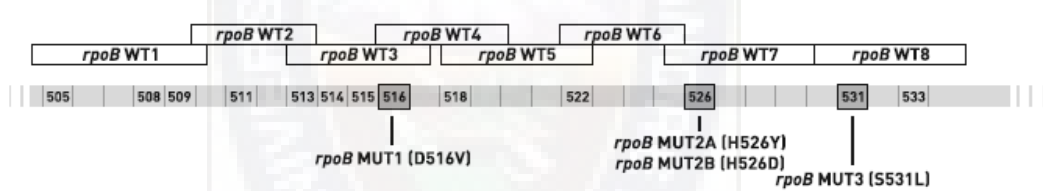
La secuenciación basada en PCR ha sido empleada a menudo para entender los mecanismos genéticos de resistencia a las drogas en los pacientes con *M. tuberculosis*. Los patrones de los RFLP se han usado para categorizar y comparar los aislamientos de *M. tuberculosis*. Ya que se ha observado que las *huellas dactilares* (fingerprints) del ADN de *M. tuberculosis* no cambian durante el desarrollo de la resistencia a las drogas, el análisis de los RFLP también ha sido usado para rastrear la propagación de las cepas que son resistentes a las drogas. Para estudiar la epidemiología molecular de *M. tuberculosis*, se han usado marcadores moleculares para los estudios epidemiológicos y evolutivos tales como las *unidades de repetición micobacteriana esparcida-repeticiones en tándem de números variables, polimorfismos fluorescentes con la longitud de un fragmento amplificado*. La *espoligotipificación*, la cual está basada en la variabilidad del locus directo-repetido de *M. tuberculosis*, ha sido útil para detectar nuevas erupciones así como para el rastreo de epidemias de TB⁽¹¹²⁾.

4.10 Método de genotipificación basado en sondas de hibridación

El ensayo con sondas para hibridación que aplicamos en el presente estudio permite la identificación mediante genética molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina y/o isoniazida, desde cultivo o material del paciente procedente de muestras pulmonares con baciloscopia positiva. Una sonda es complementaria con una región

específica para el CMTB del gen del ARNr 23S (Tub), una sonda específica para el gen *rpoB* (*rpoB*-Uni) y siempre debe ser positiva para todas las cepas del CMTB, mientras que 8 sondas del tipo salvaje (WT, WT1 a WT8) abarcan la región del gen *rpoB*^(Figura 16) que codifica a los aminoácidos 509 a 534. Otras 4 sondas son específicas para las mutaciones más comunes: D516V, H526Y, H526D, y S531L (sondas *rpoB* MUT D516V, *rpoB* MUT H526Y, *rpoB* MUT H526D, y *rpoB* MUT S531L, respectivamente)⁽¹¹⁵⁾. La identificación de la resistencia a rifampicina es posible gracias a la detección de las mutaciones más significativas del gen *rpoB* (que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa). Una sonda detecta a una región específica del gen *katG* y siempre debe ser positiva para todas las cepas del MTBC. Otras 3 sondas son específicas para la región S315 del gen *katG*. Una es la sonda del tipo salvaje (*katG* WT), mientras que otras 2 (*katG* MUT1 y MUT2) están diseñadas para detectar a las mutaciones AGC-a-ACC (S315T1) y AGC-a-ACA (S315T2)⁽¹¹⁵⁾. Para testar la resistencia a isoniazida de alto nivel es examinado el gen *katG* (que codifica para la catalasa peroxidasa), y para testar la isoniazida de bajo nivel, es examinada la región del promotor del gen *inhA* (que codifica para la NADH enoil ACP reductasa), Una sonda detecta a una región específica del gen *inhA* siempre debe ser positiva para todas las cepas del MTBC. Otras 4 sondas son específicas para la región S315 del gen *katG*. dos sondas del tipo salvaje (*inhA* WT1,2), mientras que otras 4 (*inhA* MUT1 – MUT4) están diseñadas para detectar a las mutaciones (C15T, A16G, T8C,T8A).

Figura 16: Localización de las sondas dentro de la región de 81pb del gen *rpoB*, determinante de resistencia a la Rifampicina.



(Fuente. Manual GenoType MTBDRplus)

Este sistema es rápido en cuanto a su aplicación, e interpretación. Además que no solo detecta la presencia del bacilo sino que identifica la resistencia a los principales fármacos de primera línea como son la rifampicina e isoniacida. Aunque como en cualquier análisis basado en ADN, este test solamente analiza la secuencia de ácidos nucleídos y no la de aminoácidos. Es posible por tanto que mutaciones que no causan un cambio de aminoácido (mutaciones silenciosas) podrían producir la ausencia de una de las sondas wild type.

Aun así en muchos países de Europa este método de detección fue aprobado debido a que el proceso del test de sensibilidad a las drogas (DTS) para obtener el fenotipo consume mucho tiempo ya que se requiere cultivar a la bacteria, dicho cultivo demora más de dos meses, y a pesar de no tener los resultados del DTS, el paciente es tratado con las drogas anti-TB estándar de primera línea, debido a ello y para el control de la drogo-resistencia el modelo MDR-TB debería estar disponible como guía terapéutica de los pacientes. El diagnóstico rápido de MDR-TB permitirá el comienzo temprano del tratamiento con fármacos de segunda línea estándar de primera línea, debido a ello y para el control de la drogo-resistencia el modelo MDR-TB debería estar disponible como guía terapéutica de los pacientes. El diagnóstico rápido para los pacientes con cepas MDR-TB y así disminuir el riesgo de fracaso terapéutico, recaída, proliferación de la DR, diseminación de las cepas MDR-TB y el incremento de la tasa de mortalidad.

5 HIPÓTESIS

La genotipificación es un método práctico y aplicable para ser introducido en nuestro país, como apoyo a los métodos convencionales utilizados por el Programa Nacional de Tuberculosis.

6 DISEÑO METODOLÓGICO

El diseño aplicado a este estudio es Test Diagnóstico

6.1 **Fundamento del diseño**

Establecer un diagnóstico es un proceso imperfecto cuyo resultado es una probabilidad más que una certeza. Si consideramos que cuando un diagnóstico particular se descarta o excluye, la probabilidad de esa enfermedad se aproxima a cero. Por otro lado cuando un diagnóstico cualquiera se confirma, la probabilidad de esa enfermedad se aproxima a cien por ciento. Entonces toda información clínica está sujeta a error. El contabilizar los diversos errores que pueden surgir en los estudios para diagnóstico permite al operador seleccionar las pruebas e interpretar los resultados de manera apropiada.

Un tipo de error se designa como **FALSO NEGATIVO**, debido a que el estudio no detecta una enfermedad cuando está presente. Se dice que una prueba es **SENSIBLE** cuando el porcentaje de falsos negativos es bajo.

Un segundo tipo de error se menciona como un **FALSO POSITIVO**, debido a que la prueba indica la presencia de una enfermedad que en realidad no existe. Un estudio de laboratorio con un porcentaje bajo de resultados falsos positivos se conoce como **ESPECÍFICO**.

Es así que la sensibilidad y especificidad son características fundamentales de las pruebas de diagnóstico. Por otro lado, es útil considerar otras medidas, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, que se emplean para interpretar los resultados de una prueba de laboratorio para diagnóstico. El valor predictivo positivo permite estimar cuanta es la probabilidad de que la enfermedad de interés esté presente si la prueba es positiva; por otro lado el valor predictivo negativo es la probabilidad de que la enfermedad esté ausente si la prueba es negativa.

Para el presente trabajo se escogió un test diagnóstico que nos permitió evaluar los parámetros descritos anteriormente.

Se procedió al cálculo de la sensibilidad y especificidad en base al paquete informático Epi-Info EPI-INFO versión 6.0 tomando en cuenta los siguientes datos: Intervalo de confianza estimado 95%, por tanto se acepta un error tipo 1 del 5%; además de los valores predictivos positivos y negativos. Se tomó como patrón de oro (gold standard) la caracterización fenotípica por los métodos de cultivo para determinar si una cepa pertenece o no al complejo MTB, y el método de las proporciones Cannetti Rits para determinar los perfiles de susceptibilidad a drogas.

El total de muestra estuvo constituida por 137 cepas de las cuales 52 eran MDR, 14 monoresistentes a Rifampicina y 31 monoresistentes a Isoniacida; las restantes 40 cepas presentaron resistencia a otros antibióticos o eran pansusceptibles (Tabla 7.1).

6.2 Población y muestra para el estudio

Las cepas para este estudio fueron enviadas al laboratorio a partir del segundo semestre del 2008 por el Laboratorio de Referencia Nacional de Diagnóstico de Tuberculosis (INLASA) de la ciudad de La Paz, provenientes de 7 regiones de Bolivia (La Paz, Santa Cruz, Cochabamba, Potosí, Tarija, Chuquisaca y Yacuiba), consistentes en colonias con perfil de resistencia fenotípico previamente caracterizado, por los métodos fenotípicos Nitratasa y Cannetti Rist. El estudio molecular de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica Molecular del Instituto de Investigación de Farmacia y Bioquímica (IIFB) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.

Cabe resaltar que a diferencia de otras bacterias, en los únicos casos en los que se realiza el test de susceptibilidad tanto fenotípico como genotípico son en muestras provenientes de pacientes con: fracaso terapéutico, recaída, abandono de tratamiento, caso contacto.

6.3 Tamaño muestral

La obtención del tamaño de muestra se realizó en la base de datos EPI-INFO versión 6.0 tomando en cuenta los siguientes datos:

- Intervalo de confianza estimado 95%, por tanto se acepta un error tipo 1 del 5%
- Potencia estimada de la prueba del 80%

Teniendo como resultado del análisis:

Tamaño muestral: 137

Cepas control: 40

Cepas previamente caracterizadas con resultado fenotípico de resistencia a Isoniacida y/o Rifampicina: 97

6.4 Definición de cepas

Se considera como cepas válidas para este estudio, todas las cepas, derivadas del INLASA que hayan presentado un perfil fenotípico de resistencia a Rifampicina y/o Isoniacida.

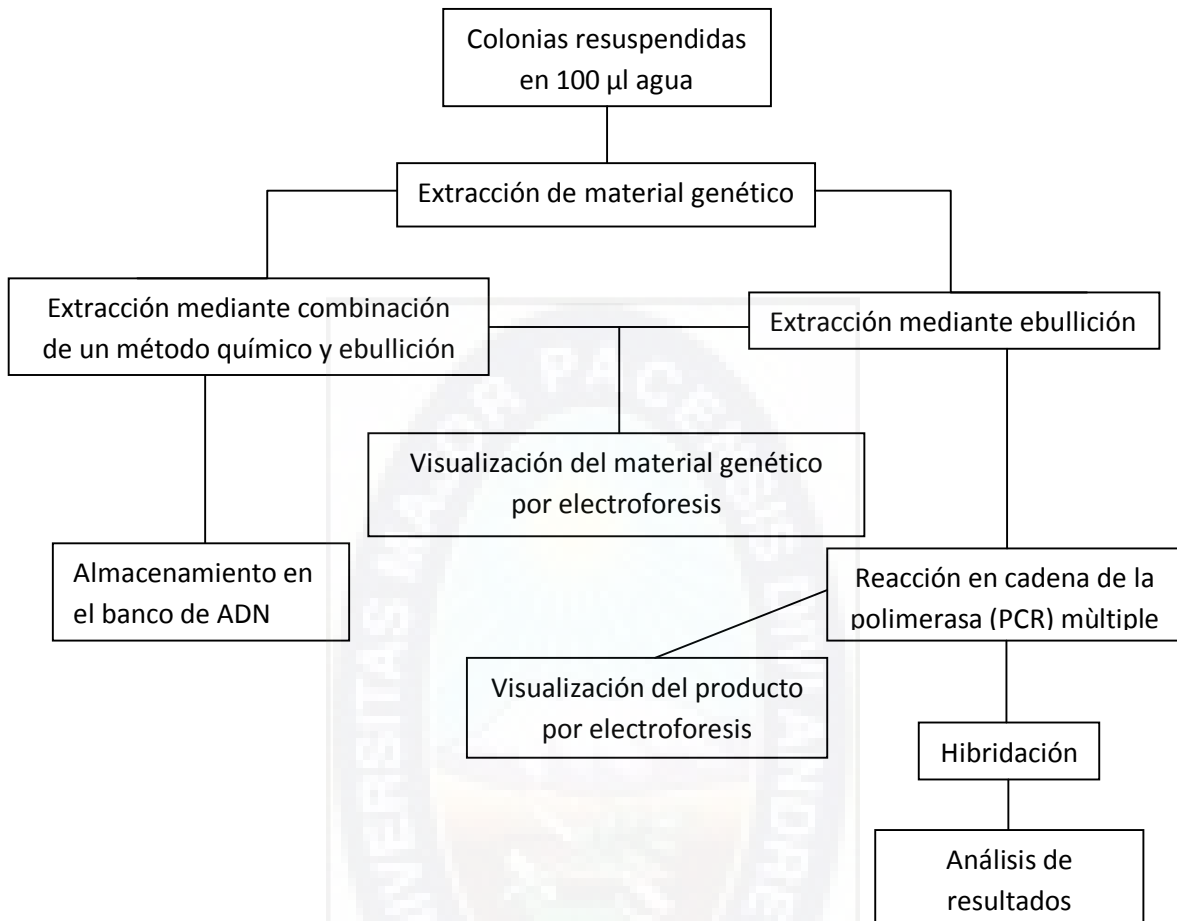
6.5 Definición de controles

Los controles fueron cepas pansusceptibles y cepas mono o poliresistentes a antituberculosos distintos a Rifampicina e Isoniacida, derivados también de INLASA.

6.6 Toma de datos

Los datos generales de las cepas derivadas del INLASA fueron anotados según formulario (ver anexo), y los datos de resistencia según métodos fenotípicos, después de obtener los resultados moleculares de las cepas, para su posterior comparación.

6.7 Procesamiento de las muestras



6.7.1 Genotipificación mediante el kit GenoType MTBDRplus hain lifescience

Este kit está basado en la tecnología **DNA*STRIP** y permite la identificación mediante genética molecular del complejo *Micobacterium tuberculosis* y su resistencia a Rifampicina y/o Isoniacida, en este caso proveniente de cepas bacterianas, el procedimiento completo se divide en tres pasos: aislamiento de ADN proveniente de cultivo, amplificación multiplex de cinco genes con longitudes aproximadas de: 63pb (control de amplificación), 115pb (complejo *M. tuberculosis*), 166pb (*rpoB*), 120pb (*katG*), 110pb (*inhA*), y una hibridación reversa, pasos que se detallan a continuación.

6.7.2 Aislamiento de ADN proveniente de bacterias en cultivo

Aislamiento mediante ebullición

- A 50µL de cultivo se le añadió 100µL de agua ultra pura y se mezcló
- Se incubó durante 20min a 95°C
- Se centrifugó 5min a 14000 XG

- Se recuperó el sobre-nadante el cual fue usado en el PCR

Aislamiento mediante combinación de método químico y ebullición

Se la realizó mediante el protocolo modificado de purificación de material genético bacteriano wizard genomic DNA purification kit de PROMEGA.

Visualización del material genético por electroforesis

Para la detección del material genético extraído, se corrieron 5 μ L de producto, con 2 μ L de tampón de cargado, en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X, para la visualización de los productos se utilizó enviro-safe.

La electroforesis se realizó a 100 voltios durante 20 minutos, para posteriormente visualizar los productos en la lámpara de luz UV.

La comparación de producto obtenido se realizó con un control interno laboratorio.

6.7.3 Amplificación de ADN por PCR múltiplex

35 μ L de PNM (primer nucleotido mix), 5 μ L de tampón 10X, la concentración de cloruro de magnesio puede variar entre 1.5 y 2.5 mM, 1U de ADN polimerasa termoestable, μ L de agua suficiente para obtener un volumen de 45 μ L. Añadir 5 μ L de solución de ADN para obtener un volumen final de 50 μ L. La amplificación se realizó en un termociclador (TERMO PXE 0.2 Applied Biosystems), utilizando el siguiente programa: 10 ciclos de primera amplificación cada uno con 95°C 30seg; 58°C 2min; y 20 ciclos de segunda amplificación cada uno con 95°C 25seg; 53°C 40seg; 70°C 40seg, y 70°C 8min, finalmente se enfrían los productos a 4°C.

Visualización del producto por electroforesis

Para la detección de los fragmentos amplificados, se corrieron 5 μ L de PCR, con 2 μ L de buffer de siembra, en el gel de agarosa al 1,2% en TBE 0,5X, para la tinción de los productos se utilizó enviro-safe.

La electroforesis se realizó a 100 voltios durante 20 minutos, para posteriormente visualizar los productos en la lámpara de luz UV.

La comparación de producto obtenido se realizó con un control interno del laboratorio.

Hibridación

La hibridación incluye los siguientes pasos: desnaturalización química del producto a amplificar. Hibridación de amplicones en una sola cadena marcados con biotina unidos a una membrana, lavado astringente adición de conjugado de fosfatasa alcalina/estreptavidina (AP), y una reacción de tinción mediada por AP. Una plantilla asegura la interpretación sencilla y rápida del esquema de bandas obtenido.

Las tiras de hibridación presentaran bandas patrones que identifican a las cepas MDR-TB o las cepa no mutadas (Wild type), cada tira tiene un total de 27 zonas de reacción (fig). La identificación de la resistencia a la rifampicina es activada por la detección de las mutaciones más importantes del gen *rpoB* (que codifica para la subunidad β -de la polimerasa de ARN). Para la prueba de resistencia a alto nivel a la isoniazida, el gen *katG* (que codifica la catalasa) y se efectuarán las pruebas para el bajo nivel de resistencia a la isoniazida, la región promotora del gen *inhA* (que codifica la reductasa NADH enoil ACP) se analiza.

6.7.4 Análisis de Resultados

El análisis para obtener de resultados estuvo enfocado, a la validación de un sistema comercial para esto evaluamos la sensibilidad y especificidad así como el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo del test.



7 RESULTADOS

Fueron incluidas en este estudio un total de 138 cepas de *Micobacterium tuberculosis*; 97 cepas drogo-resistentes (52 MDR, 14 mono-resistentes a Rifampicina (RIF) y 31 mono-resistentes a Isoniacida (INH), 41 cepas sensible, de las cuales 27 fueron pansusceptibles, y las restantes 14 fueron sensibles solo a RIF e INH (resistentes a SM, EMB o PZ), todas caracterizadas previamente por el método de las proporciones o Canneti-Rist en el Laboratorio de Referencia de la Red Nacional de Control de Tuberculosis (INLASA). (Tabla 3)

TABLA 7.1: Perfil de resistencia de cepas de *Micobacterium tuberculosis* fenotipificadas en el Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA), La Paz-Bolivia durante los años 2008-2009.

Tipo de resistencia	Perfil de resistencia (método proporciones)	Nº de cepas (%)
MDR	INH, RIF	18 (13.14)
	INH, RIF, SM	20 (14.59)
	INH, RIF, EMB	3 (2.20)
	INH, RIF, SM, EMB	11 (8.03)
Mono-resistentes	RIF	12 (8.75)
	INH	19 (13.87)
Poli-resistentes	RIF, SM	1 (0.73)
	RIF, SM, PR	1 (0.73)
	INH, SM	7 (6.57)
	INH, SM, EMB	1 (0.73)
	INH, SM, PR	4 (2.20)
Sensibles	Sensibles a INH y RIF	14 (8.75)
Pansusceptibles		27 (18.98)

INH: Isoniacida, RIF: Rifampicina, SM: Estreptomicina, EMB: Etambutol, PZ: Pirazinamida

Las cepas fueron recolectadas desde 7 regiones del país: La Paz (27), Cochabamba (34), Santa Cruz (55), Sucre (7), Potosí (2), Tarija (11) y Yacuiba (2).

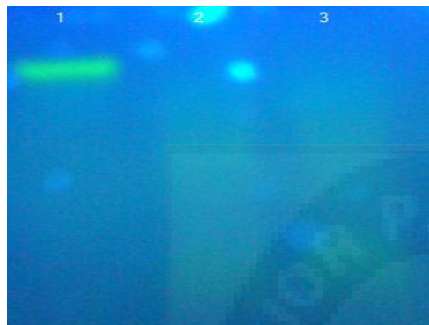
Las cepas analizadas en el presente estudio tomaron en cuenta datos según formulario (anexo), los datos registrados más importantes y útiles para este estudio incluyeron: procedencia, condición clínica del paciente y el perfil de resistencia fenotípico para el análisis posterior de resultados. La genotipificación de las mismas se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica Molecular del Instituto de Investigación de Farmacia y Bioquímica (IIFB) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.

Obtención de material genético

Para realizar un correcto análisis de genotipificación el primer paso indispensable fue la estandarización y optimización de un método que permita obtener material genético de alta calidad analizable, es así que en este estudio se procedió a probar métodos físicos y químicos de extracción. El resultado fue la optimización de un método comercial en combinación con el

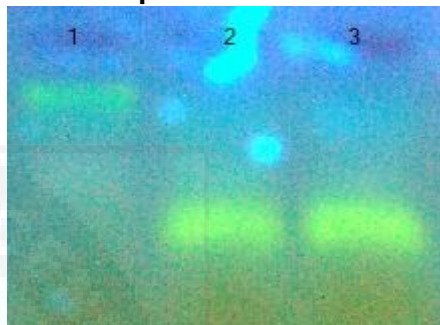
método de ebullición, mediante el cual se obtuvo material genético de las características ya mencionadas. Los productos obtenidos por ebullición y el método optimizado se observan en las figuras 7.1A y 7.1B respectivamente.

Figura 7.1A: Extracción por Ebullición



Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y 15min de corrida 1) control de corrida (pool de ADN) 2) ADN de cultivo extraído un par de semanas antes 3) ADN de cultivo de *M. tuberculosis* extraído el mismo día.

Figura 7.1B: Extracción por Método Optimizado



Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y 15min de corrida 1) control de corrida (pool de ADN) 2) ADN de cultivo extraído un par de semanas antes 3) ADN de cultivo de *M. tuberculosis* extraído el mismo día.

Estandarización de protocolos

El análisis y obtención de resultados de los restantes objetivos específicos estuvo enfocado, a la aplicación del kit Genotype MTBDR $plus$, a fin de evaluar el funcionamiento correcto del test y la funcionalidad de los reactivos, se ensayaron con cepas control tanto resistentes como sensibles. Comprobando cinco zonas de control en cada tira:

- ✓ Una zona de control de conjugado, para comprobar la unión del conjugado a la banda y una reacción cromogénica correcta.
- ✓ Una zona de control de amplificación para comprobar la amplificación correcta de la reacción.
- ✓ Tres zonas de control (*rpoB*, *katG* e *inhA*) para comprobar la sensibilidad óptima de la reacción de cada loci testado.

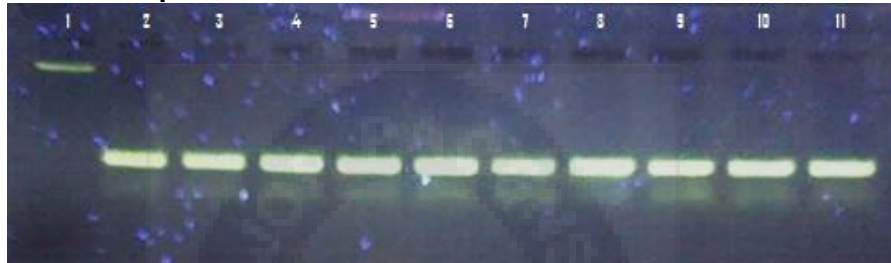
Una vez comprobado el funcionamiento óptimo de todos los reactivos se procedió al procesamiento del material genético obtenido de las cepas según orden de llegada de las mismas al laboratorio.

En el total de las cepas estudiadas se obtuvieron amplificaciones por PCR-multiplex con éxito, y los amplicones producidos en cada cepa fueron los cinco mencionados en el acápite de metodología (63pb control de amplificación, 115pb complejo *M. tuberculosis*, 166pb *rpoB*, 120pb *katG*, 110pb *inhA*).

VALIDACIÓN DE LA GENOTIPIFICACIÓN COMO PRUEBA PARA EL DIAGNÓSTICO Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONIACIDA EN CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* CIRCULANTES EN BOLIVIA

Como se observa en la figura 7.2, pese a que el producto de amplificación está compuesto por 5 genes diferentes, la banda revelada parece ser una sola esto debido a la mínima diferencia en cuanto a peso molecular entre uno y otro amplicón. Se debe tomar en cuenta que hasta este paso simplemente determinamos si existen o no los genes que deseamos identificar.

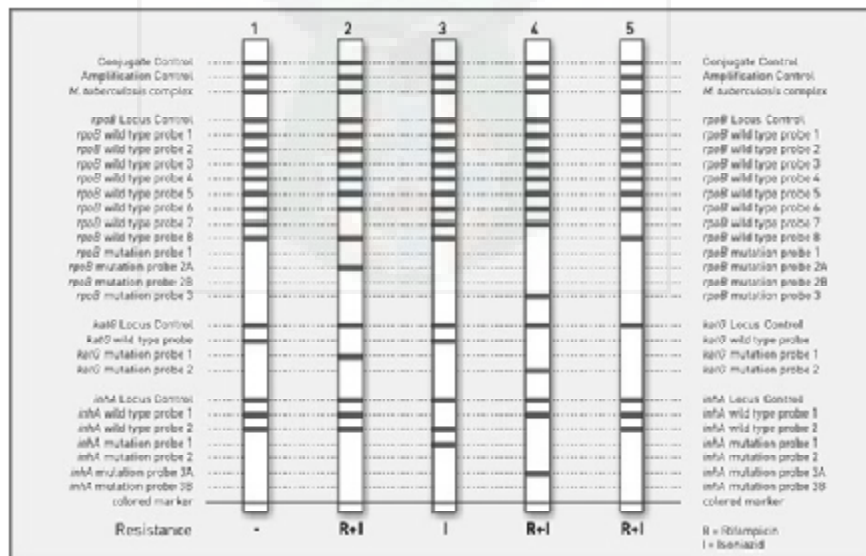
Figura 7.2: Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de los amplicones obtenidos mediante PCR multiplex en el laboratorio de FCFB La Paz – Bolivia 2010



1) control de corrida: 2-11) amplicones de *M. tuberculosis*

La PCR multiplex, simplemente nos permitió amplificar los 5 genes de interés, sin embargo para comprobar si las cepas pertenecían al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y para determinar el perfil de resistencia y/o sensibilidad de la prueba, procedimos a realizar la última fase del estudio en la que mediante hibridación reversa se identificó: al género *Mycobacterium tuberculosis* a través de una sonda específica para este género, la resistencia a Rifampicina, posible mediante la detección de las mutaciones más significativas en el gen *rpoB* (que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa), la resistencia a alto nivel de Isoniacida identificando al gen *katG* (que codifica para la catalasa peroxidasa), y finalmente la resistencia a bajo nivel de isoniacida, examinando la región promotora del gen *inhA* (que codifica a NADH enoilACP reductasa). (Figura7.3)

Figura 7.3: Esquema de las 27 sondas de hibridación presentes en la tira de Genotype MTBDRplus



(FUENTE: manual del kit Genotype MTBDRplus)

VALIDACIÓN DE LA GENOTIPIFICACIÓN COMO PRUEBA PARA EL DIAGNÓSTICO Y DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA E ISONIACIDA EN CEPAS DE *Micobacterium tuberculosis* CIRCULANTES EN BOLIVIA

Mediante la hibridación estudiamos tanto las cepas sensibles como las drogo resistentes, a pesar de que las 41 cepas sensibles amplificaron con éxito, un aislamiento, no se tomó en cuenta, debido a la falta de señales de hibridación positivas con las sondas específicas de control, y 2 cepas con fenotipo sensible pero genotipo resistente a RIF o INH de igual manera no fueron incluidas en el grupo de las sensibles, por lo tanto se tomaron en cuenta para el análisis estadístico solamente 38 cepas sensibles, mientras que en el total de las cepas resistentes la amplificación y la hibridación fueron exitosas. Los resultados obtenidos luego de la genotipificación se muestran en la Tabla 7.2 en forma de número y porcentaje de sondas hibridadas en la región del gen en su forma normal y sus mutaciones de acuerdo a condición de resistencia.

Tabla 7.2 Descripción de bandas de hibridación y prevaencia de mutaciones encontradas en *Micobacterium tuberculosis* genotipificadas en el Laboratorio de de Bioquímica Molecular FCFB, La Paz-Bolivia durante los años 2009-2010.

Gen	Banda	Región del gen o mutación	MDR n=52(%)	RIF Mono-resistente n=14(%)	INH Mono-resistente n=31(%)
<i>rpoB</i>	WT1	506-509	52 (100)	14 (100)	31 (100)
	WT2	510-513	52 (100)	14 (100)	31 (100)
	WT3	513-517	51 (98)	14 (100)	31 (100)
	WT4	516-519	50 (96)	14 (100)	31 (100)
	WT5	518-522	52 (100)	13 (93)	31 (100)
	WT6	521-525	52 (100)	14 (100)	31 (100)
	WT7	526-529	38 (73)	14 (100)	30 (97)
	WT8	530-533	18 (35)	11 (79)	31 (100)
<i>katG</i>	MUT1	D516V	3 (6)	0 (0)	0 (0)
	MUT2A	H526Y	4 (8)	0 (0)	0 (0)
	MUT2B	H526D	2 (4)	0 (0)	0 (0)
<i>inhA</i>	MUT3	S531L	30 (58)	3 (21)	0 (0)
	WT	315	38 (73)	14 (100)	19 (61)
	MUT1	S315T1	20 (38)	1 (7.1)	8 (26)
<i>inhA</i>	MUT2	S315T2	17 (33)	1 (7.1)	4 (13)
	WT1	-15/-16	47 (90)	14 (100)	29 (97)
	WT2	-8	52 (100)	14 (100)	30 (93)
	MUT1	C15T	5 (10)	0 (0)	2 (6)
	MUT2	A16G	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	MUT3A	T8C	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MUT3B	T8A	0 (0)	0 (0)	1 (3)	

MUT= mutación; WT= sin mutación en esta tabla se describe el porcentaje total de sondas hibridadas en cada gen, por ejemplo WT1 en el gen *rpoB* se observo en todas los amplicones hibridados.

Una vez obtenidos los resultados de la genotipificación nos enfocamos en la evaluación y análisis de los resultados centrados en primera instancia en la comparación de los perfiles de resistencia y/o sensibilidad obtenidos tanto por el método de las proporciones como por genotipificación, con el propósito de obtener datos de concordancia entre ambos métodos se obtuvo los siguientes valores: fenotipo MDR 52/genotipo MDR 36 (71%); Monoresistentes a Rifampicina fenotipo 14/genotipo10 (71%), monoresistentes a Isoniacida fenotipo 31/genotipo

19 (61%), y cepas sensibles fenotipo 40/genotipo38 (95%). Dichos valores surgieron del análisis descrito en la tabla 7.3.

Tabla 7.3: Resultados de la comparación entre el método genotípico y el método de las proporciones en Lowenstein-Jensen en 138 aislamientos de *Micobacterium tuberculosis*.

Resultados Aislamientos INLASA	Número de aislamiento		
	Presencia de Mutaciones	Ausencia de Mutaciones	Ausencia de hibridación en controles
RIF Resistente (n=14)	10	4	0
INH Resistentes (n=31)	19	12	0
MDR (n=52)	37	15	0
Sensibles (n=41)	2	38	1

En cuanto al análisis de las medidas estadísticas de test diagnóstico de genotipificación mediante el kit genotype MTBDRplus, se procedió al cálculo de la sensibilidad y especificidad que nos permiten la descripción de la “precisión” de la prueba; además del cálculo de otras dos medidas que orientan de manera directa a la “estimación de la probabilidad” tanto de la enfermedad como de la susceptibilidad a antituberculosos, siendo estos los valores predictivos positivos y los valores predictivos negativos.

El primer análisis del test diagnóstico se enfocó a la validez de la prueba para detectar al complejo *M. tuberculosis* es decir el paso inicial, fue confirmar si las cepas recibidas pertenecían realmente al complejo de *M. tuberculosis*. Realizando el análisis general de las cepas observamos que de las 138 cepas 137 hibridaron para la sonda del complejo *M. tuberculosis* y una no hibridó en esta zona. Por tanto la sensibilidad estimada del método fue 99.3%, especificidad 100%, valor predictivo positivo 100%, y valor predictivo negativo 99%. Lo que demuestra que el método de genotipificación es altamente sensible y específico para detectar si la cepa pertenece o no al complejo *M. tuberculosis*.

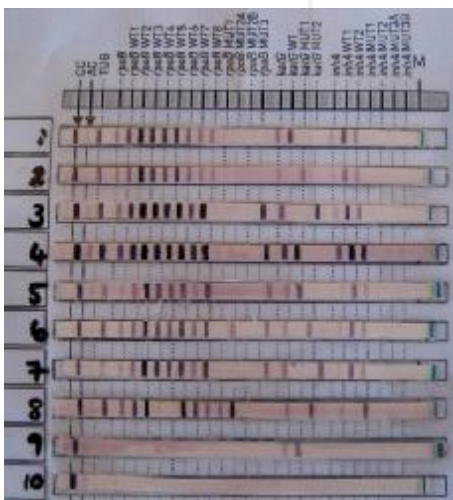


Figura 7.4: Ejemplo de los resultados obtenidos en tiras de hibridación 1) *M. tb.* Susceptible; Resistente a Isoniacida (mutación en *katG*); 3) *M. tb.* con mutaciones en *rpoB* y *katG*; 4) *M. tb.* mono Resistente a Rifampicina; 5) *M. tb.* mono resistente a Rifampicina con 2 mutaciones en *rpoB* y en *katG*; 7) mutaciones en *rpoB* y en *katG*; 8) MDR con mutaciones en *rpoB* y en *inhA*; 9) resultado indeterminado; negativo.

El análisis estadístico del test para la determinación tanto de multidrogo resistencia, es decir resistencia a Isoniacida y a Rifampicina, así como la determinación de monoresistencia ya sea solo a RIF o a INH, se basa en la detección de mutaciones que se da cuando el respectivo amplicón no puede unirse a la correspondiente sonda wild type (tipo salvaje), la ausencia de señal en al menos una de las sondas wild type indica, por tanto, resistencia de la cepas testeadas al respectivo antibiótico. Por el contrario cuando todas las sondas wild type de un gen son positivas, no se detectan mutaciones en las regiones examinadas, la cepa testada es sensible al respectivo antibiótico (Figura 7.4).

El gold estándar de este estudio lo constituyen el cultivo y el método de las proporciones, en base a los resultados de estos métodos, para la validación dividimos a nuestra muestra total en tres grupos, determinación de multidrogo-resistencia, (cepas resistentes a Isoniacida y a Rifampicina), incluyendo además al grupo de cepas control, es decir, cepas pansusceptibles y aquellas resistentes a otros antituberculosos diferentes a RIF e INH.

El análisis estadístico del test de genotipificación para la determinación de cepas MDR en un total de 137 cepas, mostró los siguientes resultados en relación al fenotipo: 5 falsos positivos, 14 falsos negativos y 81 cepas negativas por ambos métodos, estas últimas corresponden a las cepas sensibles a RIF e INH, monoresistentes y poliresistentes. Por tanto, la sensibilidad del método es de 72%, la especificidad 94%, valor predictivo positivo 88% y valor predictivo negativo 79.3%. Lo que demuestra que el método de genotipificación es bastante sensible y altamente específico para la detección de cepas MDR, además se calculó el índice *kappa* (*k*) dando como resultado 0.69 resultado que indica una buena proporción de concordancia entre el método evaluado y el estándar (genotipo/fenotipo). (Tabla 7.4).

Tabla 7.4: Tabla de contingencia para cálculo de propiedades del test diagnóstico en cepas MDR.

	Resistente	Sensible		
+	37	5	42	Sensibilidad = 72%
-	14	81	95	Especificidad = 94%
	51	86	137	VPP = 88%
				VPN = 79,3%
				<i>k</i> = 0.69

En el segundo grupo, constituido por cepas resistentes a Rifampicina, el análisis estadístico del test de genotipificación para la determinación de cepas MDR en un total de 137 cepas, mostró los siguientes resultados en relación al fenotipo: 52 cepas fueron positivas por ambas pruebas, 13 fueron falsos positivos, 4 falsos negativos y 68 cepas fueron negativas por ambos métodos, estas últimas corresponden a las cepas sensibles a RIF o resistentes a otros antituberculosos distintos a RIF. Por tanto la sensibilidad del método para la detección de resistencia a Rifampicina es de 80%, especificidad 94%, valor predictivo positivo 93% y valor predictivo negativo 84%. Lo que demuestra que el método de genotipificación es bastante sensible y altamente específico para la detección de cepas resistentes a RIF, además se calculó el índice *kappa* (*k*) dando como resultado 0.75 resultado que indica una buena a optima

proporción de concordancia entre el método evaluado y el estándar (genotipo/fenotipo). (Tabla 7.5).

Tabla 7.5: Tabla de contingencia para cálculo de propiedades del test diagnóstico en cepas resistentes a Rifampicina.

	Resistente	Sensible			
+	52	4	56	Sensibilidad	= 80%
-	13	68	81	Especificidad	= 94%
	65	72	137	VPP	= 93%
				VPN	= 84%
				<i>K</i>	= 0.75

Finalmente el análisis estadístico del test de genotipificación para la determinación de cepas resistentes a Isoniacida en un total de 137 cepas, mostró los siguientes resultados en relación al fenotipo: 56 cepas fueron positivas por ambas pruebas, 25 fueron falsos positivos, 6 falsos negativos y 50 cepas fueron negativas por ambos métodos, estas últimas corresponden a las cepas sensibles a INH, o resistentes a otros antituberculosos distintos a INH. Por tanto la sensibilidad del método es de 69%, la especificidad 89%, valor predictivo positivo 90% y valor predictivo negativo 67%. Los valores obtenidos si bien no son tan altos como los anteriores están dentro del rango de valores aceptables para determinar cepas con resistencia a Isoniacida además de acuerdo al índice *kappa* (*k*) que dio como resultado 0.55 indica que existe una regular a buena proporción de concordancia entre el método evaluado y el estándar (genotipo/fenotipo). (Tabla 7.6).

Tabla 7.6: Tabla de contingencia para cálculo de propiedades del test diagnóstico en cepas resistentes a Isoniacida.

	Resistente	Sensible			
+	56	6	62	Sensibilidad	= 69%
-	25	50	75	Especificidad	= 89%
	81	56	137	VPP	= 90%
				VPN	= 67%
				<i>k</i>	= 0.55

Con el fin de cumplir con nuestro último objetivo específico, aprovechando de la ventaja, que el test nos permite analizar además otras variables y del hecho de que este estudio cuenta con cepas de varias regiones del país, a continuación realizamos un análisis de las mutaciones encontradas en cada una de las cepas las cuales confirieren resistencia a los antibióticos en estudio, estos datos que son netamente genéticos nos permitirán dar respuesta a preguntas que son epidemiológicas.

Al genotipificar las cepas resistentes a Rifampicina se observaron 4 tipos de mutaciones además de mutaciones indeterminadas que se distribuyen en las 7 regiones de donde se obtuvieron las cepas, estos datos se detallan en la Tabla 7.7.

Tabla 7.7: Mutaciones encontradas en la región 81pb del gen *rpoβ* según distribución geográfica.

Mutación <i>rpoβ</i>	Sucre	La Paz	Cochabamba	Santa Cruz	Potosí	Tarija	Yacuiba	total
D516V (MUT1)	0	0	0	3	0	0	0	3
H526Y (MUT2A)	1	0	2	1	0	0	0	4
H526D (MUT2B)	0	0	1	1	0	0	0	2
S531L (MUT3)	2	8	7	8	2	6	0	33
Indeterminado	1	6	4	1	0	2	0	14
Total	4	14	14	14	2	8	0	56

Un total de 56 cepas presentaron perfil genotípico de resistencia a Rifampicina las cuales contienen una mutación en la región de 81 pb del gen *rpoβ*, facilitando así en forma rápida un acercamiento convencional para detectar la resistencia a la Rifampicina y/o la MDR. Es así que en este estudio, el total de cepas resistentes a Rifampicina entre MDR y monoresistentes, fue 56 entre ellas, las mutaciones más frecuentes y en relación a la condición clínica se encontraron en las posiciones S531L (MUT3) 59% (33/56); D516V (MUT1) 5% (3/56) y H526Y (MUT2A) 7% (4/56), la menos frecuente se encontró en la posición H526D (MUT2B) 4% (2/56), también se observó 25% (14/56) mutaciones indeterminadas. (Estos datos se describen en la Tabla 7.7).

A partir de los datos detallados en la tabla 7.7 y los perfiles de resistencia genotípicos de las cepas MDR, se sabe que todas las cepas que presentaron mutaciones en las regiones D516V (MUT1); H526Y (MUT2A); y H526D (MUT2B), presentaron genotipo MDR mientras que mutaciones en la región S531L estuvo presente tanto en cepas MDR como en monoresistentes a Rifampicina.

Al genotipificar las cepas resistentes a Isoniacida se observaron 5 mutaciones diferentes; 2 en el gen *katG* además de mutaciones indeterminadas y 3 en el gen *inhA*, que se distribuyen en las 7 regiones de donde se obtuvieron las cepas, estos datos se detallan en la Tabla 7.8.

De las 62 cepas genotipificadas resistentes a Isoniacida, 51 presentaron resistencia a Isoniacida de alto nivel, determinada por mutaciones en el gen *katG*, en esta región las mutaciones más frecuentes y en relación a distribución geográfica ocurrieron en las posiciones S315T1 (MUT1) 47% (29/62); S315T2 (MUT2) 35% (22/62); y en 5% (3/62) la mutación fue en ambas regiones (S31T1 y S315T2).

La resistencia a Isoniacida de bajo nivel determinada por mutaciones en el gen *inhA* se presentó en 11 cepas en las posiciones C15T (MUT1) 11% (7/62); y T8A (MUT3B) 2% (1/62). En este gen también se observó 3 mutaciones indeterminadas. (Estos datos de los dos genes estudiados en función a la distribución geográfica son descritos en la Tabla 7.8)

Tabla 7.8: Mutaciones encontradas en los genes *katG* e *inhA* según distribución geográfica.

Mutación	Sucre	La Paz	Cochabamba	Santa Cruz	Potosí	Tarija	Yacuiba	total
<i>katG</i> S315T1 (MUT1)	1	6	7	11	0	3	1	29
<i>KatG</i> S315T2 (MUT2)	0	4	7	9	0	2	0	22
<i>inhA</i> C15T (MUT1)	1	3	2	0	1	0	0	7
<i>inhA</i> T8A (MUT3B)	0	0	0	1	0	0	0	1
Indeterminado	0	0	1	1	0	1	0	3
Total	2	13	17	22	1	6	1	62

Los datos detallados en la tabla 7.8 y los perfiles de resistencia genotípicos de las cepas MDR, nos permitieron saber que 45% de las cepas que presentaron mutaciones en la región S315T1 (MUT1); 52% de S315T2 (MUT2) del gen *katG*; y 57% de C15T (MUT1); 100% de T8C del gen *inhA*, presentaron genotipo MDR.

8 DISCUSIÓN

Los avances de la ciencia han permitido a través de los años el desarrollo de nuevos y mejores métodos de diagnóstico para distintas patologías. Un buen diagnóstico es el medio fundamental para la prevención, pronóstico, tratamiento e investigación de todas las enfermedades especialmente las enfermedades infecciosas⁽⁵⁾.

Para aportar con este fin el proyecto Estudio Molecular de la Tuberculosis Multidrogo Resistente comenzó el año 2007 cuando por inquietud del PNT dirigido entonces por la Dra. Mirtha Camacho propuso la necesidad de incluir la aplicación de Tecnología Molecular a las pruebas diagnósticas de rutina, debido a que hasta ese año se habían ya desarrollado algunos kits comerciales que permitían la detección y determinación de perfiles de resistencia a drogas antituberculosas de manera mucho más rápida que los cultivos tradicionales⁽⁶⁻⁸⁾.

Dentro de la planificación de las estrategias para la selección de un nuevo método molecular se tomaron en cuenta estudios similares realizados en otros países y cuyos resultados estaban siendo analizados por OPS/OMS⁽¹⁰⁾, para aprobar su utilización como apoyo al diagnóstico de rutina. El kit Genotype MDBRT^{plus}, como ya indicamos en la introducción, fue el primero en ser aprobado y autorizado como método molecular de apoyo rutinario al diagnóstico y susceptibilidad de *M. tuberculosis*, dados los altos valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en países Europeos, sin embargo, la recomendación de OMS hizo hincapié en el hecho de que para poner en marcha estos ensayos cada país debería validar el método previamente, de acuerdo a la cepas circulantes en su territorio⁽¹⁾.

La estandarización y procesamiento exhaustivo de las técnicas nos permitió organizar el trabajo experimental de manera sistemática; dicho análisis nos proporcionó la información que culminó en la obtención de resultados de esta investigación. El presente trabajo muestra los resultados de este estudio que comprende la estandarización y procesamientos de técnicas para aplicarlas al diagnóstico y determinación de perfiles de resistencia a antituberculosos, así como un análisis estadístico para la validación del método y la descripción del grupo total, en cuanto a hallazgos genéticos específicos.

Se incluyeron 137 cepas, las cuales forman una población variada, en cuanto a procedencia (7 regiones del país), condición clínica y perfil fenotípico de las cepas como: Micobacterias pansusceptibles, sensibles a Rifampicina e Isoniacida, mono-resistentes a Rifampicina, mono-resistentes a Isoniacida y resistentes a Rifampicina e Isoniacida MDR. Teniendo así todos los posibles resultados en cuanto resistencia a Isoniacida y Rifampicina se refiere, tales características hacen de la población estudiada, adecuada para evaluación estadística y consecuente validación⁽¹¹⁶⁾.

Otra característica de la población estudiada es que las cepas fueron cultivadas a partir de muestras de pacientes desde el año 2008 a 2010, el hecho de efectuar pruebas de sensibilidad en cultivos almacenados más de dos meses por métodos convencionales, que podría condicionar falsos negativos no se da con los métodos de genotipificación, debido a que existen estudios que demuestran que en el rendimiento de las pruebas de genotipificación no influye el tiempo de almacenamiento de las cepas, pudiendo utilizar aún cepas congeladas más de 6 años^(115, 117), lo que permitiría realizar incluso estudios retrospectivos. De tal manera que al realizar el estudio se confirmó lo que se expresan otros autores acerca de que la prueba no es

influenciada por el tiempo de almacenamiento de las cepas lo cual permito la validación, además el ensayo genético no requiere de organismos viables y por lo tanto se reduce el riesgo biológico en el laboratorio^(115, 117), debido a que en los ensayos moleculares como en la PCR se trabaja solo con el material genético de la bacteria.

En PCR, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el analíto. Por tanto, una buena muestra implica siempre un correcto proceso de obtención de esta molécula a partir de material biológico⁽¹¹⁸⁾ ya que, los kits de análisis de patógenos por PCR incorporan detectores de inhibición, es posible obtener material genético analizable mediante el método de ebullición, pero el mismo está expuesto a degradación muy rápida por el alto contenido de impurezas, las cuales pueden eliminarse mediante purificación química del extracto de manera que se obtenga material genético de alta calidad y conservado por más tiempo, para estudios posteriores como el análisis automatizado de secuencias, así nos aseguraremos de disminuir las variables y que tales evaluaciones sean comparables entre sí por el uso del mismo material genético⁽¹¹⁸⁾. Es por esto que al realizar este trabajo se vio pertinente el uso de un método que combina propiedades físicas y químicas, este método, como se observa en la figura 17.B permite la recuperación de mayor cantidad de material genético de óptima calidad viabilizando así la elaboración de un banco de ADN para contar con material genético en futuras pruebas que ayuden en la lucha contra *M. tuberculosis*.

En cuanto a la obtención de material genético, si bien algunos estudios lo toman simplemente como un paso más en el procedimiento, el presente estudio considera a este como un objetivo específico, debido a la alta atención y destreza que representa trabajar con *M. tuberculosis*, que hace que el aislamiento de su material genético sea más complicado de aislar, no solo por la alta complejidad de su estructura morfológica, sino además por el alto riesgo biológico que representa la manipulación de estas cepas más aun conociendo que algunas de ellas son drogo resistentes.

Basándonos en estas condiciones es que se decidió cambiar el protocolo original de extracción de material genético recomendado por el manual de procedimientos del kit, ya que este incluía además de la ebullición un paso posterior de sonicación, si bien en principio utilizamos este equipo (sonicador), nos dimos cuenta de que el riesgo de contaminación en nuestras condiciones de trabajo era muy elevado debido a los aerosoles que se generan durante este procedimiento, ya que está comprobado por bibliografía que el hecho de ebullición a la bacteria de 80° c a 95°c no garantiza que ninguna este viable, por el contrario, algunos estudios revelan que luego de ser sometidas a ebullición, algunas Micobacterias continúan creciendo⁽¹¹⁸⁾ si bien no en la misma proporción que en el primo cultivo, pero aquellas viables si lo hacen, por lo tanto se decidió cambiar el protocolo original a uno que involucre un simple paso de ebullición que en la estandarización con los controles demostró ser efectiva ya que nos garanticen la letalidad de las Micobacterias.

Sin embargo, al ser el propósito del proyecto extenderse a la realización de estudios epidemiológico moleculares para conocer la distribución de estas cepas en Bolivia, se realizaron en paralelo pruebas de optimización de la extracción del material genético utilizando una combinación de ebullición con métodos químicos, concretamente utilizamos el kit Wizard Genomic de Promega, que nos permitió obtener un ADN de alta calidad y con capacidad de almacenamiento de largo plazo sin degradación importante.

El conocimiento de las bases moleculares impulsó el desarrollo del ensayo GenotypeMTBDR $plus$, el cual además de detectar si una cepa pertenece o no al complejo *M. tuberculosis* permite conocer si estas son resistentes (R) a Isoniacida y/o Rifampicina⁽¹¹⁷⁾. El test como tal se realiza a partir de una PCR múltiple en la cual se amplifica controles específicos de *M. tuberculosis*, de cada gen estudiado y un control de amplificación detectable en todas las *Micobacterias* y miembros del grupo de las Gram positivas con alto contenido G+C que por lo general es la secuencia parcial del gen *gyrβ* (1020pb)^(119, 120), además de un control específico para *M. tuberculosis* llamada TUB que corresponde a una región específica del gen ARNr 23S⁽¹¹⁵⁾, todos los anteriores son detectados en un paso posterior a la PCR de hibridación reversa a sondas específicas unidas a una membrana ensamblada sobre una tira⁽¹¹⁷⁾.

En consecuencia una cepa en nuestro estudio no fue tomada en cuenta debido a la ausencia de señales de hibridación en los controles, pese a las continuas repeticiones del ensayo, situación que dio a entender que tal cepa no pertenecía al complejo de *M. tuberculosis* por no contener en su genoma las secuencias control, probablemente esta cepa si bien es una *mycobacteria* y crece en el medio, quizás no pertenece al grupo CMBTB, por lo tanto es una cepa atípica.

En ocasiones, la complejidad de la técnica del cultivo de las micobacterias favorece sutiles errores de manipulación que suelen pasar inadvertidos, además, se atribuye un riesgo mayor de falsos cultivos positivos al uso de medios líquidos. Estos medios muy enriquecidos ofrecen óptimas condiciones de crecimiento a bacilos transferidos, aun a partir de un inóculo muy pequeño y/o después de sufrir estrés en el transporte, en el ambiente del laboratorio o durante el procesamiento de la muestra⁽¹⁴⁰⁾. Para confirmar un episodio de contaminación cruzada de laboratorio se recomienda evaluar en forma conjunta la información provista por la historia clínica de los pacientes involucrados (tanto anterior a la toma de la muestra como su evolución posterior), la investigación de foco y la genotipificación^(140, 141).

El sistema fue probado para su validación en 99 cepas del bacilo tuberculoso resistentes a estos dos fármacos y 38 cepas susceptibles (S) a los mismos. La población estudiada o tamaño muestral fue similar a otros realizados en países como Alemania (103 MDR/40 S), Turquía (78 R), Francia (95 R/14S), New York (92 R/51 S) y Vietnam (59 R/52 S)^(11, 117, 115, 121-123).

La lectura de resultados es interpretada por presencia de señales de hibridación ya sea en sondas de mutación en caso de cepas resistentes o hibridación en las sondas Wild Type (WT) en el caso de cepas susceptibles, sin embargo, la sola ausencia de hibridación en una de las sondas WT es asumida como resistencia, ya que, en este ensayo solo se toma en cuenta cambios de nucleótidos más frecuentes, como en el caso del gen *rpoβ* en la membrana están presentes 8 sondas WT sin embargo hay solo 4 sondas de mutación que en por lo menos 95% de las cepas con elevada resistencia a Rifampicina están presentes o en lo que se refiere a *katG* se toma en cuenta mutaciones en el codón 315 encontradas en más del 50% de las cepas con elevada resistencia a Isoniacida así como *inhA* encontrada mutada en 35% de cepas con baja resistencia a Isoniacida^(11, 117, 115, 121-124), pero en el mismo manual del ensayo se describen 35 posibles mutaciones en estos genes, y en teoría según la estimación de la tasa de evolución biológica y aplicándola a cada codón podrían existir 81 posibles cambios puntuales de nucleótidos⁽¹²⁵⁾, apoyando de esta manera, que en este ensayo se tomara en cuenta como

cepa resistente, ya sea a Rifampicina o Isoniacida, a la ausencia de hibridación de en la zona WT.

Otra situación que podría surgir al momento de interpretar los resultados es la observación de señales de hibridación en todas las sondas WT y alguna de las sondas de mutación, resultado que indicaría heteroresistencia o en otras palabras una mezcla de subpoblaciones bacterianas sensibles y resistentes en el cultivo inicial, constituyéndose este fenómeno en un importante obstáculo tanto para la terapia, como para los métodos moleculares de detección de resistencia, ya que, el límite de detección de la prueba es de 10% de ADN mutante en el total de la población bacteriana, y si la población de bacterias resistentes de un aislamiento es menor a este porcentaje, sería muy difícil detectar dicha resistencia por este método molecular ^(139, 117).

La drogo-resistencia en *M. tuberculosis* es atribuida principalmente a mutaciones acumuladas en los genes blanco de las drogas, llevando a su alteración como es el caso de Rifampicina e Isoniacida, en la RNAPol y catalasa peroxidasa respectivamente (5). Además la mono-resistencia ya sea a Rifampicina o Isoniacida es indicador de Multidrogo-resistencia ^(127 - 129), sobre todo si las mutaciones se encuentran en genes que dotan a la bacteria de resistencia a elevadas concentraciones de Rifampicina (gen *rpoβ*) o Isoniacida (gen *katG*) ^(125, 127 - 129), también es más frecuente encontrar cepas mono-resistentes a Isoniacida que a Rifampicina, debido a que mutaciones en otros genes que confieren resistencia a bajas concentraciones de Isoniacida no predisponen la resistencia a Rifampicina como es el caso de *inhA* ^(109, 125, 126) gen que también fue evaluado en este estudio.

El análisis estadístico del test de genotipificación para la determinación de cepas multidrogo-resistentes (MDR) mostro una sensibilidad de 72% la cual refleja la prevalencia colectiva de las mutaciones en secuencias blanco que derivan en resistencia a RIF e INH en las cepas probadas. También representa la sensibilidad final que este ensayo podría lograr al realizar un estudio epidemiológico en cepas en nuestra región ⁽¹²⁸⁾. La sensibilidad hallada en este estudio es similar a la de otros estudios en los que se utilizaron diferentes técnicas de genotipificación como secuenciación de diferentes genes que se dice confieren resistencia a Rifampicina e Isoniacida y aun así solo se logró un máximo de detección de 82,7% lo que indica que hay más genes involucrados en la resistencia u otros mecanismos de resistencia no moleculares ^(110, 115, 122, 123,128, 129, 130-132), además los resultados descritos muestran que la mayoría de las mutaciones ocurren en *rpoβ*, *katG* e *inhA*. Otras mutaciones ocurren a costa de la bacteria por esto es menos frecuentes o están asociados con los genes ya mencionados. ^(3,109, 125, 129, 133)

La especificidad de la genotipificación mediante hibridación para la detección de cepas MDR es de 94%, este valor muestra que la técnica evalúa los genes importantes en los que mutaciones realmente derivan en multidrogo-resistencia y es muy alta la capacidad de la prueba para detectar los verdaderos negativos o sensibles, la especificidad es inversamente proporcional a la sensibilidad de la prueba, de tal manera que existe la probabilidad que esta disminuya en presencia de una población mixta, por ejemplo, un cultivo que contenga cepas susceptibles mayor al 50% ^(128, 139) y en menor proporción cepas resistentes el resultado podría ser interpretado como cepas sensibles, así mismo debido a que el ensayo detecta mutaciones en un solo nucleótido, pero no discrimina las mutaciones sin sentido en las mutaciones

silenciosas, una cepa con mutación silenciosa se interpretaría como resistente^(122, 128, 139), de cualquier manera como podemos comprobar en la Tabla 2, el porcentaje de concordancia de detección de este tipo de cepas es mucho más alto (87%) en MDR que en cepas mono-resistentes.

Se calculó que el valor predictivo negativo (VPN), es del 79.3% valor aceptable teniendo en cuenta que es influenciado por la sensibilidad del ensayo y la prevalencia de cepas MDR en el país. Esta cifra relativamente elevada indica una mediana proporción de cepas MDR circulantes en nuestro país⁽¹²⁸⁾. Así mismo el valor predictivo positivo (VPP) hallado para el método es de 88% este valor es influenciado por la sensibilidad y especificidad del método, al ser elevado da la certeza de que el método es confiable en cuanto a la detección de cepas MDR⁽¹³⁴⁾.

Una manera de expresar la fiabilidad de una prueba es por medio del índice *kappa* (*k*), el cual, dio un valor numérico de 0.69 que constituye un buen a óptimo avance en relación con la tasa general de concordancia casual⁽¹³⁴⁾. El índice *k* representa la proporción de concordancias con respecto a un estándar de oro en este caso el cultivo para la detección del CMTB y el método de las proporciones para la susceptibilidad a antituberculosos, además de la esperada por casualidad, que también influye este índice, ya que, está sujeto a la prevalencia de la enfermedad⁽¹³⁴⁾.

La resistencia a Rifampicina (RIF) involucra alteraciones de la RNA polimerasa, específicamente, el gen *rpoβ* que es el que codifica la subunidad β de la RNAPol, este gen ha sido objeto de estudio en la últimas dos décadas identificándose mutaciones en 8 codones 511, 513, 516, 518, 522, 526, 531, y 533 en el 97-99% de las cepas de *M. tuberculosis* Rif-resistentes^(3, 110, 135), aunque en muy pocos casos 1% (2) de cepas fenotípicamente sensibles a la Rifampicina se identificaron mutaciones en los codones 515 y 533^(110, 133) esto indica que a pesar de que aparezca una mutación L533P en la respectiva cepa, esta puede todavía ser sensible a Rifampicina. Por tanto si la banda WT8 está ausente y la sonda de la mutación *rpoβ* no se tiñe, deben ser considerados los resultados de la resistencia fenotípica.

Las mutaciones se localizan en la región altamente conservada del gen *rpoβ* confirmando a la bacteria resistencia a altos niveles de Rifampicina^(3, 110, 133, 135) es debido a esta información que se optó por la validación del método para la detección de mono-resistencia a Rifampicina ya que el sistema cuenta con 8 sondas que abarcan del codón 506 al codón 533 permitiendo un examen completo de la región responsable de los mecanismos moleculares que derivan en resistencia a Rifampicina.

En los últimos años han sido publicadas mutaciones adicionales dentro de las testadas en la región del gen *rpoβ* causantes de la resistencia a Rifampicina^(11, 117, 128, 129). Ya que estas mutaciones son muy raras, estas no fueron accesibles para la validación del sistema.

El análisis estadístico del test de genotipificación para la determinación de cepas Rif-resistentes mostro una sensibilidad de 80% que refleja la prevalencia colectiva de las mutaciones para las secuencias blanco en el gen *rpoβ* de las cepas probadas. También representa la sensibilidad final que este ensayo podría lograr al realizar un estudio epidemiológico en las cepas de nuestra región⁽¹³⁴⁾. La sensibilidad hallada en este estudio es similar a la de otros estudios en los que se examinó el mismo gen completo es decir estudiaron

adicionalmente otros codones como el 687 y 146, ^(3, 110, 133) aun así se logró el mismo porcentaje de detección de 99% lo que indica que mutaciones en otros codones son muy raras ^(3, 109), además los resultados descritos en países como Japón, Estados Unidos, el continente Europeo y Africano ⁽¹³⁰⁻¹³²⁾ muestran que las mutaciones de mayor importancia o que confieren resistencia a concentraciones elevadas de RIF ($\geq 64\mu\text{g/mL}$) ocurren en los codones 516, 526, y 531 ^(109, 117, 121, 122, 125, 127, 133), en particular este último ya que no se observó ninguna alteración en este codón en cepas con MIC $\leq 1\mu\text{g/mL}$, situación que es de interés en nuestro estudio ya que (32/47) 68% de las mutaciones encontradas se identificaron en este codón indicando alta prevalencia de cepas altamente resistentes ^(3,133, 136, 137).

Se calculó que el valor predictivo negativo (VPN), es del 84% valor aceptable teniendo en cuenta que es influenciado por la sensibilidad del ensayo y la prevalencia de resistencia a RIF en el país. Esta cifra indica una moderada proporción de cepas RIF-resistentes circulantes en nuestro país ⁽⁸⁾. Así mismo el valor predictivo positivo (VPP) hallado para el método en lo que se refiere a que si una cepa es verdaderamente Rif-resistentees de 93% este valor es influenciado por la sensibilidad y especificidad del método, al ser elevado da la certeza de que el método es confiable en cuanto a la detección de cepas Rif-resistentes ⁽¹³⁴⁾.

La especificidad de la genotipificación mediante hibridación para la detección de cepas Rif-resistentes es de 94%, valor óptimo, similar al de otros estudios en los que se reporta hasta 100% de especificidad ^(11, 115, 122, 123, 127) y en comparación con los mismos también la mayoría de las mutaciones fueron halladas en el codón 531 que en la técnica equivale a WT8/MUT3, por tanto, existe la probabilidad que una población mixta con cepas susceptibles mayor al 50% ^(128, 139) hayan sido interpretadas como sensibles, así mismo debido a que el ensayo detecta mutaciones en un solo nucleótido, pero no discrimina las mutaciones sin sentido en las mutaciones silenciosas o como la del codón 533 ya mencionada. Una cepa con mutación silenciosa se interpretaría como resistente ^(3, 128, 137, 139), de cualquier manera el ensayo tiene un 99% de capacidad para detectar la resistencia a Rifampicina.

Sin embargo, el valor del índice $kappa$ fue de 0.75 muy cercano al óptimo indicando de esta manera que la prueba es altamente concordante en relación a la prueba estándar ⁽¹³⁴⁾, demostrando que la probabilidad de que los sucesos descritos en el anterior párrafo conduzcan a falsos resultados es mínima.

El hecho de que en el mundo se presenten las mismas mutaciones cromosómicas en *M. tuberculosis*, indica que son mutaciones espontaneas a consecuencia del uso inadecuado de Rifampicina y no mediante mecanismos de transferencia de una bacteria a otra mediante plásmidos o transposones, ya que al momento no se ha descrito la existencia de material extracromosómico involucrado con resistencia en *M. tuberculosis* ^(3, 110), aspecto que hace controlable la diseminación de cepas drogo-resistentes. Además el factor determinante para el fracaso del tratamiento es la resistencia a RIF. La detección de resistencia a RIF por lo tanto ha sido propuesta como un indicador para el diagnóstico de la tuberculosis multirresistente. ⁽¹⁴²⁾

En otras regiones como Atlanta, y Uganda la DST para RIF dió resultados muy discordantes, incluso entre los laboratorios de referencia, debido a la existencia de cepas de *M. tuberculosis* con la susceptibilidad borderline. Explicaciones alternativas, tales como las cepas

mixtas que consisten en cepas susceptibles y resistentes, ⁽²²⁾ o heterorresistencia no son muy frecuentes ⁽¹⁴²⁾.

Como ya se mencionó, en este estudio el 68% de las cepas mono-resistentes a Rifampicina o MDR presentaron mutaciones en el codón 531, pero, existe evidencia que las cepas Rif-resistentes con mutación en este codón tienen mayor probabilidad de desarrollar resistencia también a INH, además de esta relación, mutaciones en el codón 531 se asocian con resistencia a concentraciones demasiado elevadas de Rifampicina de 32-40 µg/mL, en comparación con las micobacterias sensibles que tienen MICs de 0,063-1 µg/mL. ^(121, 123, 133) Este resultado indica que existe un elevado porcentaje de las cepas de *M. tuberculosis* circulantes en Bolivia con alto nivel de resistencia a Rifampicina.

Por otro lado, los mecanismos de resistencia a Isoniacida (INH) son complejos ya que involucran alteraciones en varios genes entre ellos: *katG*, *inhA*, *ahpC*, *ndh*, y *kasA*, observándose en el 42-60% de las cepas mutadas alteraciones en el codón 315 del gen *katG*, otros blancos como *kasA* están también mutados incluso en aislamientos susceptibles, además en algunos casos de cepas resistentes a Isoniacida también se encontraron mutaciones concomitantes con *katG* (50%) o *inhA* (35%) ⁽¹¹⁷⁾, Así mismo, mutaciones en *ahpC* se encuentran en 10% pero en las mismas se encuentra mutadas *inhA* ⁽¹⁰⁹⁾, y mutaciones en *ndh* se encontraron en Singapur en 9,5%, en otras regiones es raro encontrarlas ⁽⁸⁾. Como consecuencia, la sensibilidad de un ensayo molecular para la detección de las mutaciones que confieren resistencia a INH, no solo se determina por lo bien que un ensayo puede detectar mutaciones en los genes de interés sino que también se define por la prevalencia colectiva de las mutaciones presentes en esos genes entre las cepas probadas ⁽¹²⁸⁾.

En el presente estudio se observó que la principal vía de resistencia es por alteración del codón 315 en el gen *katG* debido a que el 82% de las cepas con genotipo resistente a INH presentaron alteraciones en esta región, resultado que concuerda con estudios realizados desde 1996-2001 ^(109, 133, 138) en Alemania, Japón, y América, se encontró esta mutación en el 93.6% de las cepas resistentes a INH ^(128, 138), además debido a que dicha mutación está asociada con la resistencia a altos niveles de Isoniacida (1-10 µg/mL) es vital la identificación de alteraciones en esta región en nuestro medio por su prevalencia. De igual manera, alteraciones a nivel genético que desencadenan en resistencia a INH se presentan con mutaciones a nivel del gen *inhA*, estas están asociadas con bajos niveles de resistencia a INH (≤ 1 µg/mL), y en este trabajo se detectaron en 18% de las cepas estudiadas este resultado menor también concuerda con otros efectuados en los que el porcentaje oscila entre 10-12% ⁽¹³⁸⁾.

Debido a que en la mayoría de los aislamientos resistentes a INH provenientes de 7 regiones del país se detectaron mutaciones en el codón 315 del gen *katG* (82%), podría decirse que las cepas circulantes en Bolivia son altamente resistentes a Isoniacida lo cual resultaría en un régimen terapéutico prolongado y más tóxico. Sin embargo, el menor porcentaje que presenta mutaciones en la región promotora del gen *inhA* (18%) nos proporciona un resultado alentador en cuanto al tratamiento se refiere ⁽¹³⁹⁾.

El análisis estadístico del test de genotipificación para la determinación de resistencia a INH mostró una sensibilidad de 69% que refleja la prevalencia colectiva de las mutaciones para las secuencias blanco en el gen *katG* y en la región promotora del gen *inhA* de las cepas

probadas. También representa la sensibilidad final que este ensayo podría lograr al realizar un estudio epidemiológico a las cepas en nuestra región ⁽⁸⁾.

La sensibilidad hallada en este estudio es similar a la de otros estudios en los que se examinaron hasta 5 genes diferentes que confieren resistencia a Isoniacida y aun así solo se logró un máximo de detección de 78% lo que confirma la existencia de más genes involucrados en la resistencia a Isoniacida ⁽¹²⁹⁾, además los resultados descritos muestran que la mayoría de las mutaciones ocurren en *katG* debido a que mutaciones en este gen no disminuyen el fitness de la bacteria mientras que, mutaciones en *inhA* disminuyen el Fitness bacteriano, por esto es menos frecuente que en *katG* ⁽¹²⁹⁾. En nuestro estudio la mayoría de las mutaciones fueron en un solo gen, aunque, si se observaron dos sitios mutados del gen *katG* en 3 cepas, pero, por lo descrito anteriormente mutaciones en este gen no interfieren en el fitness bacteriano.

La especificidad de la genotipificación mediante hibridación para la detección de cepas INH-resistentes es de 89%, aunque este valor es aceptable, existe la probabilidad que una población mixta con cepas susceptibles mayor al 50% ^(128,139) hayan sido interpretadas como sensibles, así mismo debido a que el ensayo detecta mutaciones en un solo nucleótido, pero no discrimina las mutaciones sin sentido en las mutaciones silenciosas, una cepa con mutación silenciosa se interpretaría como resistente ^(8, 139), de cualquier manera el ensayo tiene un 90% de capacidad para detectar la resistencia a Isoniacida.

Se calculó que el valor predictivo negativo (VPN), es del 67%, valor aceptable teniendo en cuenta que es influenciado por la sensibilidad del ensayo y la prevalencia de resistencia a INH en el país. Esta cifra confirma la elevada proporción de cepas INH-resistentes circulantes en nuestro país. También se halló el valor predictivo positivo (VPP) 90% para el método, este valor indica si una cepa es verdaderamente resistente a INH, la cifra hallada es influenciada por la sensibilidad y especificidad del método, al ser elevado da la certeza de que el método es confiable en cuanto a la detección de cepas resistentes a Isoniacida ⁽¹³⁴⁾.

Al igual que en muchos estudios realizados en el mundo ^(109, 125-129, 133, 138) la mayoría de las mutaciones que confieren resistencia a INH fueron detectadas en el codón 315 del gen *katG*, y un porcentaje considerable en la región promotora de *inhA* hecho que sugiere que esta técnica de genotipificación mediante hibridación de sondas específicas, puede ser una herramienta válida para la detección de cepas INH-resistentes ⁽¹¹⁹⁾.

Las mutaciones en cepas mono-resistentes a INH y MDR ocurren en las mismas regiones indistintamente pero en nuestro estudio se observó que la mayor parte de las mutaciones en el gen *katG* correspondieron a cepas con perfil MDR y por el contrario las mutaciones en *inhA* se presentaron en la mayoría de las cepas mono-resistentes a INH. Lo que sugiere que el tipo de mutación causante de resistencia a una droga puede aumentar la probabilidad de desarrollar resistencia a otra droga en este caso a RIF. Estos resultados son consistentes con los de otros estudios realizados en Australia, Colombia, India, México, Texas, New York, y España donde la población en estudio variaba de 45 a 292 entre cepas susceptibles y resistentes a INH, en los que se encontró una menor incidencia de mutaciones en la región promotora de *katG* en cepas MDR ^(11, 115, 117, 121-123, 129,139).

En cepas resistentes a INH se han encontrado otros genes mutados como: *ahpC*, *oxyR*, y *kasA*, este último esta mutado también en cepas susceptibles⁽¹⁰⁹⁾, sin embargo en la mayoría de las cepas resistentes a INH con las mutaciones mencionadas también se detectó mutaciones en *katG* e *inhA* debido a que mutan como mecanismo para combatir el estrés oxidativo ya que su sobreexpresión incrementa la actividad peroxidasa⁽¹²⁵⁾.

El índice *kappa* para INH fue de 0.55 muy cercano a un valor bueno en la escala de concordancia, si bien, es bajo solo confirma que existen más genes involucrados en la resistencia a INH y otros mecanismos⁽¹³⁴⁾.

Finalmente, para cumplir con el último objetivo específico se creó una base de datos (tabla 9-10) con los resultados emanados por este ensayo, que, al tener la capacidad de detectar mutaciones específicas en las cepas resistentes, nos permitirá predecir mediante análisis más finos como los de secuenciación genética, tener una idea de la evolución en cuanto a resistencia que las cepas de *M.tuberculosis* circulantes en nuestro medio tendrán a futuro.

Todavía no se entienden totalmente la acción y el mecanismo de la resistencia a las tres drogas anti-tuberculosis más importantes. Sin embargo, la evidencia molecular actual indica que es esencial la aplicación rutinaria de pruebas moleculares rápidas en el manejo clínico de la tuberculosis resistente a las drogas. Se han usado con éxito muchos acercamientos para detectar e identificar a las mutaciones más comunes que están asociadas con la resistencia a las drogas^(8,16,38). En muchos casos, el conocimiento ganado al determinar una mutación en particular puede proporcionar información significativa sobre los siguientes aspectos: resistencia a las drogas, nivel de resistencia, resistencia cruzada a drogas similares, grado de relación de las cepas, y su virulencia.

La dependencia total en los resultados que se proporcionan de 2-4 semanas después (o incluso meses), mediante los métodos convencionales de susceptibilidad que son definitivos o el 'estandar de oro', no podría ser suficiente para un desenlace óptimo en el paciente. El laboratorio de tuberculosis ya no debe permitir que su paso sea dictado por el lento crecimiento de las micobacterias patogénicas. Más bien, el laboratorio es una parte vital del compromiso global renovado que tiene como finalidad a la eliminación de la tuberculosis⁽³⁹⁾.

Las últimas metas de la OMS, son la provisión de servicios oportunos, apropiados, y adecuados⁽¹⁾. Éstos deben ser proporcionados, además de ser evaluados y actualizados continuamente. Un paciente altamente infeccioso con tuberculosis debe tener acceso a servicios de laboratorio de última tecnología, aun cuando el paciente resida en un área donde un laboratorio local no es capaz de proporcionar esos servicios. Para lograr esta meta, pueden exigirse ideas innovadoras, tales como la evaluación centralizada por un laboratorio de salud público grande. Los límites distritales, estatales, o nacionales no deben restringir el acceso a éstos servicios de laboratorio. Los beneficios de proporcionar ensayos nuevos y clínicamente más relevantes a una población mucho mayor, sobre todo en regiones del mundo con alta incidencia, serían de gran importancia en la salud pública de todas las poblaciones.

Para enfrentar el desafío de la MDR-TB y la XDR-TB a nivel mundial, se requieren un gran aporte de recursos monetarios y el desarrollo de grandes recursos humanos para la prevención y el manejo de estos formidables escenarios de resistencia a las drogas. Entre las prioridades de la respuesta tenemos: la detección rápida de la resistencia a las drogas anti-tuberculosis, el uso de regímenes apropiados para el tratamiento, y el desarrollo de nuevas

drogas. Los recientes adelantos en la secuenciación de alto rendimiento del ADN, permitirán realizar la secuenciación de todo el genoma a partir de cepas únicas que son resistentes a las drogas, de una manera mucho más rápida y a un costo significativamente menor, lo que facilitará la identificación de nuevos y desconocidos mecanismos de resistencia a las drogas y finalmente llevará a una detección más eficaz de la resistencia a las drogas.

Se necesita una mejor comprensión acerca de los mecanismos de resistencia a las drogas en *M. tuberculosis* para acelerar el desarrollo de estas nuevas estrategias para el control de la TB resistente a las drogas. Sin embargo, debe seguir manteniéndose el fortalecimiento de los actuales programas de control de la TB a nivel global. El adecuado monitoreo de la resistencia a las drogas, sobre todo la MDR/XDR-TB en los nuevos pacientes además de la transmisión y caracterización molecular de las cepas resistentes a las drogas, como también el análisis del estado inmune de los pacientes y la susceptibilidad genética, son necesarios para resolver el problema de la adaptación, la virulencia y la transmisibilidad de las cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a las drogas.



9 CONCLUSIÓN

El método más seguro, simple y de menor riesgo biológico para la extracción de material genético de cepas de *Micobacterium tuberculosis* es el método físico de ebullición.

El estudio apoya los hallazgos bibliográficos y nos permite ratificar que existe elevada asociación entre mutaciones en genes específicos y la resistencia de *Micobacterium tuberculosis* tanto a Rifampicina como a Isoniacida.

Si bien al momento los métodos convencionales de determinación de susceptibilidad (método de las proporciones) son el estándar de oro a nivel mundial, el hecho de que existan algunos resultados discordantes entre genotipo y fenotipo en este estudio, no significa que el genotipo este errado, más bien, abre la posibilidad de que existan otro tipo de mutaciones en cepas nativas de nuestro país que sean portadoras de mutaciones nuevas que no coincidan con aquellas del kit utilizado, por lo tanto se recomienda utilizar estas pruebas como apoyo a las pruebas convencionales y no así como prueba definitiva para direccionar el tratamiento

Se demostró, que este método es suficientemente sensible y específico, así mismo los valores predictivos muestran datos que nos prueban que el método es válido, confiable y aplicable para ser incorporado como prueba de rutina en apoyo al diagnóstico y determinación de susceptibilidad a antituberculosos emitido por el Laboratorio de Referencia Nacional de Tuberculosis (INLASA).

Finalmente, concluimos que este ensayo, además de ser un método valido y aplicable, nos permite conocer datos interesantes de epidemiología molecular, ya que la determinación de mutaciones específicas en los diferentes genes, nos dan una idea de la distribución de las MDR en Bolivia.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Organización mundial de salud. Control global de tuberculosis: supervisión, estudio, financiamiento. Reporte de la OMS 2009. WHO/HTM/TB/2009. Génova, OMS, 2009.
2. Wright A, Zigmol M, Van Deun A, *et al.* Epidemiología de la tuberculosis drogo resistente del 2002-07: una actualización del análisis del proyecto global supervisión de la resistencia a drogas antituberculosas. *Lancet* 2009; 373: 1861-1873.
3. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, *et al.* Detección de mutaciones para resistencia a rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341:647-650.
4. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, *et al.* *inhA*, un gen que codifica un blanco para isoniazida y etionamida en *Micobacterium tuberculosis*. *Science* 1994; 263: 227-230.
5. Musser J M, Kapur V, Williams D L, Kreiswirth B N, van Soolingen D, van Embden J D. caracterización del gen catalasa-peroxidasa (*katG*) e *inhA* locus en cepas susceptibles y resistentes a isoniazida de *Micobacterium tuberculosis* mediante secuenciación automatizada: conjunto limitado de mutaciones asociadas con drogo resistencia. *J Infect Dis* 1996; 173: 196-202.
6. Hilleman D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Uso del ensayo genotype MTBDR para la rápida detección de resistencia a isoniazida y rifampicina en aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005; 9: 1161-1167.
7. Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, Soyler I. Evaluación de el ensayo Genotype MTBDR para la detección de la resistencia a rifampicina e isoniazida en aislados de *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2338-2342.
8. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Interpretación del ensayo genotype MTBDR para la detección de la resistencia a rifampicina e isoniazida en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con bajo y alto nivel de resistencia. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3659-3964.
9. Bwanga F, Hoffner S, Haile M, Joloba M L. susceptibilidad del examen para tuberculosis multidrogo-resistente: meta análisis. *BMC infect Dis* 2009; 9:67.
10. Organización mundial de Salud. Línea molecular ensayo con sondas para el rápido sondeo de pacientes con riesgo de tuberculosis multidrogo-resistente (MDR-TB) declaración política 2008. http://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf.
11. Huyen MN, Tiemersma EW, Lan NT, Cobelens FG, Dung NH, Sy DN, Buu TN, Kremer K, Hang PT, Caws M, O'Brien R, van Soolingen D. Validation of the GenoType MTBDRplus assay for diagnosis of multidrug resistant tuberculosis in South Vietnam. *BMC Infect Dis* 2010; 10:149.
12. Anderson L. Diccionario de Medicina OCEANO MOSBY. 2002; 4° edición: 1257-1258.
13. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med* 2006; 100: 1862-70.
14. Campbell M. What tuberculosis did for modernism: the influence of a curative environment on modernist design and architecture. *Med Hist* 2005; 49: 463-88.
15. McCarthy OR. The key to the sanatoria. *J R Soc Med* 2001; 94: 413-7.
16. Organización Mundial de Salud (OMS). Pregunta frecuente acerca de la tuberculosis y el HIV. Octubre 2006.
17. Balcázar, Juan Manuel. "Epidemiología Boliviana". Imprenta Lopez. Buenos Aires. 1946.
18. Balcázar, Juan Manuel. "Historia de la Medicina en Bolivia". Juventud. La Paz. 1956.
19. Guerra Mercado, Juan. "Historia de la Microbiología en Bolivia". Imprenta Universitaria. UMSA. La Paz. 1995.

20. Guerra, J. Historia del diagnóstico Microbiológico de la tuberculosis en Bolivia. Archivos bolivianos de historia de la medicina. 1996;2: 1: 87-93.
21. Laboratorio de Referencia de Tuberculosis - *Tasa de prevalencia nacional.
22. Grmek M. Les Maladies à l'aube de la civilisation occidentale. 1994. Payot, Paris.
23. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 319-54.
24. Ji YE, Colston MJ, Cox RA. The ribosomal RNA (rrn) operons of fast-growing mycobacteria: primary and secondary structures and their relation to rrn operons of pathogenic slow-growers. Microbiology 1994; 140: 2829-40.
25. Stahl DA, Urbance JW. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. J Bacteriol 1990; 172: 116-24.
26. Cockburn A. The evolution and Eradication of Infectious Diseases. 1963. John Hopkins Press, Baltimore.
27. Smith NH, Gordon SV, de la Rúa-Domenech R, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of Mycobacterium bovis. Nat Rev Microbiol 2006a; 4: 670-81.
28. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 3684-9.
29. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 2001; 409: 1007-11.
30. Smith NH. A Re-Evaluation of "M. prototuberculosis". PLoS Pathog 2006b; 2.
31. Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.57c. 1993. Department of Genetics, University of Washington.
32. Swofford DL, Olson FJ. Phylogeny Reconstruction. In: Molecular Systematics. 1990. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
33. Swofford DL. PAUP (Phylogeny Analysis using Parsimony) v4.0. 1998. Sinauer Associates, Fitchburg, MA.
34. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993; 31: 406-9.
35. De Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, Nagelkerke NJ, van Embden JD, van Soolingen D. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of Mycobacterium tuberculosis based on serial patient isolates. J Infect Dis 1999; 180: 1238-44.
36. Fang Z, Kenna DT, Doig C, et al. Molecular evidence for independent occurrence of IS6110 insertions at the same sites of the genome of Mycobacterium tuberculosis in different clinical isolates. J Bacteriol 2001; 183: 5279-84.
37. Salamon H, Segal MR, Ponce de Leon A, Small PM. Accommodating error analysis in comparison and clustering of molecular fingerprints. Emerg Infect Dis 1998; 4: 159-68.
38. Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method. Mol Microbiol 1993; 10: 1057-65.
39. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35: 907-14.

40. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 2006; 6: 23.
41. Fabre M, Koeck JL, Le Fleche P, et al. High genetic diversity revealed by variable number tandem repeat genotyping and analysis of hsp65 gene polymorphism in a large collection of "Mycobacterium canettii" strains indicates that the M. tuberculosis complex is a recently emerged clone of "M. canettii". J Clin Microbiol 2004; 42: 3248-55.
42. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. PLoS Pathog 2005; 1: e5.
43. McGrath JW. Social networks of disease spread in the lower Illinois valley: a simulation approach. Am J Phys Anthropol 1988; 77: 483-96.
44. Coleman PG, Perry BD, Woolhouse ME. Endemic stability - a veterinary idea applied to human public health. Lancet 2001; 357: 1284-6.
45. Tanaka MM, Francis AR. Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 15266-71.
46. Avise JC, Arnold J, Ball RM, et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DANN bridge between population genetics and systematics. Ann Rev Ecol Syst 1987; 18: 489-522.
47. Collins CH, Yates MD, Grange JM. Subdivision of Mycobacterium tuberculosis into five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. J Hyg (Lond) 1982; 89: 235-42.
48. Rosas-Magallanes V, Deschavanne P, Quintana-Murci L, Brosch R, Gicquel B, Neyrolles O. Horizontal transfer of a virulence operon to the ancestor of Mycobacterium tuberculosis. Mol Biol Evol 2006; 23: 1129-35.
49. Le Dantec C, Winter N, Gicquel B, Vincent V, Picardeau M. Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems. J Bacteriol 2001; 183: 2157-64.
50. Stinear TP, Jenkin GA, Johnson PD, Davies JK. Comparative genetic analysis of Mycobacterium ulcerans and Mycobacterium marinum reveals evidence of recent divergence. J Bacteriol 2000; 182: 6322-30.
51. Chauhan A, Madiraju MV, Fol M, et al. Mycobacterium tuberculosis cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. J Bacteriol 2006; 188: 1856-65.
52. Niemann S, Kubica T, Bange FC, et al. The species Mycobacterium africanum in the light of new molecular markers. J Clin Microbiol 2004; 42: 3958-62.
53. van Soolingen D, van der Zanden AG, de Haas PE, et al. Diagnosis of Mycobacterium microti infections among humans by using novel genetic markers. J Clin Microbiol 1998; 36: 1840-5.
54. Draper P. The anatomy of mycobacteria. In The Biology of Mycobacteria. Ratledge C and Stanford J Ed Academic Press, London, 1982, p 9-52.
55. Garton NJ, Christensen H, Minnikin DE, Adegbola RA, Barer MR. Intracellular lipophilic inclusions of mycobacteria in vitro and in sputum. Microbiology 2002; 148: 2951-8.
56. Brennan PJ, Draper P. Ultrastructure of Mycobacterium tuberculosis p 271-284 In Bloom BR (ed). Tuberculosis, Pathogenesis, Protection and Control. American Society for Microbiology, Washington DC 1994.

57. Verbelen C, Dupres V, Menozzi FD, et al. Ethambutol-induced alterations in *Mycobacterium bovis* BCG imaged by atomic force microscopy. FEMS Microbiol Lett 2006; 264: 192-7.
58. Mahapatra S, Basu J, Brennan P, Crick D. Structure, biosynthesis, and genetics of the Mycolic Acid-Arabinogalactan-Peptidoglycan complex. p 275-285. In Tuberculosis and the Tubercle bacillus. ASM Press, Washington DC 2005.
59. van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 1236-45.
60. Riley LW. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. J Clin Invest 2006; 116: 1475-8.
61. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 463-96.
62. Kremer L, Besra G. A waxy tale, by *Mycobacterium tuberculosis* In Tuberculosis and the Tubercle bacillus. ASM Press, Washington DC 2005; 287-305.
63. Ratnan S and Chandrasekhar S. The pathogenicity of spheroplasts of *Mycobacterium tuberculosis*. Amer Rev Respir Dis 1976; 114: 549-54.
64. Cunningham AF, Spreadbury CL. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. J Bacteriol 1998; 180: 801-8.
65. Draper P, Daffe M. The cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* with special reference to the capsule and outer permeability barrier. In Tuberculosis and the Tubercle bacillus. ASM Press, Washington DC 2005, p 261-73.
66. Seiler P, Ulrichs T, Bandermann S, et al. Cell-wall alterations as an attribute of *Mycobacterium tuberculosis* in latent infection. J Infect Dis 2003; 188: 1326-31.
67. Neyrolles O, Hernandez-Pando R, Pietri-Rouxel F, et al. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? PLoS ONE 2006; 1: e43.
68. Wayne LG. Microbiology of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis 1982; 125: 31-41.
69. Harshey RM, Ramakrishnan T. Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. J Bacteriol 1977; 129: 616-22.
70. Verma A, Sampla AK, Tyagi JS. *Mycobacterium tuberculosis* rrn promoters: differential usage and growth rate-dependent control. J Bacteriol 1999; 181: 4326-33.
71. Kasarov LB, Moat AG. Metabolism of nicotinamide adenine dinucleotide in human and bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 1972; 110: 600-3.
72. Sohaskey CD. Regulation of nitrate reductase activity in *Mycobacterium tuberculosis* by oxygen and nitric oxide. Microbiology 2005; 151: 3803-10.
73. Reytrat JM, Berthet FX, Gicquel B. The urease locus of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 8768-72.
74. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. Purification, characterization, and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. J Bacteriol 1995; 177: 5644-52.
75. Sendide K, Deghmane AE, Reytrat JM, Talal A, Hmama Z. *Mycobacterium bovis* BCG urease attenuates major histocompatibility complex class II trafficking to the macrophage cell surface. Infect Immun 2004; 72: 4200-9.

76. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001; 409: 1007-11.
77. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3684-9.
78. Sola C, Filliol I, Legrand E, Mokrousov I, Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new hylogeographical clades. *J Mol Evol* 2001b; 53: 680-9.
79. Kinsella RJ, Fitzpatrick DA, Creevey CJ, McInerney JO. Fatty acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*: lateral gene transfer, adaptive evolution, and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10320-5.
80. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 9869-74.
81. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* 2006; 1: 7.
82. Mizrahi V, Andersen SJ. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? *Mol Microbiol* 1998; 29: 1331-9.
83. Rickman L, Scott C, Hunt DM, et al. A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol Microbiol* 2005; 56: 1274-86.
84. Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69: 527-43.
85. Mooney RA, Darst SA, Landick R. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Molecular Cell* 2005; 20: 335-45.
86. Manganelli R, Voskuil MI, Schoolnik GK, Smith I. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor σ_E : role in global gene expression and survival in macrophages, *Mol Microbiol* 2001; 41: 423-37.
87. Raman S, Song T, Puyang X, Bardarov S, Jacons Jr. WR, Husson RN. The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress response in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 2001; 183: 6119-25.
88. Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, Liao R, Harrel MI, Schoolnik GK. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7534-9.
89. Shires K, Steyn L. The cold-shock stress response in *Mycobacterium smegmatis* induces the expression of a histone-like protein. *Mol Microbiol* 2001; 39: 994-1009.
90. Geiman DE, Raghunan TR, Agarwal N, Bishai WR. Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven *Mycobacterium tuberculosis whiB*-like genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2836-41.
91. Wayne LG, Sohaskey CD. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 139-63.

92. Capelli G, Volpe E, Grassi M, Liseo B, Colizzi V, Mariani F. Profiling of *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during human macrophage infection: upregulation of the alternative sigma factor G, a group of transcriptional regulators, and proteins with unknown function. *Res Microbiol* 2006; 157: 445-55.
93. Volpe E, Cappelli G, Grassi M, et al. Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 2006; 118: 449-60.
94. Ewann F, Jackson M, Pethe K, et al. Transient requirement of the PrrA-PrrB two-component system for early intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2002; 70: 2256-63.
95. Haydel SE, Clark-Curtiss. Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 236: 341-7.
96. Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, Laval F, Daffe M, Smith I. The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 2006; 60: 312-30.
97. Betts JC. Transcriptomics and proteomics: tools for the identification of novel drug targets and vaccine candidates for tuberculosis. *IUBMB Life* 2002; 53: 239-42.
98. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61: 136-69.
99. Mawuenyega KG, Forst CV, Dobos KM, et al. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 396-404.
100. Palomino – Leão – Ritacco, et al. From basic science to patient care. *Tuberculosis* 2007. First Edition; 18: 593.
101. Shamputa IC, Jugheli L, Sadradze N, et al. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respir Res* 2006 7: 99.
102. World Health Organization. Global tuberculosis control – surveillance, planning, financing. WHO report 2003.
103. Balcells ME, Thomas SL, Godfrey-Faussett P, Grant AD. Isoniazid preventive therapy and risk for resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 744-51.
104. Stout JE. Safety of rifampin and pyrazinamide for the treatment of latent tuberculosis infection. *Expert Opin Drug Saf* 2004; 3: 187-98.
105. Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 13-21.
106. Douglas JG, McLeod MJ. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 127-46.
107. van Doorn HR, de Haas PE, Kremer K, Vandenbroucke-Grauls CM, Borgdorff MW, van Soolingen D. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of katG: a decade of experience in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 769-75.
108. van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249: 1-26.
109. Akos Somoskovi, Linda M Parsons y Max Salfinger. Base molecular de la resistencia a la isoniazida, rifampicina, y pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir res* 2001, 2; 164 – 168.

110. Y. Zhang, W. W. Yew. Mecanismos de resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis*. J. tuberc lung Dis. 13 (11): 1020 – 1030.
111. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2720-2.
112. Surendra K. Sharma, MD, PhD, FCCP y Alladi Mohan, MD. Tuberculosis Resistente a Múltiples Drogas* /Un problema que amenaza con desestabilizar el control de la tuberculosis. CHEST. 2006: 130(1); 261 – 272.
113. Garcia de Viedma D. Rapid detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 349-59.
114. Palomino JC, Martin A, Portaels F. Rapid drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: a review of colourimetric methods. Clin Microbiol Infect 2007; Published online 22 March, 2007.
115. Akos Somoskovi, Jillian Dormandy, Dimitra Mitsani, Jeremy Rivenburg, y Max Salfinger. Utilización de muestras de frotis positivos para evaluar al ensayo del Genotipo MTBDR basado en la PCR, para una detección rápida y directa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, así como su resistencia a la Isoniazida y a la Rifampicina. Journal of clinical Microbiology. 2006; 44(12): 4459 – 4463.
116. Domenech, J. M. Métodos estadísticos: modelo lineal de regresión. Barcelona:(1995) Evaluación estadística de datos Cap.3 p. 36.
117. Doris Hillemann, Michael Weizenegger, Tania Kubica, Elvira Richter, y Stefan Niemann. Uso del ensayo Genotype MDR-TB para la detección rápida de resistencia a Isoniacida y Rifampicina en aislamientos del complejo *M. tuberculosis*. Journal of clinical Microbiology. 2005; 43(8): 3699 – 3703.
118. <http://www.microbial-systems.com>. La extracción y purificación de ADN para el análisis por PCR. Mitos y realidades. Newsletter. 2009; 3: 1,2.
119. Laura Herrera-León, Tamara Molina, Pilar Saíz, Juan Antonio Sáez-Nieto, and María Soledad Jiménez. New Multiplex PCR for Rapid Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005; 49(1):144-147.
120. Kasai H., T. Ezaki, and S. Harayama. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. Journal of clinical Microbiology. 2000; 39:301-308.
121. Engiz Cavusoglu, Ajda Turhan, Pinar Akinci, and Ilknur Soyler. Evaluation of the Genotype MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampicin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. Journal of clinical Microbiology. 2006; 44(7): 2338 – 2342.
122. Florence Brossier, Nicolas Veziris, Chantal Truffot-Pernot, et al. Performance of the Genotype MTBDR Line Probe Assay for Detection of Resistance to Rifampicin and Isoniazid in Strains of *Mycobacterium tuberculosis* with Low and High-Level Resistance. Journal of clinical Microbiology. 2006; 44(10): 3659-3664.
123. Doris Hillemann, Sabine Rüsck-Gerdes, and Elvira Richter. Evaluation of the Genotype MTBDRplus Assay for Rifampicin and Isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Clinical Specimens. Journal of clinical Microbiology. 2007; 45(8): 2635-2640.

124. Marinus barnard, Heidi Albert, Gerrit Coetzee, Richard O'Brien, and Marlein E. Bosman. Rapid Molecular Screening for Multidrug-Resistant Tuberculosis in a High-Volume Public Health Laboratory in South Africa. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2008; 177: 787-792.
125. Ashor Rattan, Awdhesh Kalia, and Nishat Ahmad. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. *All India Institute of Medical Sciences*. 1998; 4(2): 195-209.
126. Khisimuzi Mdluli, Richard A. Slayden, YaQi Zhu, Srinivas ramaswamy, Xi Pan, David Mead, Deborah D. Crane, James M. Musser, Clifton E. Barry III. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl ACP Synthase by Isoniazid. www.sciencemag.org. *SCIENCE*. 1998; 280: 1607-1610.
127. Kazue Hirano, Chiyoji Abe, and Mitsuyoshi Takahashi. Mutations in the *rpoB* gene of Rifampicin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated Mostly in Asian Countries and Their Rapid Detection by Line Probe Assay. *Journal of clinical Microbiology*. 1999; 37(8): 2663-2666.
128. S.-Y. Grace Lin, William Probert, Melanie Lo, and Edward Desmond. Rapid Detection Isoniazid and Rifampicin Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Cultures or Smear-positive Sputa by Use of Molecular Beacoms. *Journal of clinical Microbiology*. 2004; 42(9): 4204-4208.
129. Manzour Hernando Hazbón, Michael Brimacombe, et al. Population Genetics Study of Isoniazid Resistance Mutations and Evolution of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 50(8): 2640-2649.
130. Viader-Salvado, J. M., C.M. Luna-Aguirre, J. M. Reyes-Ruiz, R. Valdez-Leal, L. del Bosque- Moncayo Mde, R. Tijerina-Menchaca, and M. Guerrero-Olazarán. Frequency of mutations in *rpoB* and codons 315 and 463 of *katG* in Rifampicin and/or Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northeast Mexico. *Microb. Drug resist.* 2003; 9:33-38.
131. Lee, A. S., I. H. Lim, L. L. Tang, A. Telenti, and S. Y. Wong. Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43: 2087-2089.
132. Marttila, H. J., H. Soini, E. Eerola, E. Vyshnevskaya, B. I. Vishnevskiy, T. F. Otten, A. V. Vasilyef, and M. K. Viljanen. A Ser315Thr substitution in *katG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42: 2443-2445.
133. Hideaki Ohno, Hironobu Koga, Shigern Kohno, Takayoshitashiro, and Kohei Kara. Relationship between Rifampicin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* Strains isolated in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996; 40(4): 1053-1056.
134. Simone A. Silva, y Joaquim Gonçalves Valente. Evaluación de pruebas de diagnóstico. *Instituto de Patología Tropical y Salud Pública*. 2003; 3: 5-17.
135. T. Prammananan, W. Cheunoy, D. Taechamahapun, J. Yorsangsukkamol, S. Phunpruch, P. Phdarat, M. Leechawengwong, and A. Chaiprasert. Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) strains from

- Thailand and development of a rapid method for mutation detection. *Clinical Microbiology and Infectious*. 2008; 14: 446-453.
136. Bodmer, T., G. Surcher, P. Imboden, and A. Telenti. Mutation position and type of substitution in the β -subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995; 35: 345-348.
 137. Williams, D. L., C. Waguespack, K. Eisenach, J. T. Crawford, F. Portaels, M. Salfinger, C. M. Nolan, C. Abe, V. Sticht-Grog, and T. P. Gillis. Characterization of rifampicin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994; 38: 2380-2386.
 138. Igor Mocrusov, Tatiana Otten, Maxin Filipenko, Anna Viazovaya, Eugeny Chrapov, Elena Limeschenko, Lidia Steklova, Boris Vishneuskiy, y Olga Maruskaya. Deteccion de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a INH mediante PCR multiplex con alelo especifico y como blanco el codón 315 del gen *katG*.
 139. Annelies van Rie, Thomas C. Victor, Madalene Richardson, Rabia Johnson, Gian D. van der Spuy, Emma J. Murray, Nulda Beyers, Nico C. Gey van Pittius, Paul D. van Helden and Robin M. Warren. Reinfection and Mixed Infection Cause Changing *Mycobacterium tuberculosis* Drug-Resistance Patterns. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005; 172: 636-642.
 140. Valeria Alonso, Roxana Paul, Lucia Barrera, Viviana Ritacco. FALSO DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS POR CULTIVO. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). 2007; 67: 287-294.
 141. Kremer K, Arnold C, Cataldi A, et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5628-38.
 142. A. Van Deun, L. Barrera, I. Bastian, L. Fattorini, H. Hoffmann, K. M. Kam, L. Rigouts, S. Rüsç-Gerdes, and A. Wright. *Mycobacterium tuberculosis* Strains with Highly Discordant Rifampin Susceptibility Test Results. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(11): 3501–3506.

Anexos

Formulario para recoger las muestras

Código de cepa	Procedencia	Caso	Perfil de resistencia
		Fracaso del Tx	
		Recaída	
		Abandono del Tx	
		Caso contacto	
		Otro	

Formulario final para correlacionar de datos

Código de cepa	Procedencia	Caso	Perfil de resistencia fenotípica	Perfil de Resistencia genotípica
		Fracaso del Tx	MDR	MDR
		Recaída	Poli-resistente	Mono-resistente
		Abandono del Tx	Sensible	Sensible
		Caso contacto		
		Otro		